

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 011**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2017 PCT/EP2017/056049**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17157972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2017 E 17710904 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023 EP 3430027**

54 Título: **Péptidos y combinación de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el cáncer de pulmón amicrocítico y otros tipos de cáncer**

30 Prioridad:

**16.03.2016 GB 201604458**

**16.03.2016 US 201662308944 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**10.04.2024**

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)  
Paul-Ehrlich-Strasse 15  
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**MAHR, ANDREA;  
SCHOOR, OLIVER y  
WEINSCHENK, TONI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 965 011 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Péptidos y combinación de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el cáncer de pulmón amicrocítico y otros tipos de cáncer

Generalmente, la presente descripción se refiere a péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y células destinados a la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente descripción se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente descripción se refiere, además, a epítopos peptídicos para linfocitos T que están asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que, por ejemplo, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones de vacunas destinadas a estimular respuestas inmunes antitumorales, o a estimular *ex vivo* linfocitos T que después serán transferidos a los pacientes. Los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o los péptidos como tales, también pueden ser dianas de anticuerpos, de receptores de linfocitos T solubles y de otras moléculas de unión.

La presente descripción se refiere, además, al uso de los péptidos anteriores para la generación de receptores de linfocito T (TCR) específicos que se unen a antígenos asociados a tumor (TAA) para actuar contra las células cancerosas, a la generación de linfocitos T que expresen dichos receptores y a métodos para tratar cánceres con dichos linfocitos. Las secuencias peptídicas desveladas en el presente documento y sus variantes derivan de moléculas HLA de clase I de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones de vacunas para desencadenar respuestas inmunes antitumorales o como dianas para el desarrollo de compuestos y células que sean farmacéutica o inmunológicamente activos. La presente invención se refiere a un péptido provisto de la secuencia de aminoácidos KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

**Antecedentes de la invención**

El cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) se denomina así por el tamaño de las células cancerosas observadas al microscopio y tiene que diferenciarse del cáncer de pulmón microcítico (SCLC). El cáncer de pulmón no microcítico supone entre el 85 % y el 90 % de todos los casos de cáncer de pulmón (American Cancer Society, 2015).

Ambos tipos de cánceres de pulmón, el microcítico y el no microcítico, conforman el segundo tipo de cáncer más frecuente en hombres y mujeres. El cáncer de pulmón es el primer causante de muertes por cáncer, pues supone cerca del 25 % del total. Es decir, cada año mueren más personas a causa del cáncer de pulmón que por el cáncer de colon, mama y próstata juntos. Asimismo, ambos tipos de cáncer de pulmón suponen en torno al 13 % de los nuevos casos de cáncer diagnosticados (más de 1,8 millones). El cáncer de pulmón afecta sobre todo a las personas ancianas. La media de edad en el momento del diagnóstico ronda los 70 años. Menos del 2 % de los casos se diagnostican en personas menores de 45 años.

El cáncer de pulmón no microcítico se divide en cuatro tipos principales, a saber: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma broncoalveolar y carcinoma macrocítico. El adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas son los tipos más habituales de cáncer de pulmón no microcítico a tenor de su citomorfología (Travis *et al.*, Lung Cancer Principles and Practice, Lippincott-Raven, New York, 361-395, 1996). Los adenocarcinomas se caracterizan por su localización más periférica en el pulmón y por presentar a menudo una mutación en el oncogén K-ras (Gazdar *et al.*, Anticancer Res., 14, 261-267, 1994). Los carcinomas de células escamosas suelen mostrar una localización más central y con frecuencia presentan mutaciones en el gen p53 (Niklinska *et al.*, Folia Histochem. Cytobiol., 39, 147-148, 2001).

Se han descrito numerosas alteraciones genéticas vinculadas a la aparición y la progresión del cáncer de pulmón, pero aún no se conocen con precisión los mecanismos moleculares (Sozzi, G. Eur. J. Cancer 37: 63-73 (2001)). La mayoría de los casos de cáncer de pulmón no microcítico se caracterizan por la presencia de mutaciones en ras que convierten al paciente en relativamente insensible al tratamiento con inhibidores de cinasas conocidos. Como resultado, el tratamiento actual contra el cáncer de pulmón queda limitado en general a fármacos citotóxicos, cirugía y radioterapia. A lo largo de la última década han salido a la luz nuevos agentes citotóxicos como paclitaxel, docetaxel, gemcitabina y vinorelbina que ofrecen múltiples posibilidades de tratamiento contra el cáncer de pulmón no microcítico en estadios avanzados; pese a ello, las mejoras de la supervivencia que brindan todos estos nuevos regímenes son pequeñas en comparación con el tratamiento con cisplatino (Schiller, J. H. *et al.*, N. Engl. J. Med. 346: 92-98 (2002); Kelly, K. *et al.*, J. Clin. Oncol. 19: 3210-3218 (2001)). Por esa razón, los médicos aguardan expectantes la aparición de nuevas estrategias de tratamiento, como los agentes moleculares dirigidos.

La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra las células cancerosas que reduce los efectos secundarios. La inmunoterapia antitumoral aprovecha la existencia de los antígenos asociados a tumores.

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:

- a) Antígenos de cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los

espermatoцитos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA son compartidos por los tumores y por el tejido normal del que deriva el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se halla en los melanomas y en los melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente diferenciados y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítomos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y desencadene la respuesta antitumoral. Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

d) Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como  $\beta$ -catenina, CDK4, etc.) Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o con su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunes sin riesgo de reacciones autoinmunes contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con el) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítomos nuevos en tumores, tal y como sucede con MUC1, o de fenómenos como el ajuste de proteínas durante la degradación, que en algunos casos pueden ser oncoespecíficos.

f) Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

La inmunoterapia basada en los linfocitos T tiene como diana los epítomos peptídicos derivados de proteínas específicas o asociadas con los tumores, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que son expresadas y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están reguladas al alza en las células del tumor correspondiente.

Existen dos tipos de moléculas MHC: las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC de clase I están compuestas por una cadena pesada alfa y una beta-2-microglobulina y las moléculas de clase II por una cadena alfa y otra beta. Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos más grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía (Brossart y Bevan, 1997; Rock *et al.*, 1990). Las moléculas MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC por ejemplo durante endocitosis y después procesadas por las mismas.

Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos derivados de los antígenos asociados a tumor (TAA) reviste gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunes antitumorales (Gnjatic *et al.*, 2003). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara *et al.*, 2006) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos (Hwang *et al.*, 2007).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmune, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel *et al.*, 2006). Los péptidos alargados de la descripción pueden actuar como epítopos activos para moléculas MHC de clase II.

Los linfocitos T cooperadores, activados por epítopos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo Th1 apoyan las funciones efectoras de los CTL CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítopos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones de vacunas destinadas a estimular respuestas inmunes antitumorales.

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Beatty y Paterson, 2001; Mumberg *et al.*, 1999). Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014).

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células inmunes, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel *et al.* descubrieron varios epítopos de MHC de clase II directamente en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los CTL CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + epítipo peptídico) o por los linfocitos T cooperadores CD4+ (ligando: moléculas de MHC de clase II + epítipo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

Para desencadenar la respuesta inmune celular el péptido de MHC de clase I ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclajes») en su secuencia que interaccionan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo cada alelo MHC posee un «motivo de unión» que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

En la reacción inmune dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos después por linfocitos T portadores de receptores de linfocito T (TCR) específicos.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una modalidad preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos normales. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo, porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas posteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden servir como dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja *et al.*, 2004). Es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítopos, para que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor desencadene una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales. No obstante, la identificación de los genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en líneas de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la intolerancia hacia ese epítipo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se

encuentre un linfocito T funcional y/o proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

- 5 En el caso de dirigir la acción contra complejos péptido-MHC a través de TCR específicos (por ejemplo, TCR solubles) y de los anticuerpos u otras moléculas de unión (soportes) conformes a la descripción, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En tales casos, la presentación es el factor determinante.

10 A pesar de los sustanciales avances alcanzados por la investigación básica y clínica en referencia a los TAA (Rosenberg *et al.*, Nature Med. 4: 321-7 (1998); Mukherji *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8078-82 (1995); Hu *et al.*, Cancer Res. 56: 2479-83 (1996)), el número de TAA con posibilidades de servir para el tratamiento contra el cáncer es pequeño. Los TAA que serían buenos candidatos para servir como dianas de la inmunoterapia son aquellos que se expresan con profusión en las células cancerosas y al mismo tiempo, limitan su expresión a tales células. Además, se espera que el descubrimiento de nuevos TAA que induzcan respuestas inmunes antitumorales que sean específicas y potentes impulsará el uso clínico de estrategias de vacunación peptídica contra diversos tipos de cáncer (Boon y van der Bruggen, J. Exp. Med. 183: 725-9 (1996); van der Bruggen *et al.*, Science 254: 1643-7 (1991); Brichard *et al.*, J. Exp. Med. 178: 489-95 (1993); Kawakami *et al.*, J. Exp. Med. 180: 347-52 (1994); Shichijo *et al.*, J. Exp. Med. 187: 277-88 (1998); Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1914-8 (1997); Harris, J. Natl. Cancer Inst. 88: 1442-5 (1996); Butterfield *et al.*, Cancer Res. 59: 3134-42 (1999); Vissers *et al.*, Cancer Res. 59: 5554-9 (1999); van der Burg *et al.*, J Immunol 156: 3308-14 (1996); Tanaka *et al.*, Cancer Res. 57: 4465-8 (1997); Fujie *et al.*, Int. J. Cancer 80: 169-72 (1999); Kikuchi *et al.*, Int. J. Cancer 81: 459-66 (1999); Oiso *et al.*, Int. J. Cancer 81: 387-94 (1999)).

25 Además, pese a los avances logrados en el desarrollo de fármacos moleculares dirigidos como tratamientos antitumorales, los tipos de tumores que responden y la eficacia de los tratamientos aún siguen siendo muy limitadas. De ahí la urgencia para desarrollar nuevos agentes antitumorales que reconozcan y actúen contra moléculas altamente específicas de las células malignas cuyo riesgo de causar reacciones adversas sea mínimo o nulo. Existe, asimismo, la necesidad de descubrir factores que puedan servir como biomarcadores del cáncer en general y del cáncer de pulmón no microcítico en particular, con vistas a mejorar su diagnóstico, la valoración del pronóstico y la predicción del éxito del tratamiento.

### 30 Sumario de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

- 35 Específicamente, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia amino de SEQ ID NO: 1 (KVLEHVVRV) o una sal farmacéuticamente del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde dicho cáncer se selecciona de cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico.

40 La presente invención se refiere además a un receptor de linfocitos T, preferentemente un receptor de linfocitos T recombinante, soluble o unido a membrana que es reactivo con un ligando HLA, en donde dicho ligando consiste en el péptido de la presente invención, para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

45 La presente invención se refiere además a un anticuerpo, en particular, un anticuerpo soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido de la presente invención cuando se une a una molécula del MHC para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

50 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en el péptido de la presente invención, o el anticuerpo de la presente invención, un receptor de linfocitos T de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables adicionales para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde dicho cáncer se selecciona de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

55 La presente descripción desvela un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 24 o a una secuencia variante de la misma que es homóloga al menos en un 65 %, preferentemente al menos un 77 % y más preferentemente al menos en un 85 % (preferentemente idéntica al menos en un 75 % o al menos en un 85 %) a las SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 24, en que dicha variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no siendo dicho péptido el polipéptido entero del que derivaría.

60 También se desvela en el presente documento un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24 o una variante de la misma, que es homóloga en al menos un 65 %, preferentemente en al menos un 75 % y más preferentemente aún en al menos un 85 % (idéntica preferentemente en al menos un 75 % o al menos en un 85 %) a las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24, en que dicho péptido o variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente de entre 8 y 30 y más preferentemente aún de entre 8 y 14 aminoácidos, en que dicho péptido o variante se une a MHC y/o estimula linfocitos T que presentan reactividad

cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las siguientes tablas muestran péptidos de acuerdo con la presente descripción, así como sus respectivas SEQ ID NO.

5

Tabla 1: Péptidos de acuerdo con la presente descripción. La presente invención se refiere al péptido de SEQ ID NO: 1. Los péptidos de SEQ ID NO: 2 a 24 se desvelan en el presente documento por referencia solamente.

SEQ ID NO:	Secuencia
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVRL
3	KVLEHVRA
4	KVLEHVRI
5	KLLEHVVRV
6	KLLEHVRL
7	KLLEHVRA
8	KLLEHVRI
9	KALEHVVRV
10	KALEHVRL
11	KALEHVRA
12	KALEHVRI
13	YLLEHVVRV
14	YLLEHVRL
15	YLLEHVRA
16	YLLEHVRI
17	YALEHVVRV
18	YALEHVRL
19	YALEHVRA
20	YALEHVRI
21	YVLEHVVRV
22	YVLEHVRL
23	YVLEHVRA
24	YVLEHVRI

La presente descripción desvela variantes del péptido MAG-003 (SEQ ID NO: 1), que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la siguiente fórmula general I:



#### Fórmula I

15

en que  $X_1$  se selecciona entre los aminoácidos K e Y y  $X_2$  se selecciona entre los aminoácidos V, L y A y  $X_3$  se selecciona entre los aminoácidos V, L, A e I, en que dicho péptido se une a una molécula HLA de clase I o clase II y/o induce linfocitos T que reaccionan con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Como se desvela en el presente documento, dicho péptido no es el polipéptido entero subyacente.

20

El péptido de SEQ ID NO: 1 de la presente invención es para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

La presente descripción desvela, además, péptidos variantes de SEQ ID NO: 1 para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

Los péptidos –solos o en combinación– de acuerdo con la presente descripción se seleccionan del grupo consistente en las SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 24. Se desvelan en el presente documento péptidos –solos o en combinación– seleccionados del grupo consistente en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24 (véase la tabla 1) y sus usos en la inmunoterapia del cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago y preferentemente glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico.

35

Se desvelan en el presente documento péptidos variantes del péptido de SEQ ID NO: 1, que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o –en una forma más larga, como variante de longitud– a una molécula MHC de clase II.

5 Se desvelan en el presente documento péptidos variantes del péptido de SEQ ID NO: 1, en que dichos péptidos (cada uno) comprenden, consisten, o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 24.

10 Se desvelan en el presente documento péptidos, en que dichos péptidos están modificados y/o incluyen enlaces no peptídicos.

15 Se desvelan en el presente documento péptidos, en que dicho péptido es parte de una proteína de fusión, en particular fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II), o fusionado con (o integrado en la secuencia de) un anticuerpo, como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.

20 La presente descripción desvela un ácido nucleico que codifica los péptidos desvelados en el presente documento. La presente descripción desvela, además, el ácido nucleico que es DNA, cDNA, PNA, RNA o combinaciones de los anteriores.

La presente descripción desvela, además, un vector de expresión capaz de expresar y/o que expresa un ácido nucleico desvelado en el presente documento.

25 La presente descripción desvela, además, un péptido, un ácido nucleico o un vector de expresión para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer.

La presente descripción desvela, además, anticuerpos específicamente dirigidos contra los péptidos de la presente divulgación o contra complejos formados por dichos péptidos de acuerdo con la presente descripción con el MHC, así como métodos para fabricarlos.

30 La presente descripción desvela, además, una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión tal y como se ha descrito antes.

35 La presente descripción desvela, además, dicha célula hospedadora que es una célula presentadora de antígeno y preferiblemente es una célula dendrítica.

La presente descripción desvela, además, un método para producir un péptido descrito en el presente documento, el cual comprende el cultivo de la célula hospedadora desvelada en el presente documento y el aislamiento del péptido de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

40 La presente descripción desvela, además, el método, en que el antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I o II expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o de una célula presentadora de antígeno artificial mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

45 La presente descripción desvela, además, el método, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar y/o que expresa dicho péptido que contiene las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24, preferentemente que contiene las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24, o una variante de la secuencia de aminoácidos.

50 La presente descripción desvela, además, linfocitos T activados, producidos con el método desvelado en el presente documento, en que el linfocito T reconoce selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento.

55 La presente descripción desvela, además, un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento, comprendiendo el método la administración al paciente de un número efectivo de linfocitos T producidos como se describe en el presente documento.

60 También se desvela en el presente documento el uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquier péptido, del ácido nucleico, del vector de expresión, de la célula, del linfocito T activado, del receptor de linfocitos T o del anticuerpo o de otras moléculas que se unan al péptido o al complejo péptido-MHC como se describen en el presente documento. Dicho medicamento puede ser activo contra el cáncer.

65 Dicho medicamento puede estar destinado a servir como terapia celular, como vacuna o como proteína basada en un TCR soluble o un anticuerpo.

La presente descripción desvela, además, un uso como se describe en el presente documento, en que dichas células cancerosas son células de cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de células renales, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago y preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico.

También se desvelan en el presente documento biomarcadores basados en los péptidos descritos en el presente documento, también denominados «dianas», que pueden servir para el diagnóstico del cáncer, preferiblemente del cáncer de pulmón no microcítico. El marcador puede ser una sobrerepresentación del péptido o péptidos en cuestión, o la sobreexpresión del gen o genes correspondientes. Los marcadores también podrían servir para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferiblemente una inmunoterapia y más preferiblemente de una inmunoterapia dirigida contra la misma diana que es identificada con el biomarcador. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo o un TCR soluble para teñir cortes histológicos del tumor con el fin de detectar la presencia de un péptido de interés unido en complejo con un MHC. Opcionalmente el anticuerpo puede estar dotado de otra función efectora, como es un dominio inmunoestimulante o una toxina.

También se desvela en el presente documento el uso de esas novedosas dianas para la identificación de TCR que reconozcan al menos una de dichas dianas y preferentemente la identificación entre esos TCR de los que activen a los linfocitos T.

La presente descripción también desvela el uso de estas nuevas dianas en el contexto del tratamiento del cáncer.

La presente descripción desvela, además, el uso de los péptidos descritos en el presente documento para la producción de TCR, de subunidades sueltas de TCR (solas o combinadas) y de subdominios de las mismas, en particular de TCR solubles (sTCR) y TCR clonados, en que dichos TCR son insertados en linfocitos T autólogos o alogénicos y métodos para fabricarlos, así como otras células que sean portadoras de tales TCR o que reaccionen con tales TCR.

La presente invención se refiere, además, a una proteína de TCR, a subunidades sueltas de TCR (solas o combinadas) y subdominios de las mismas, en particular TCR solubles (sTCR) y TCR clonados que se unen a un complejo formado por KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A\*02 que comprende un dominio variable de la cadena alfa de TCR y un dominio variable de la cadena beta de TCR para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un TCR de la presente invención. La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena alfa de TCR, una cadena beta de TCR, o ambas, producido tal y como se describe en la presente descripción.

La presente descripción también desvela una célula hospedadora aislada que comprende un vector de expresión recombinante que expresa el ácido nucleico que codifica la cadena alfa de TCR, la cadena beta de TCR, o ambas.

También se desvela en el presente documento una célula hospedadora aislada que comprende un vector de expresión recombinante de la presente invención, preferentemente en el que la célula es un linfocito de sangre periférica (PBL).

También se desvela en el presente documento un PBL aislado que comprende el vector de expresión recombinante de la presente invención, en que el PBL es un linfocito T CD8+ o CD4+.

También se desvela en el presente documento una población de células que comprende al menos una célula hospedadora de la presente descripción.

La presente invención se refiere, además, a proteínas de TCR de la presente invención para el uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico. También se desvelan en el presente documento dichas proteínas de TCR para su uso en el tratamiento de cáncer de células renales, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

La estimulación de una respuesta inmune depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmune del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmune del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmune en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmune celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células



tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunes naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas del MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los linfocitos T citotóxicos restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas inducida por péptido, preferentemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2; la secreción de moléculas efectoras inducida por el péptido, preferentemente granzimas o perforinas; o la desgranulación.

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12 o más aminoácidos y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos de la descripción) pueden tener hasta 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aminoácidos de longitud.

Además, el término «péptido» incluye sales de una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como, por ejemplo, sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha de destacar que las sales de los péptidos conformes a la presente descripción difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

El término «péptido» incluye también «oligopéptido». El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial para la descripción, siempre que se mantengan el epítipo o epítipos correctos. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 15, aproximadamente.

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial para la descripción, siempre que se mantengan los epítipos correctos. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifique dicha molécula es «inmunogénico» (y por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente descripción), si es capaz de inducir una respuesta inmune. En el caso de la presente descripción, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmune y en el caso de la presente descripción, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, el oligopéptido y/o la proteína que es utilizado para generar anticuerpos o TCR específicos contra él.

Un «epítipo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que pueda ser reconocido por un linfocito T provisto de un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos y más habitualmente de 9 aminoácidos.

En el ser humano hay tres lugares genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A\*01, HLA-A\*02 y HLA-B\*07 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos lugares.

Tabla 2: Frecuencias de expresión F de HLA-A\*02 y HLA-A\*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori *et al.*, 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg  $F=1-(1-Gf)^2$ . Las combinaciones de A\*02 o A\*24 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock *et al.*, 2004).

<b>Alelo</b>	<b>Población</b>	<b>Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica</b>
<b>A*02</b>	Caucásica (América del Norte)	49,1 %
<b>A*02</b>	Afroamericana (América del Norte)	34,1 %
<b>A*02</b>	Asiático americana (América del Norte)	43,2 %
<b>A*02</b>	Latinoamericana (América del Norte)	48,3 %
<b>DR1</b>	Caucásica (América del Norte)	19,4 %
<b>DR2</b>	Caucásica (América del Norte)	28,2 %
<b>DR3</b>	Caucásica (América del Norte)	20,6 %
<b>DR4</b>	Caucásica (América del Norte)	30,7 %
<b>Alelo</b>	<b>Población</b>	<b>Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica</b>
<b>DR5</b>	Caucásica (América del Norte)	23,3 %
<b>DR6</b>	Caucásica (América del Norte)	26,7 %
<b>DR7</b>	Caucásica (América del Norte)	24,8 %
<b>DR8</b>	Caucásica (América del Norte)	5,7 %
<b>DR9</b>	Caucásica (América del Norte)	2,1 %
<b>DR1</b>	Afroamericana (América del Norte)	13,20 %
<b>DR2</b>	Afroamericana (América del Norte)	29,80 %
<b>DR3</b>	Afroamericana (América del Norte)	24,80 %
<b>DR4</b>	Afroamericana (América del Norte)	11,10 %
<b>DR5</b>	Afroamericana (América del Norte)	31,10 %
<b>DR6</b>	Afroamericana (América del Norte)	33,70 %
<b>DR7</b>	Afroamericana (América del Norte)	19,20 %
<b>DR8</b>	Afroamericana (América del Norte)	12,10 %
<b>DR9</b>	Afroamericana (América del Norte)	5,80 %
<b>DR1</b>	Asiático americana (América del Norte)	6,80 %
<b>DR2</b>	Asiático americana (América del Norte)	33,80 %
<b>DR3</b>	Asiático americana (América del Norte)	9,20 %
<b>DR4</b>	Asiático americana (América del Norte)	28,60 %
<b>DR5</b>	Asiático americana (América del Norte)	30,00 %
<b>DR6</b>	Asiático americana (América del Norte)	25,10 %
<b>DR7</b>	Asiático americana (América del Norte)	13,40 %
<b>DR8</b>	Asiático americana (América del Norte)	12,70 %
<b>DR9</b>	Asiático americana (América del Norte)	18,60 %
<b>DR1</b>	Latinoamericana (América del Norte)	15,30 %
<b>DR2</b>	Latinoamericana (América del Norte)	21,20 %
<b>DR3</b>	Latinoamericana (América del Norte)	15,20 %
<b>DR4</b>	Latinoamericana (América del Norte)	36,80 %
<b>DR5</b>	Latinoamericana (América del Norte)	20,00 %
<b>DR6</b>	Latinoamericana (América del Norte)	31,10 %
<b>DR7</b>	Latinoamericana (América del Norte)	20,20 %
<b>DR8</b>	Latinoamericana (América del Norte)	18,60 %
<b>DR9</b>	Latinoamericana (América del Norte)	2,10 %
<b>A*24</b>	Filipinas	65 %
<b>A*24</b>	Nenets de Rusia	61 %
<b>A*24:02</b>	Japón	59 %
<b>A*24</b>	Malasia	58 %
<b>A*24:02</b>	Filipinas	54 %
<b>A*24</b>	India	47 %
<b>A*24</b>	Corea del Sur	40 %
<b>A*24</b>	Sri Lanka	37 %

(continuación)

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24	China	32 %
A*24:02	India	29 %
A*24	Australia occidental	22 %
A*24	EE. UU.	22 %
A*24	Samara (Rusia)	20 %
A*24	América del Sur	20 %
A*24	Europa	18 %

El gen MAGEA4 es un miembro de la familia de genes MAGEA. Los miembros de esta familia codifican proteínas con una identidad de secuencia de entre el 50 % y el 80 % entre sí. Los promotores y los primeros exones de los genes MAGEA muestran una variabilidad considerable, lo cual apunta a que la existencia de esta familia de genes permite que se materialice la misma función bajo diferentes controles transcripcionales. Los genes MAGEA están agrupados en la región cromosómica Xq28. Han sido involucrados en ciertos trastornos hereditarios, como la disqueratosis congénita. De este gen se han hallado como mínimo cuatro variantes que codifican la misma proteína (facilitado por RefSeq, julio 2008).

La localización de MAGEA4 ha sido descrita como citoplasmática (Kim *et al.*, 2015). Con todo, la tinción de MAGEA4 también la ha detectado en los núcleos celulares, con una distribución diferencial entre el núcleo y el citoplasma en los tumores bien diferenciados con respecto a los menos diferenciados (Sarcevic *et al.*, 2003).

MAGEA4 es usado como un marcador de células germinales masculinas. No se expresa en los gonocitos, pero sí en las pre-espermatogonias y en las células germinales maduras (Mitchell *et al.*, 2014).

MAGEA4 es una proteína oncofetal o un antígeno de cáncer-testículo. No existen pruebas claras de que MAGEA4 ejerza un efecto oncopromotor directo. Un estudio plantea que la sobreexpresión de MAGEA4 promueve el crecimiento de queratinocitos bucales normales que se transforman espontáneamente al inhibir la parada del ciclo celular y la apoptosis (Bhan *et al.*, 2012). En cambio, otros informes apuntan a un efecto oncosupresor de MAGEA4 en condiciones *in vitro*, puesto que su sobreexpresión aumentó la apoptosis y la actividad de la caspasa 3, en tanto que su silenciamiento derivó en un descenso de la actividad de la caspasa 3 (Peikert *et al.*, 2006). Otros han comunicado que un fragmento C-terminal de MAGEA4 tiene actividad pro-apoptótica *in vitro* (Sakurai *et al.*, 2004) y que inhibe el crecimiento independiente de anclaje mediante su interacción con la oncoproteína gankirina (Nagao *et al.*, 2003).

Existen indicios esporádicos de un vínculo con la metástasis tumoral: La expresión de MAGEA4 ha sido asociada con la metástasis ganglionar en el carcinoma de células escamosas de esófago (Forghanifard *et al.*, 2011), con progresión a tumor mioinvasivo en el cáncer de vejiga urinaria (Bergeron *et al.*, 2009), así como con metástasis ganglionares en el cáncer vulvar (Bellati *et al.*, 2007).

No existen pruebas claras de que MAGEA4 esté vinculado con células indiferenciadas (*stem-like*) cancerosas. No obstante, se ha detectado la expresión de MAGEA4 en células de población secundaria de distintas líneas celulares tumorales, como de pulmón, colon o mama (Yamada *et al.*, 2013), así como en muestras tumorales de linfoma de Hodgkin (Shafer *et al.*, 2010). Además, se ha descrito a MAGEA4 en embriocitos indiferenciados humanos, así como en sus derivados diferenciados, las células de teratocarcinoma (Lifantseva *et al.*, 2011).

Sobreexpresión de MAGEA4 en el cáncer – se ha descrito la expresión de MAGEA4 en multitud de tipos de cáncer. Para más detalles sobre las entidades tumorales concretas, véanse los subapartados siguientes. Aquí se facilita algo más de información sobre los tipos de cáncer que no se abordan en un apartado específico más adelante.

En el melanoma primario se ha detectado la expresión de MAGEA4 mediante inmunohistoquímica en el 10-30 % de los tumores y hasta en el 44 % de las metástasis a distancia (Barrow *et al.*, 2006; Luftl *et al.*, 2004). Los melanomas primarios de las mucosas de cabeza y cuello mostraron una positividad de hasta el 60 % en la tinción de MAGEA4 (Prasad *et al.*, 2004).

En el cáncer de vejiga se ha observado a MAGEA4 en el 38 % de los tumores no mioinvasivos, el 48 % de los tumores mioinvasivos, el 65 % de los carcinomas *in situ* y el 73 % de las metástasis ganglionares (Bergeron *et al.*, 2009). Otro estudio describió la expresión de MAGEA4 en el cáncer vesical con frecuencias algo más bajas, con las frecuencias más altas en los carcinomas de células escamosas (25/55, 46 %) con respecto a los adenocarcinomas (4/15, 27 %), los carcinomas sarcomatoides (4/14, 29 %), microcíticos (5/20, 25 %) o transicionales (281/1.522, 19 %) (Kocher *et al.*, 2002). En el carcinoma urotelial se detectó la expresión de MAGEA4 mediante inmunohistoquímica en el 64 % y mediante RT-PCR en el 58 % de los casos (Sharma *et al.*, 2006). Se detectó a MAGEA4 mediante RT-PCR en el 40–60 % de una serie de muestras de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Cuffel *et al.*, 2011; Soga *et al.*, 2013). Se detectó la expresión de MAGEA4 en el 57 % de una serie de muestras de carcinoma de células escamosas oral (Montoro *et al.*, 2012; Ries *et al.*, 2005). No se detectó expresión de MAGEA4 mediante

inmunohistoquímica en ninguna de las 70 muestras de una serie de tumores tiroideos benignos y malignos (Melo *et al.*, 2011). Solo se detectó la expresión de MAGEA4 en el seminoma clásico pero no en tumores de células germinales testiculares no seminomatosos (Aubry *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2014). Se detectó la expresión de MAGEA4 en el 14 % (5/35) de una serie de tumores estromales gastrointestinales (Perez *et al.*, 2008).

5

En el meduloblastoma infantil se detectó mRNA de MAGEA4 en el 28 % (7/25), pero solo se observó inmunorreactividad en el 4 % de las muestras (1/25) (Oba-Shinjo *et al.*, 2008). Otro estudio halló una baja transcripción del mRNA de MAGEA4 en el 18 % (2/11) de una serie de meduloblastomas (Jacobs *et al.*, 2008).

10 Un estudio detectó la expresión de MAGEA4 en el 60 % de una serie de muestras de leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto (Nishikawa *et al.*, 2012) Otro informe describió unas frecuencias de expresión mucho más bajas en el 5 % (2/38) de una serie de muestras de linfomas no hodgkinianos y en el 20-30 % de linfomas de Hodgkin. En el caso del linfoma de Hodgkin, las células que quedaron más intensamente teñidas fueron las de Reed-Sternberg, mientras que las células circundantes no (Chambost *et al.*, 2000). No se ha detectado la expresión de MAGEA4 en 39 muestras de

15

Se detectó inmunorreactividad a MAGEA4 en el 33 % de una serie de muestras de carcinomas de células escamosas de cuello uterino (20/60) (Sarcevic *et al.*, 2003).

20 Con técnicas de inmunohistoquímica se detectó la expresión de MAGEA4 en el 12 % de una serie de adenocarcinomas endometrioides, en el 63 % de carcinomas serosos papilares de útero y en el 91 % de carcinosarcomas de útero. Dentro de la población tumoral, el grado de expresión de MAGEA4 resultó máximo en los carcinosarcomas (Resnick *et al.*, 2002).

25 La tinción de MAGEA4 detectada por inmunohistoquímica es heterogénea y solo una fracción de los tumores positivos expresa a MAGEA4 en más del 50 % de sus células tumorales (Resnick *et al.*, 2002; Sarcevic *et al.*, 2003).

En contraste con el gran número de estudios que describen la expresión de MAGEA4 en diversos tipos de cáncer, las pruebas referentes al vínculo de MAGEA4 con el desenlace y el pronóstico son más escasas. Con todo, algunos informes señalan una correlación de la expresión de MAGEA4 con parámetros clínicos. En el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello la expresión de MAGEA4 se ha correlacionado con una supervivencia total breve y ha resultado ser un indicador pronóstico independiente de un desenlace desfavorable (Cuffel *et al.*, 2011). En el cáncer vesical, la expresión de MAGEA4 se ha correlacionado con la recidiva y con la progresión a tumor mioinvasivo (Bergeron *et al.*, 2009) y la tinción intensa de MAGEA4 se ha vinculado con una supervivencia más breve (Kocher *et al.*, 2002). En los tumores estromales gastrointestinales, la expresión de MAGEA4 junto con la de otros antígenos de

30

Algunos informes que abarcan diversos tipos de cáncer aportan indicios de vínculos entre la expresión de MAGEA4 con los estadios tumorales avanzados: En el melanoma la expresión de MAGEA4 aumentó en paralelo con el estadio tumoral desde el 9 % en los tumores primarios hasta el 44 % en las metástasis a distancia (Barrow *et al.*, 2006). También en el cáncer vulvar la expresión de MAGEA4 resultó más frecuente en los tumores con metástasis ganglionares (Bellati *et al.*, 2007). Asimismo, la expresión de MAGEA4 apareció asociada con tumores de alto grado o un estadio avanzado en el carcinoma endometrial (Chitale *et al.*, 2005), carcinomas de células escamosas de cuello uterino (Sarcevic *et al.*, 2003) y cáncer vesical (Bergeron *et al.*, 2009; Kocher *et al.*, 2002).

40

MAGEA4 parece ser expresado por células tumorales, sin que haya indicios de que se exprese en células estromales, vasculares, inmunes o en otras células asociadas a tumor. Además, también se ha detectado la expresión de MAGEA4 en líneas de células tumorales cultivadas, como son líneas de cáncer gástrico (Li *et al.*, 1997), líneas de carcinoma de esófago (Tanaka *et al.*, 1997), de carcinoma de páncreas (Kubuschok *et al.*, 2004) y de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Hartmann *et al.*, 2015).

50

Tabla 3: MAGEA4 como diana oncológica general

Propiedades del antígeno	Evaluación
Sobreexpresión en el [cáncer de interés] descrita en la bibliografía	
Sobreexpresión en otros tipos de cáncer descrita en la bibliografía	+
Se han descrito respuestas de linfocitos T contra dianas derivadas de la proteína originaria	+
Patrón de expresión oncofetal	+
Expresión por células madre cancerosas	(-)
Interviene en la progresión del ciclo celular y la proliferación de las células tumorales	(-)
Implicación en la invasión, la migración y la metástasis tumoral	
Vínculo con vías de señalización asociadas con el cáncer <sup>1</sup>	
Efectos anti-apoptóticos	(-)
Efectos pro-angiogénicos / Neovascularización	
Sobreexpresión vinculada a un pronóstico negativo del cáncer	+

(continuación)

Propiedades del antígeno	Evaluación
Sobreexpresión vinculada a estadios avanzados del cáncer	+
Diana del cáncer en general	
Localización en el interior de la célula <sup>2</sup>	CY
Caracterización de la proteína originaria en la bibliografía (-, +, ++, +++)	+
Asociación con el tipo de célula <sup>3</sup>	TU

<sup>1</sup> TGF = factor de crecimiento transformante; PI3K = fosfatidilinositol 3-cinasas; p53 = antígeno asociado a tumor celular p53; EGFR = receptor del factor de crecimiento epitelial; FGF2 = factor de crecimiento fibroblástico 2; Wnt = vía de Wnt / beta-catenina (embriogenia); Ras = protooncogén del sarcoma de rata; NF-kB = factor nuclear Kappa B (factor de transcripción eucariota) <sup>2</sup> CY = citoplasmático; <sup>3</sup> TU = células tumorales

- MAGEA4 como diana terapéutica - Diana de inmunoterapia (*vacunas, adyuvantes, CAR*) A veinte pacientes con cáncer avanzado de pulmón, estómago o esófago se les administró quincenalmente por vía subcutánea una vacuna de MAGEA4 que contenía 300 µg de la proteína, hasta un total de seis dosis. De los quince pacientes que acabaron un ciclo de vacunación, cuatro mostraron una respuesta humoral específica de MAGEA4 y gozaron de una supervivencia total más dilatada que los que no manifestaron dicha respuesta de anticuerpos. En tres pacientes se observaron respuestas de linfocitos T CD4 y en seis, respuestas de linfocitos T CD8; aquellos que experimentaron la inducción de linfocitos T CD8 que segregaron específicamente IFN-γ ante MAGEA4 vivieron más que los que no presentaron tal inducción, pero no así los que mostraron la inducción de linfocitos T CD4 (Saito *et al.*, 2014).
- Se conoce el caso clínico de un paciente con cáncer de colon y metástasis pulmonares que fue tratado con el péptido de fusión MAGE-A4-H/K-HELP (constituido por el epítipo de linfocito T cooperador MAGE-A4(278–299) fusionado con el epítipo de linfocito T citotóxico MAGE-A4(143–154) por medio de un conector de glicinas), acompañado de OK432 y Montanide. El tratamiento estimuló sendas respuestas inmunes por parte de linfocitos T citotóxicos y de linfocitos Th1 específicos contra MAGEA4, así como la secreción de IgG específicas contra MAGEA4. En el diagnóstico final se constató una disminución del crecimiento tumoral y un descenso del antígeno carcinoembrionario, que es un marcador tumoral (Takahashi *et al.*, 2012).
- Un ensayo clínico de fase I investigó la transferencia adoptiva de CTL autólogos modificados genéticamente para expresar TCR que reaccionaran ante el MAGEA4 (143-151) unido a HLA-A\*24:02 en pacientes con cáncer de esófago. A los pacientes se les administró una vez linfocitos transducidos con los TCR, sin tratamiento acondicionador previo y al cabo de 2 y 4 semanas recibieron sendas dosis de vacunas del péptido MAGEA4 por vía subcutánea. No se observó ninguna regresión objetiva del tumor, posiblemente debido a la falta de un tratamiento que eliminara los linfocitos preexistentes y la administración de IL-2 (Kageyama *et al.*, 2015). Estudios preclínicos en ratones han demostrado que los linfocitos T transferidos inhibieron el crecimiento de líneas de células tumorales que expresaban MAGEA4 y que habían sido inoculadas a esos roedores y que la vacunación adicional con el péptido reforzó esa actividad antitumoral (Shirakura *et al.*, 2012).
- Se ha propuesto actuar específicamente contra MAGEA4 con la transferencia adoptiva de CTL como opción de tratamiento contra el linfoma de Hodgkin y el linfoma no hodgkiniano negativos para el EBV. Se ha descrito que la administración de CTL que reconocen específicamente a péptidos derivados del EBV propicia casos de remisión completa en pacientes con linfoma positivo para dicho virus, EBV(+). Así pues, se está estudiando la posibilidad de usar otros antígenos a modo de dianas como opción de tratamiento, entre ellos MAGEA4 (Cruz *et al.*, 2011; Gerdemann *et al.*, 2011).
- Diversos estudios han demostrado la generación de linfocitos T CD4(+) específicos de MAGEA4 procedentes de donantes sanos y de pacientes con cáncer tras la incubación con células presentadoras de antígeno autólogas estimuladas con conjuntos de péptidos traslapados (Cesson *et al.*, 2011; Gerdemann *et al.*, 2011; Ohkuri *et al.*, 2009).
- El péptido MAG-003, es decir, KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), es un epítipo de linfocito T citotóxico (CTL) restringido a HLA-A\*0201 derivado de MAGEA4 (aminoácidos 286 a 294) (Jia *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011). En un aspecto, MAG-003 activa CTL específicos del péptido tanto en condiciones *in vitro* a través de PBMC positivas para el alelo HLA-A\*0201, como en condiciones *in vivo* en ratones transgénicos HLA-A\*0201/Kb. En otro aspecto, los CTL inducidos lisan células diana de un modo restringido al alelo HLA-A\*0201, lo cual demuestra que MAG-003 es un epítipo de CTL restringido a HLA-A\*0201 y que sirve como diana para la vacunación antitumoral con fines terapéuticos (Jia *et al.* 2010).
- Además, la rutina SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1997; Rammensee *et al.*, 1999) predice la unión de MAG-003 a A\*02:01 con una puntuación absoluta de 25 y una puntuación relativa de 0,69. Los presentes inventores confirman que el 100 % de las identificaciones corresponden a la unión de MAG-003 a muestras A\*02-positivas.

Tabla 4: Presentación del péptido MAG-003 en tejidos sanos y cancerosos.

<b>A*02</b>	<b>Muestras</b>	<b>Intensidad media</b>	<b>Puntuación j</b>
Normal	0 de 245	---	---
Cáncer	14 de 397	1,1e+07	0,000
HCC (carcinoma hepatocelular)	1 de 16	2,9e+06	0,000
MEL (melanoma)	0 de 3	0,0e+00	
OC (cáncer de ovario)	2 de 20	4,0e+07	0,000
pNSCLC (proteínas de cáncer de pulmón no microcítico)	11 de 91	1,0e+07	0,000

La sobrerepresentación o la presentación específica de TAA en las células tumorales con respecto a las células normales es suficiente para que sea de utilidad en la inmunoterapia y algunos péptidos son específicos de tumor, aunque la proteína de la que proceden esté presente también en los tejidos normales. Además, la obtención de los perfiles de expresión del mRNA añade otro nivel de seguridad a la selección de las dianas peptídicas para la inmunoterapia. Concretamente para las opciones terapéuticas sujetas a un alto riesgo de seguridad, como los TCR madurados por afinidad, el péptido diana ideal será todo aquel derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no se halle en los tejidos normales.

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas del modo antes indicado tras obtener el consentimiento informado por escrito de cada paciente. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El RNA total se preparó a partir de estas muestras con TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis de la expresión génica de las muestras de RNA tumorales y del tejido normal fue llevado a cabo mediante secuenciación de última generación (RNAseq) por CeGaT (Tubinga, Alemania). En suma, se prepararon bibliotecas de secuenciación con el kit de reactivos HiSeq v4 de Illumina siguiendo el protocolo del proveedor (Illumina Inc, San Diego, CA, EE. UU.), que incluye la fragmentación del RNA, su conversión en cDNA y la adición de los adaptadores de secuenciación. Las bibliotecas derivadas de múltiples muestras se mezclaron en partes equimolares y se secuenciaron con el secuenciador Illumina HiSeq 2500 siguiendo las instrucciones del fabricante, generando lecturas únicas (*single end reads*) de 50 pb. Las lecturas procesadas se cartografiaron con respecto al genoma humano (GRCh38) con el software STAR. Se ofrecen los datos de expresión a nivel de transcrito en forma de RPKM (lecturas por kilobase por cada millón de lecturas cartografiadas, generadas con el software Cufflinks) y a nivel de exón (lecturas totales, generadas con el software Bedtools), basadas en anotaciones de la base de datos de secuencias ensambl (Ensembl77). Las lecturas de exón están normalizadas para la longitud del exón y el tamaño de alineación para obtener los valores de RPKM.

Las tablas 5 a 7 muestran los datos de RNASeq (puntuaciones de expresión) correspondientes a la expresión de MAG-003 en diversos tipos de cáncer

Tabla 5: Puntuación de RNASeq 1

<b>Tipo de tumor</b>	<b>tgScore</b>	<b>exonScore (27242)</b>	<b>exonScore (317034)</b>	<b>exonScore (593984)</b>
Cáncer mama	1,57	1,23	1,23	1,51
Cáncer colorrectal	1,65	1,00	1,00	1,76
Carcinoma hepatocelular	12,10	11,98	11,97	6,15
Cáncer de ovario	56,60	18,45	18,44	57,74
Carcinoma de células escamosas de esófago	58,42	3,49	3,49	60,40
Cáncer de páncreas	12,10	10,78	10,77	4,74
Glioblastoma (pGB)	0,88	0,95	0,95	0,74
Cáncer de pulmón no microcítico (pNSCLC)	100,83	1,52	1,52	98,57
Carcinoma de células renales	0,93	0,95	0,95	0,77
Cáncer de pulmón microcítico	56,41	28,32	28,30	152,27

Tabla 6: Puntuación de RNASeq 3

<b>Tipo de tumor</b>	<b>tgScore</b>	<b>exonScore (27242)</b>	<b>exonScore (317034)</b>	<b>exonScore (593984)</b>
Cáncer de mama	7,48	5,11	5,11	6,01
Cáncer colorrectal	8,35	1,05	1,05	7,90
Carcinoma hepatocelular	123,03	210,33	210,30	42,22
Cáncer de ovario	612,59	333,74	333,69	447,29
Carcinoma de células escamosas de esófago	632,95	47,41	47,40	468,45
Cáncer de páncreas	122,95	187,07	187,05	31,15

(continuación)

Tipo de tumor	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
Glioblastoma (pGB)	0,31	0,18	0,18	0,25
Cáncer de pulmón no microcítico (pNSCLC)	1100,05	10,26	10,25	768,23
Carcinoma de células renales	0,78	0,18	0,18	0,43
Cáncer de pulmón microcítico	611,00	524,23	524,17	1190,36

Tabla 7: Expresión del tumor

Tipo de tumor	tg-tumor40	Exontumor40 (27242)	Exontumor40 (317034)	Exontumor40 (593984)
Cáncer de mama	0,12	0,04	0,04	0,17
Cáncer colorrectal	0,14	0,01	0,01	0,22
Carcinoma hepato-celular	2,05	1,82	1,82	1,18
Cáncer de ovario	11,19	3,16	3,16	13,72
Carcinoma de células escamosas de esófago	10,89	0,42	0,42	13,11
Cáncer de páncreas	2,09	1,65	1,65	0,89
Glioblastoma (pGB)	0,00	0,00	0,00	0,01
Cáncer de pulmón no microcítico (pNSCLC)	19,25	0,09	0,09	22,58
Carcinoma de células renales	0,01	0,00	0,00	0,01
Cáncer de pulmón microcítico	10,18	4,53	4,53	33,35

- 5 En contraste con el gran número de estudios que describen la expresión de MAGEA4 en diversos tipos de cáncer, las pruebas referentes al vínculo de MAGEA4 con el desenlace y el pronóstico son más escasas. Con todo, algunos informes señalan una correlación de la expresión de MAGEA4 con parámetros clínicos. En el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, la expresión de MAGEA4 se ha correlacionado con una supervivencia total breve y ha resultado ser un indicador pronóstico independiente de un desenlace desfavorable (Cuffel *et al.*, 2011). Se ha hallado una correlación inversa entre la expresión de MAGEA4 y la supervivencia del paciente en los tumores de pulmón no microcíticos avanzados (Yoshida *et al.*, 2006; Shigematsu *et al.*, 2010) y en el cáncer de ovario (Yakirevich *et al.*, 2003). En el cáncer vesical, la expresión de MAGEA4 se ha correlacionado con la recidiva y con la progresión a tumor mioinvasivo (Bergeron *et al.*, 2009) y la tinción intensa de MAGEA4 se ha vinculado con una supervivencia más breve. En los tumores estromales gastrointestinales, la expresión de MAGEA4 junto con la de otros antígenos de cáncer-testículo se ha correlacionado con la recidiva (Perez *et al.*, 2008) y también en el cáncer vulvar, MAGEA4 se detectó con más frecuencia en los tumores recidivantes (Bellati *et al.*, 2007).

- 20 En el estudio *Cancer Genome Atlas* (TCGA) de los tumores serosos de ovario de alto grado, la expresión de MAGEA8 inferior a la mediana se asoció con un aumento de 11,4 meses en la supervivencia sin progresión, lo que lo convierte en el efecto verificable más potente. La expresión profusa de MAGEA8 apareció asociada con una supervivencia sin progresión más desfavorable en pacientes con tumores en los que abunda el CD3, lo cual podría apuntar hacia un papel inmunodepresor de MAGEA8 como vía de activación de los linfocitos T reguladores inmunodepresores (Eng *et al.*, 2015).

- 25 Se distinguieron sendos grupos de alto y bajo riesgo en pacientes con cáncer de colon a partir de ocho biomarcadores (ZBTB32, OR51B4, CCL8, TMEFF2, SALL3, GPSM1, MAGEA8 y SALL1), que sirvieron como referencia para el tratamiento individualizado (Zhang *et al.*, 2015).

- 30 En experimentos con líneas celulares de carcinomas de células escamosas humanos se ha atribuido a MAGEA5 y A8 el papel de predictores negativos del tratamiento anti-EGFR con panitumumab (Hartmann *et al.*, 2014).

- 35 Algunos informes que abarcan diversos tipos de cáncer aportan indicios de vínculos entre la expresión de MAGEA4 con los estadios tumorales avanzados: En el melanoma maligno, la expresión de MAGEA4 aumentó en paralelo con el estadio tumoral desde el 9 % en los tumores primarios hasta el 44 % en las metástasis a distancia (Barrow *et al.*, 2006). También en el cáncer vulvar, la expresión de MAGEA4 resultó más frecuente en los tumores con metástasis ganglionares (Bellati *et al.*, 2007). Asimismo, la expresión de MAGEA4 apareció asociada con tumores de alto grado o un estadio avanzado en el carcinoma endometrial (Chitale *et al.*, 2005), carcinomas de células escamosas de cuello

uterino (Sarcevic *et al.*, 2003) y cáncer vesical (Bergeron *et al.*, 2009; Kocher *et al.*, 2002).

Como se usa en el presente documento, el término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente los segmentos de DNA que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas se ensamblan con fragmentos de cDNA y oligonucleótidos cortos de enlace, o con una serie de oligonucleótidos, que dan como resultado un gen sintético capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores procedentes de un operón microbiano o vírico.

Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «un nucleótido que codifica un péptido» se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido y que incluye codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y terminación compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia va a ser expresada, por ejemplo, por una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «un nucleótido que codifica una proteína de TCR» se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el TCR y que incluye codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y terminación compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia va a ser expresada, por ejemplo, con un linfocito T u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye tanto el ácido nucleico monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, en lo que concierne por ejemplo al DNA, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al DNA monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (DNA bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia.

El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado («normal»), mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de DNA, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de DNA.

El término «producto de expresión» define el polipéptido o la proteína que es el producto natural de la traducción del gen y cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y por tanto, que codifican el mismo aminoácido o aminoácidos.

El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia de codificación, define una porción de DNA que no comprende la región codificante entera, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante entera.

El término «segmento de DNA» hace referencia a un polímero de DNA, en forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de DNA mayor, que deriva de DNA aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, exento de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de DNA no traducidas pueden estar presentes corriente abajo desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término «cebador» define una secuencia corta de ácidos nucleicos que puede aparearse con una cadena de DNA y que proporciona un extremo 3'-OH libre en el que una polimerasa de DNA puede comenzar la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

El término «promotor» define una región de DNA implicada en la unión de la polimerasa de RNA para iniciar la transcripción.

El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si es separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. En un aspecto, tales polinucleótidos forman parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos forman parte de una composición y siguen estando aislados en el sentido de que dicho vector o composición puesto no forma parte de su entorno natural.



Los polinucleótidos y los polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, descritos en el presente documento también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de cDNA se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se desvela en el presente documento la purificación del material de inicio o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; o dos o tres órdenes de magnitud o incluso cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999 %, o, al menos, del 99,99 % o el 99,9 %; y más convenientemente, del 99 % por peso o mayor.

Los ácidos nucleicos y los productos de expresión polipeptídicos dados a conocer conformes a la presente descripción, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01 % por peso, y preferiblemente, aproximadamente de 0,1 % al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % y 20 % en peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente descripción pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada. El término «fragmento activo» define un fragmento, normalmente un péptido, polipéptido o secuencia de ácidos nucleicos, que genera una respuesta inmune (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado o en un vector– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmune adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

Como se usa en el presente documento, el término «porcentaje de identidad» o «porcentaje idéntico», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). El porcentaje de identidad se determina entonces con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de identidad} = 100 [1 - (C/R)]$$

donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde

- (i) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
- (ii) cada hueco (*gap*) de la secuencia de referencia y
- (iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y
- (iv) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que el porcentaje de identidad, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una porcentaje de identidad mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda el porcentaje de identidad mínima especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que el porcentaje de identidad calculada arriba resulte menor que el porcentaje de identidad especificada.

Tal y como se menciona antes, la presente descripción proporciona un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para su uso en un método de tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico. Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o a las versiones alargadas de dichos péptidos a una de clase II.

Como se usa en el presente documento, el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes porcentaje de identidad) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir: secuencias peptídicas o

polipeptídicas. La antes mencionada «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas.

5

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Appay *et al.*, 2006; Colombetti *et al.*, 2006; Fong *et al.*, 2001; Zaremba *et al.*, 1997).

10 Por «variante» de la secuencia de aminoácidos se entiende que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo, sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interactuar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A\*02 o -DR y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de linfocitos T activados. De modo similar, una proteína de TCR se puede modificar para que mejore, o al menos mantenga, la capacidad para interactuar y unirse a un complejo formado por una molécula MHC adecuada/KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), como HLA-A\*02 o -DR y de un modo que mejore, o al menos mantenga, la capacidad para activar linfocitos T.

20

Estos linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar aquellas que expresen un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín, como la KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1), tal y como se define en los aspectos de la descripción. Como se puede deducir de la bibliografía (Rammensee *et al.*, 1999; Godkin *et al.*, 1997) y de las bases de datos científicas, ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Así pues, una persona versada en la técnica será capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 24, manteniendo los residuos de anclaje conocidos y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a los complejos formados por moléculas MHC de clase I o II con KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Las variantes desveladas en el presente documento conservan la capacidad de unirse a complejos formados por moléculas MHC de clase I o II con el KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1). Los linfocitos T que expresen las variantes podrán destruir subsiguientemente las células que expresen un polipéptido que contenga la secuencia natural de aminoácidos del péptido afín, como el KVLEHVVRV (SEQ ID NO: 1).

25

30

Los péptidos originales (sin modificar) o las proteínas de TCR que se describen aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Preferentemente tales sustituciones estarían situadas al final de la cadena de aminoácidos de dicho péptido. En las proteínas de TCR, preferentemente tales sustituciones están localizadas en los dominios variables de la cadena alfa y de la cadena beta del TCR. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, cuando un aminoácido es reemplazado por otro aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrofóbico que es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, el reemplazo de una leucina por una isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

40

45

Las sustituciones conservadoras se definen como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

50

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares pero diferenciado de alguna manera en el tamaño, como en el reemplazo de un residuo de isoleucina por alanina. Los reemplazos muy poco o nada conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por otro polar, o incluso por uno de carácter básico. Estas sustituciones «radicales» no se pueden descartar, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien pueden provocar efectos inesperados imposibles de predecir de otra forma a partir de principios químicos simples.

60

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antígenicos de la descripción y aun así, quedar englobados en la presente divulgación. Además, se pueden usar también otros aminoácidos no convencionales (distintos de los aminoácidos naturales que constituyen las proteínas)

65

con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

Si se descubre que las sustituciones en más de una posición resultan en un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más abajo, entonces las combinaciones de dichas sustituciones se probarán para determinar si las sustituciones combinadas provocan efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán hasta 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

Un péptido consistente esencialmente en la secuencia de aminoácidos indicada puede tener intercambiados uno o dos aminoácidos que no formen parte del anclaje (véase más adelante el motivo de anclaje) sin que la capacidad de unión a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o clase II cambie sustancialmente o resulte negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar. En otro caso, un péptido consistente esencialmente en la secuencia de aminoácidos indicada en la presente memoria puede tener cambiados uno o dos aminoácidos que no formen parte del anclaje (véase más adelante el motivo de anclaje) por sus pares conservadores (véase más adelante) sin que la capacidad de unión a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o clase II cambie sustancialmente o resulte negativamente afectada, en comparación con el péptido sin modificar.

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el receptor del linfocito T pueden ser modificados sustituyéndolos por otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no suprima la unión al MHC pertinente. Así pues, aparte de la condición indicada, un péptido desvelado en el presente documento puede ser cualquier péptido (en cuyo término los inventores incluyen oligopéptidos o polipéptidos), que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o una variante de las mismas tal y como se indican.

Tabla 9: Variantes de los péptidos de la invención

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 1 a 13	K	V	L	E	H	V	V	R	V
Variantes	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

También pueden ser adecuados péptidos más largos (alargados). Es posible que los epítomos de MHC de clase I, si bien normalmente el epítipo real son residuos que no afectan sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítipo real durante el procesamiento.

Los péptidos de la descripción se pueden alargar hasta cuatro aminoácidos, es decir, que se pueden añadir 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a cualquier extremo en cualquier combinación de entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, generados por el procesamiento peptídico a partir de péptidos más largos o de proteínas que incluyen el epítipo real. Por ejemplo, los residuos pueden flanquear entre 4:0 y 0:4. A continuación en la tabla 10 se exponen combinaciones de las elongaciones conformes a la descripción:

Tabla 10: Combinaciones de las elongaciones de los péptidos de la descripción

C-terminal	N-terminal
4	0
3	0 o 1
2	0 o 1 o 2
1	0 o 1 o 2 o 3
0	0 o 1 o 2 o 3 o 4
N-terminal	C-terminal
4	0
3	0 o 1
2	0 o 1 o 2
1	0 o 1 o 2 o 3
0	0 o 1 o 2 o 3 o 4

Los aminoácidos para la elongación/extensión pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro aminoácido. La elongación tiene por finalidad mejorar la estabilidad o la solubilidad de los péptidos.

5 Así pues, los epítomos de la presente invención son idénticos a los epítomos naturales que son específicos o están asociados al tumor. También se desvelan además en el presente documento epítomos que difieran como máximo en cuatro residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

10 Como alternativa, el péptido se alarga por uno o ambos lados más de 4 aminoácidos, o hasta una longitud total de hasta 30 aminoácidos. Esto puede dar como resultado péptidos que se unen a MHC de clase II. La unión a MHC de clase II se puede analizar con métodos conocidos en la materia.

15 En consecuencia, se desvelan en el presente documento péptidos y variantes de epítomos de MHC de clase I en los que el péptido o variante tienen una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30 y más preferiblemente entre 8 y 14, esto es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, que en el caso de los péptidos de unión de clase II también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.

20 Por supuesto, el péptido de acuerdo con la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I. La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC se puede analizar con métodos conocidos en la técnica.

25 Cuando los linfocitos T específicos para un péptido desvelado en el presente documento se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, o como máximo de alrededor de 1  $\mu$ M, o como máximo de alrededor de 1 nM o como máximo de alrededor de 100 pM o como máximo de alrededor de 10 pM. En otro caso el péptido sustituido sea reconocido por los linfocitos T de más de un individuo, de al menos dos o incluso tres individuos.

30 La potenciación de la afinidad de los TCR específicos de tumor y su aprovechamiento, depende de la existencia de una franja de afinidades óptimas de tales receptores. La existencia de tal franja se basa en las observaciones de que los TCR específicos para patógenos restringidos a HLA-A2 presentan valores de KD que en general son unas 10 veces menores que los TCR específicos para los autoantígenos asociados a tumor restringidos a HLA-A2 (Aleksic *et al.* 2012; Kunert *et al.* 2013). Ahora sabemos que a pesar de que los antígenos asociados a tumor tienen el potencial de ser inmunogénicos, puesto que los tumores se originan a partir de las propias células del individuo, solo las proteínas mutadas o las proteínas con un procesamiento traduccional alterado serán detectadas como extrañas por el sistema inmune. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (llamados autoantígenos) no inducen necesariamente una respuesta inmune funcional contra el tumor: Los linfocitos T que expresen TCR que sean altamente reactivos contra dichos antígenos serán seleccionados negativamente en el timo en un proceso conocido como tolerancia central (Xing *et al.* 2012; Ruella *et al.* 2014; Sharpe *et al.* 2015), lo que significa que solo pervivirán los linfocitos T cuyos TCR presenten una baja afinidad hacia los autoantígenos. Así pues, la afinidad de los TCR o de las variantes de la presente invención hacia la MAG-003 puede ser potenciada mediante métodos bien conocidos en la técnica como los descritos a continuación.

45 Una «composición farmacéutica» es una composición apta para la administración a un ser humano en un contexto médico. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se fabrica de acuerdo con las directrices de buenas prácticas de fabricación.

50 Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos o las proteínas de TCR en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo  $-NH_2$  neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se realiza empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

65 La presente invención se refiere a un péptido no natural, en que dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 y ha sido producido sintéticamente (por ejemplo sintetizado) como una sal farmacéuticamente aceptable. Los métodos para la síntesis de péptidos son bien conocidos en la materia. Las sales de los péptidos conformes a la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en las condiciones *in vivo*. De la forma artificial

de sal del péptido depende su solubilidad, en particular en el contexto de composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos, como, por ejemplo, las vacunas peptídicas que se dan a conocer en la presente memoria. Para que los péptidos se puedan suministrar de modo eficaz al sujeto a tratar, es preciso que el péptido o péptidos tengan la suficiente solubilidad, por lo menos sustancial. Preferiblemente, las sales de los péptidos deben ser sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales conformes a la invención incluyen sales alcalinas y alcalinotérreas como las sales de la serie de Hofmeister que comprenden aniones como  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  y cationes como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ . En concreto, las sales se seleccionan entre las siguientes:  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Br}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{ClO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{I}$ ,  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ,  $\text{Rb}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Rb}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{RbH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ,  $\text{Rb}_4\text{Cl}$ ,  $\text{Rb}_4\text{Br}$ ,  $\text{Rb}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Rb}_4\text{ClO}_4$ ,  $\text{Rb}_4\text{I}$ ,  $\text{Rb}_4\text{SCN}$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KClO}_4$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{KSCN}$ ,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaBr}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{NaI}$ ,  $\text{NaSCN}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Cs}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Cs}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CsH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CsCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{CsBr}$ ,  $\text{CsNO}_3$ ,  $\text{CsClO}_4$ ,  $\text{CsI}$ ,  $\text{CsSCN}$ ,  $\text{Li}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{LiH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{LiCH}_3\text{COO}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{LiBr}$ ,  $\text{LiNO}_3$ ,  $\text{LiClO}_4$ ,  $\text{LiI}$ ,  $\text{LiSCN}$ ,  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgBr}_2$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{MgI}_2$ ,  $\text{Mg}(\text{SCN})_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaBr}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{CaI}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{SCN})_2$ ,  $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ba}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{BaBr}_2$ ,  $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ,  $\text{BaI}_2$  y  $\text{Ba}(\text{SCN})_2$ . En particular se prefieren el NH acetato,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$  y  $\text{CaCl}_2$ , como, por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato).

En una modalidad especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos o las proteínas de TCR en forma de sales de ácido acético (acetatos), trifluoroacetatos o ácido clorhídrico (cloruros).

Otro aspecto más de la descripción proporciona un ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido) que codifica un péptido y una proteína de TCR y variantes de TCR de la descripción. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, DNA, cDNA, PNA, RNA o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como, por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la descripción proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con la descripción.

Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos, especialmente DNA, a vectores, por ejemplo, a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de DNA se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros complementarios para insertarlo en el vector de DNA. El vector y el segmento de DNA se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de DNA recombinante.

Otro método alternativo para unir el segmento de DNA a los vectores son los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen ligadores sintéticos comerciales que contienen diversas dianas para las endonucleasas de restricción que facilitan varios proveedores como International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE.UU.

Un método deseable para modificar el DNA que codifica el polipéptido de la descripción se sirve de la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK y cols. (Saiki *et al.*, 1988). Este método puede ser utilizado para introducir el DNA en un vector adecuado, por ejemplo, diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el DNA de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El DNA (o RNA en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la descripción. Así pues, el DNA que codifica el péptido o variante de la descripción puede ser utilizado de acuerdo con técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la descripción. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes de EE.UU. NO. 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648.

El DNA (o RNA en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la descripción se puede unir con una amplia variedad de secuencias distintas de DNA para introducirlo en un hospedador adecuado. El DNA acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el DNA en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el DNA se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el DNA se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de DNA con los elementos de control

necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como por ejemplo de resistencia a antibióticos.

Otra alternativa consiste en incorporar el gen de ese rasgo seleccionable en otro vector con el que se cotransforma la célula hospedadora.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el DNA recombinante de la descripción se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas reveladas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y finalmente, ser recuperado.

Son muchos los sistemas de expresión conocidos, como bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), hongos filamentosos (género *Aspergillus*, etc.), células vegetales, animales o de insectos. Preferiblemente el sistema consistirá en células de mamífero, como las células CHO disponibles de la ATCC Cell Biology Collection.

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (Ylp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo, de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción y marcaje de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En líneas celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del DNA en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la b-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos anti-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

Se desvelan en el presente documento dos o más péptidos o variantes peptídicas de la descripción que se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos o las variantes peptídicas se pueden enlazar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como por ejemplo LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer y podrían inducir respuestas inmunes en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

Se desvela también en el presente documento una célula hospedadora transformada con un constructor de vector polinucleotídico de la presente descripción. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, Maryland, EE.UU. y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, Maryland, EE.UU. (NO. ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como líneas celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence «Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols», Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9 y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de DNA de la presente descripción se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo que concierne a la transformación de las células hospedadoras procariotas, véase, por ejemplo, Cohen y cols. (Cohen *et al.*, 1972) y

(Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman *et al.* (Sherman *et al.*, 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o la transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan un constructo de DNA de la presente descripción, se pueden identificar con técnicas bien conocidas como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la descripción son útiles para la preparación de péptidos de la descripción, por ejemplo, las células bacterianas, de levadura e insecto. Con todo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar células presentadoras de antígeno como las células dendríticas para expresar los péptidos de la descripción de tal forma que puedan ser cargados en las moléculas MHC oportunas. Así pues, la presente descripción proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la descripción.

En algunos casos la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene ácido prostático fosfatasa (PAP) fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA) el 29 de abril de 2010 para tratar el cáncer de próstata hormonorrefractorio metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2006).

Se desvela también en el presente documento Otro aspecto más de la descripción proporciona un método para la producción de un péptido o de su variante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra modalidad las proteínas de TCR, el ácido nucleico o el vector de expresión de la descripción se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los ejemplos de métodos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los ejemplos de métodos para la inyección del DNA incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o DNA de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o DNA. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter *et al.*, 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser DNA, cDNA, PNA, RNA o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se ofrece una visión general en, por ejemplo, Teufel *et al.* (Teufel *et al.*, 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmune no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de DNA y/o RNA viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus de vacuna, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de DNA. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo, con un epítipo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto, tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la descripción también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmune (por ejemplo respuestas inmunes mediadas por linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (Th) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente descripción. Entre los adyuvantes adecuados figuran, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribi, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (por ejemplo MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel, 1995). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (por ejemplo el TNF-), como parte de un

proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras de antígeno de los linfocitos T (por ejemplo GM-CSF, IL-1 e IL-4) (patente de EE.UU. no. 5.849.589) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (por ejemplo la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich *et al.*, 1996).

5 También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmune innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia  
10 gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes de vacunas como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad  
15 adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmune y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. no. 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmune específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente descripción es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se  
20 pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como RNA que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, ldera), análogos de dsRNA como poli(I:C) y derivados de los mismos (por ejemplo, AmpliGen®, Hiltonol®, poli-ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), RNA o DNA bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas  
30 como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmune (por ejemplo, anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente descripción pueden ser determinadas  
35 fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, oligonucleótidos CpG y derivados, poli(I:C) y derivados, RNA, sildenafil y formulaciones de partículas con PLG o virosomas.

40 En una modalidad preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la descripción el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón-alfa.

45 En una modalidad preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la descripción el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod y resiquimod. En una modalidad preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la descripción, el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod. Los adyuvantes más preferidos son: Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y AcM anti-CD40 o combinaciones de los anteriores.

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede  
55 contener excipientes, tales como amortiguadores, aglutinantes, dispersantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000). La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

Es importante tener presente que la respuesta inmune desencadenada por la vacuna de acuerdo con la descripción ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además, se atacan diferentes vías de señalización relacionadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solo van dirigidas contra una o pocas dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores expresan el mismo patrón de antígenos, por lo que la combinación de varios  
65



péptidos asociados a tumor asegura que el tumor en cuestión contenga al menos alguna de las dianas. La composición ha sido diseñada de modo tal que se espera que exprese varios de los antígenos y abarque varias vías independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. Así pues, la vacuna puede ser utilizada con facilidad sin atender a las indicaciones recogidas en la ficha técnica (*off-the-shelf*) para una población de pacientes más amplia.

5 Esto significa que no será preciso ninguna otra evaluación de biomarcadores de la expresión de los antígenos aparte del tipado del HLA para seleccionar a los pacientes que acabarán siendo tratados con la vacuna, pero que, aun así, está asegurado que la respuesta inmune estimulada atacará simultáneamente a varias dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2012).

10 Tal y como se emplea en la presente memoria, el término «soporte» se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (por ejemplo antigénico). En una modalidad, un soporte es capaz de dirigir la entidad a la que se ha unido (por ejemplo una (segunda) porción unida a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o de estroma tumoral portador del determinante antigénico (por ejemplo el complejo formado por un péptido con el MHC, de acuerdo con la presente solicitud). En otra modalidad un soporte es capaz de activar la señalización mediante su antígeno diana, por ejemplo, un antígeno del complejo del receptor del linfocito T. Los soportes incluyen, entre otros, anticuerpos y fragmentos de los mismos, los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprenden una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y otra región variable de la cadena ligera del anticuerpo, proteínas de unión que comprenden al menos un motivo repetido de anquirina y moléculas con un solo dominio de unión a antígeno (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células (modificadas) como linfocitos T alógenos o autólogos. Para evaluar si una molécula es un soporte que se une a una diana, se pueden efectuar ensayos de unión.

Unión «específica» significa que el soporte se une al complejo péptido-MHC de interés mejor que otros complejos de péptido-MHC naturales, hasta el punto de que un soporte dotado de una molécula activa que es capaz de matar una célula portadora de la diana específica no puede matar otra célula que carezca diana específica, aunque presente otro u otros complejos péptido-MHC. La unión a otros complejos péptido-MHC es irrelevante si el péptido del complejo péptido-MHC que reacciona de forma cruzada no es natural, es decir, no deriva del peptidoma-HLA humano. Las pruebas para evaluar la destrucción de las células diana son perfectamente conocidas en la materia. Deben realizarse con células diana (células primarias o líneas celulares) con una presentación intacta de péptido-MHC, o células cargadas con péptidos de tal modo que se alcancen los niveles de péptido-MHC naturales.

35 Cada soporte puede comprender un marcaje que permita detectarlo una vez unido mediante la determinación de la presencia o la ausencia de una señal generada por dicho marcaje. Por ejemplo, el soporte puede ser marcado con un colorante fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular adecuada. Tales moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, en el caso del marcaje por fluorescencia, como el facilitado por un colorante fluorescente, la visualización del aptámero unido se puede lograr mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser o por citometría de flujo.

40 Cada soporte se puede conjugar con una segunda molécula activa, como por ejemplo IL-21, anti-CD3 o anti-CD28.

Para más información sobre los soportes polipeptídicos véase, por ejemplo, el apartado de información general de WO 2014/071978A1 y las referencias citadas en la misma.

45 También se desvelan en el presente documento aptámeros. Los aptámeros (véase, por ejemplo, WO 2014/191359 y la bibliografía citada en ella) son moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios cortas, que se pueden plegar hasta adoptar estructuras tridimensionales definidas y que reconocen estructuras diana específicas. Parecen ser alternativas adecuadas para el desarrollo de terapias dirigidas. Los aptámeros han demostrado su unión selectiva a una gama de dianas complejas con elevada afinidad y especificidad.

50 En la pasada década han sido descubiertos aptámeros que reconocen moléculas situadas en la superficie celular que constituyen un medio para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas. La toxicidad y la inmunogenicidad de los aptámeros es, hasta donde se sabe, prácticamente nula, por lo que son candidatos prometedores a aplicaciones biomédicas. Y son aptámeros, por ejemplo, aptámeros que reconocen el antígeno de membrana específico de la próstata, los que han sido empleados con éxito en terapias dirigidas y han demostrado su funcionalidad en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Además, se han descubierto aptámeros que reconocen líneas de células tumorales específicas.

60 Es posible seleccionar aptámeros de DNA para desvelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas y particularmente las derivadas de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros descubiertos reconocieran no solo un subtipo de tumor concreto, sino que interaccionaran con una serie de tumores, se convertirían en una herramienta aplicable para el diagnóstico y la terapéutica de amplio espectro.

Además, las investigaciones de su unión a células mediante la citometría de flujo han demostrado que los aptámeros presentan una excelente afinidad aparente en la escala nanomolar.

65 Los aptámeros resultan útiles para fines diagnósticos y terapéuticos. En un aspecto, al menos uno o más aptámeros

son captados por las células tumorales y pueden actuar así como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes antineoplásicos como siRNA en las células tumorales.

5 Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos de los péptidos de acuerdo con la presente descripción con la molécula de MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

10 Los péptidos de la presente descripción pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos.

15 Por tanto, se desvela en el presente documento también un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que está formando un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunización de un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II con una forma soluble de una molécula MHC de clase I o II unida a dicho antígeno restringido por HLA; aislamiento de moléculas de mRNA a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de mRNA; y el aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo que se une específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II unido con dicho antígeno restringido a HLA.

25 Existe otro aspecto más de la invención que proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA de SEQ ID NO: 1, en el que el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

30 En WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 y en publicaciones (Cohen *et al.*, 2003a; Cohen *et al.*, 2003b; Denkberg *et al.*, 2003) se dan a conocer métodos para producir tales anticuerpos y complejos mayores de histocompatibilidad de clase I monocatenarios, así como otras herramientas para la producción de tales anticuerpos.

35 Preferiblemente, el anticuerpo se une al complejo con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar, preferentemente a 10 nanomolar, lo cual se considera «específico» en el contexto de la presente descripción.

40 La presente invención se refiere a una proteína de TCR o a una variante o fragmento funcional de la misma que se une específicamente a MAG-003.

La presente descripción se refiere, además, a la proteína de TCR de acuerdo con la descripción, en que la proteína de TCR está modificada (químicamente) y/o incluye enlaces no peptídicos.

45 La presente descripción se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica las proteínas de TCR de acuerdo con la descripción, siempre que la proteína de TCR no sea la proteína humana completa (entera).

La presente descripción se refiere, además, al ácido nucleico de acuerdo con la descripción que es DNA, cDNA, PNA, RNA o combinaciones de los anteriores.

50 La presente descripción se refiere, además, a un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción.

55 La presente invención se refiere, además, a una proteína de TCR de acuerdo con la presente descripción, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la presente descripción para el uso en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico.

Se desvela en el presente documento una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la descripción o un vector de expresión de acuerdo con la descripción.

60 Además, se desvela en el presente documento la célula hospedadora de acuerdo con la presente descripción que es un linfocito T y preferiblemente un linfocito T CD8-positivo o un linfocito T CD4-positivo.

65 La presente descripción se refiere, además, a un método para producir una proteína de TCR de acuerdo con la presente descripción, el cual comprende: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A\*02 con monómeros de A2/MAG-003; la incubación de los PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE);

y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran afinidad mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

También se desvela en el presente documento un método para producir una proteína de TCR, el cual comprende: La incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A\*02 con monómeros de A2/p286-1Y2L; la incubación de los PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran afinidad mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

También se desvela en el presente documento un método para producir una proteína de TCR, el cual comprende la incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A\*02 con monómeros de A2/p286-1Y2L9L, incubación de los PBMC con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE) y el aislamiento de los linfocitos T dotados de gran afinidad mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere, además, a un método para producir una proteína de TCR de acuerdo con la presente descripción, el cual comprende: la obtención de un ratón transgénico con los lugares enteros del gen TCR $\alpha\beta$  humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el MAG-003; la incubación de los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran afinidad mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

También se desvela en el presente documento un método para producir una proteína de TCR, el cual comprende: La obtención de un ratón transgénico con los lugares enteros del gen TCR $\alpha\beta$  humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el p286-1Y2L; la incubación de los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran afinidad mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

También se desvela en el presente documento un método para producir una proteína de TCR, el cual comprende: La obtención de un ratón transgénico con los lugares enteros del gen TCR $\alpha\beta$  humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresen un repertorio diverso de TCR humanos que compense la deficiencia de TCR murinos; la inmunización del ratón con el p286-1Y2L9L; la incubación de los PBMC obtenidos de los ratones transgénicos con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE); y el aislamiento de los linfocitos T con gran afinidad mediante el análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)-Calibur.

También se desvela en el presente documento un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante el MAG-003, método que comprende la administración al paciente de un número efectivo de linfocitos T.

También se desvela en el presente documento el uso de cualquier proteína de TCR descrita, un ácido nucleico de acuerdo con la presente descripción, un vector de expresión de acuerdo con la presente descripción, una célula de acuerdo con la presente descripción, o un linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la presente descripción como medicamento o en la fabricación de un medicamento. También se desvela un uso de acuerdo con la presente descripción en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención se refiere a un péptido, un TCR, un anticuerpo o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, para su uso en el tratamiento de NSCLC o SCLC. También se desvela en el presente documento el uso de acuerdo con la descripción, en que dichas células cancerosas son de tumores sólidos o hematológicos, como cáncer de células renales, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar y vías biliares y cáncer de esófago.

La presente descripción se refiere, además, a proteínas marcadoras y a biomarcadores concretos basados en los péptidos de acuerdo con la presente descripción, aquí denominados «dianas» que pueden ser utilizados para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer de pulmón no microcítico. La presente descripción también se refiere al uso de esas novedosas dianas para el tratamiento del cáncer.

El término «anticuerpo» o «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o «enteras», el término «anticuerpos» también incluye los fragmentos (por ejemplo fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las mismas, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (por ejemplo, unión específica de un polipéptido marcador del cáncer de pulmón no microcítico, liberación de una toxina en una célula de cáncer de pulmón no microcítico que exprese un gen marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del cáncer de pulmón no microcítico) de acuerdo con la descripción.

Si es posible, los anticuerpos de la descripción se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la

descripción también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la descripción se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores del cáncer de pulmón no microcítico enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la descripción se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural, o se puede producir con técnicas de DNA recombinante.

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para el uso previsto (por ejemplo ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con métodos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (por ejemplo ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con ensayo ELISA, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (no. pat. de EE.UU. 4.816.567).

Los anticuerpos monoclonales de la descripción se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de DNA recombinante, como los descritos en la pat. de EE.UU. no. 4.816.567. El DNA que codifica los anticuerpos monoclonales de la descripción puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (por ejemplo con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348 y en la pat. de EE. UU. no. 4.342.566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')<sub>2</sub> y un fragmento pFc'.

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, delecciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongoevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la descripción también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo de ratón) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos quiméricos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender

residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá casi todas de al menos uno y normalmente de dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, a un anticuerpo humanizado se le introducen uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo la o las secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (pat. EE.UU. no. 4.816.567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

Como se desvela en el presente documento, se pueden emplear animales transgénicos (por ejemplo ratones) que tras la inmunización sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes germinales provoca la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. También se pueden producir anticuerpos humanos en fagotecas.

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución oscile aproximadamente entre 5 y 8 y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, por ejemplo películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, al paciente o a las células mediante inyección (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, etc.), o con otros métodos como la infusión que aseguren su liberación efectiva en el torrente sanguíneo. Los anticuerpos también se pueden administrar por vía intratumoral o peritumoral para ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosis y pautas de administración más adecuadas se pueden determinar empíricamente; la toma de decisiones a este respecto forma parte de los conocimientos de la materia. Las personas versadas en la materia saben que la dosis de anticuerpos a administrar depende, por ejemplo, del sujeto que va a recibir el anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los antes mencionados factores. Tras la administración de un anticuerpo, preferiblemente como tratamiento contra el cáncer de pulmón no microcítico, la eficacia terapéutica del anticuerpo se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo, se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en el sujeto receptor del tratamiento utilizando técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Se desvela en el presente documento además un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconozca un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy *et al.*, 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter *et al.*, 2003; Card *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191) y dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. En otro aspecto, éste se expresa en linfocitos T usados para la transferencia adoptiva. Véanse, por ejemplo, WO 2004/033685A1, WO 2004/074322A1 y WO 2013/057586A1.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente descripción se pueden utilizar para confirmar el diagnóstico histopatológico de cáncer a partir de una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o los TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ ) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. Anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden unirse a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las antes mencionadas proteínas y el valor de afinidad (Kd) es inferior a  $1 \times 10 \mu\text{M}$ .

Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos ópticos. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica convencional, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopía, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra de tejido patológico puede ser reciente o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservador como el formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas.

A continuación, la presente invención pasará a ser descrita con los ejemplos siguientes, sin que con ello se quiera limitar el alcance de sus aplicaciones.

La figura 1 muestra la expresión exónica de MAG-003 en MAGEA4 (tejidos tumorales respecto a sanos, datos de RNASeq). La expresión exónica de MAG-003 en MAGEA4 en tejidos sanos se comparó con la de varios tumores sólidos (barras rojas). Los subtipos de tejidos sanos se agrupan en tejidos de riesgo alto (barras verdes oscuro), medio (barras verdes claro) y bajo (barras grises). Cada barra representa una sola muestra. Solo se halló una expresión elevada en tejidos normales en la placenta y el testículo (riesgo bajo). (RPKM = lecturas por kilobase por cada millón de lecturas cartografiadas)

La figura 2 muestra la expresión exónica de MAG-003 en MAGEA8 (tejidos tumorales respecto a sanos, datos de RNASeq). La expresión exónica de MAGEA08 en tejidos sanos se comparó con la de varios tumores sólidos (barras rojas). Los subtipos de tejidos sanos se agrupan en tejidos de riesgo alto (barras verdes oscuro), medio (barras verdes claro) y bajo (barras grises). Cada barra representa una sola muestra. Solo se halló una expresión elevada en tejidos normales en la placenta (riesgo bajo). (RPKM = lecturas por kilobase por cada millón de lecturas cartografiadas).

Las figuras 3 a 5 muestran la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD8+ sometidos a electroporación con RNA de las cadenas alfa y beta de TCR específicos de MAG-003 tras la incubación conjunta con células diana cargadas con el péptido MAG-003 (SEQ ID NO: 1) o con diversas variantes del MAG-003 con sustitución de alanina en las posiciones 1 a 9 de la SEQ ID NO: 1, tal y como se da a conocer en la presente descripción.

La figura 6 muestra la expresión de MAGEA4 de acuerdo con el ejemplo 7. El mRNA de MAGEA4 es detectable en las muestras de cáncer presentadas. El nivel de expresión abarca un intervalo de expresión considerable en las muestras de cáncer de cabeza y cuello y de cáncer de pulmón no microcítico (HNSCC062T1, HNSCC064T1 y NSCLC004T1) hasta una expresión bastante baja en las muestras de cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de ovario (NSCLC006T1 y OC036T1).

## Ejemplos

La utilización de las condiciones alorreactivas permite eludir la autotolerancia y obtener linfocitos T provistos de elevada afinidad en comparación con los linfocitos T derivados de «montajes» autólogos, esto es, de los propios pacientes. Ejemplos de tales condiciones incluyen la generación en condiciones *in vitro* de linfocitos T específicos de péptido y reactivos a HLA alogénicos (Sadovnikova *et al.* 1998; Savage *et al.* 2004; Wilde *et al.* 2012) y la inmunización de ratones transgénicos para moléculas de MHC humanas o TCR humanos (Stanislawski *et al.* 2001; Li *et al.* 2010).

### Ejemplo 1

Generación *in vitro* de linfocitos T específicos de péptido y reactivos a HLA alogénicos (Savage *et al.* 2004) Se emplearon PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A\*02, que concedieron su consentimiento informado. Se adquirieron monómeros HLA-A2 de clase I biotinilados y recombinantes y tetrámeros A2 fluorescentes que contenían el MAG-003 de MBLI (Woburn, MA, EE. UU.). Las PBMC se incubaron con anti-CD20SA diluido en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron con los monómeros A2/MAG-003 biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se sembraron a

razón de  $3 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 24 pocillos en RPMI con suero AB humano al 10 %. El primer día se añadió interleucina 7 a razón de 10 ng/ml (IL-7; R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) y el cuarto día IL-2 a razón de 10 U/ml (Chiron, Harefield, Reino Unido). Durante un período de 5 semanas a las células se las reestimuló semanalmente con PBMC recién extraídas, se mezclaron con células que habían respondido en una proporción 1:1 y se sembraron a razón de  $3 \times 10^6$ /pocillo en placas de 24 pocillos.

Para obtener los linfocitos T de gran afinidad, se incubaron unas  $10^6$  PBMC con el tetrámero HLA-A2/MAG-003 conjugado con ficoeritrina (PE) (obtenidas de MBL) durante 30 minutos a 37 °C y acto seguido con anticuerpo anti-CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)/alofococianina (APC) durante 20 minutos a 4 °C antes de proceder al análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS)—Calibur. La selección se efectuó con un citómetro de flujo FACS-Vantage (Becton Dickinson, Cowley, Oxford, Reino Unido). Las células tetrámero-positivas seleccionadas se expandieron en placas de 24 pocillos sembrando en cada pocillo  $2 \times 10^5$  células, acompañadas a modo de nodrizas por  $2 \times 10^6$  PBMC A2-negativas irradiadas, junto con  $2 \times 10^4$  microperlas de CD3/CD28 /ml (Dyna, Oslo, Noruega) e IL-2 (1000 U/ml). Los linfocitos T de gran afinidad así obtenidos se utilizaron a continuación para identificar y aislar los TCR y proceder a la determinación de las secuencias de aminoácidos/DNA y posterior clonación en vectores de expresión mediante métodos conocidos en la materia.

## Ejemplo 2

### Inmunización de ratones transgénicos con MHC humanos o TCR humanos

Con los péptidos MAG-003 se inmunizan a ratones transgénicos portadores de los lugares enteros de los genes TCR $\alpha\beta$  humanos (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensa la deficiencia en TCR murinos (Li *et al.* 2010). Para obtener los linfocitos T de gran afinidad, las PBMC obtenidas de los ratones transgénicos se incuban con tetrámeros marcados con ficoeritrina (PE) y a continuación, se procede a su selección del modo antes descrito. Los linfocitos T de gran afinidad así obtenidos se utilizaron a continuación para identificar y aislar los TCR y proceder a la determinación de las secuencias de aminoácidos/DNA y posterior clonación en vectores de expresión mediante métodos conocidos en la materia.

En un aspecto, MAG-003 y sus variantes, es decir, p286-1Y2L (portador de 2 sustituciones de aminoácido, SEQ ID NO: 2) y p286-1Y2L9L (portador de 3 sustituciones de aminoácidos, SEQ ID NO: 3) mostraron una potente afinidad y estabilidad de unión hacia la molécula HLA-A\*0201. En particular, p286-1Y2L9L mostró la capacidad de inducir CTL específicos que, en un aspecto, lisan las células cancerosas diana procedentes tanto de PBMC de donantes sanos como de ratones transgénicos HLA-A2.1/Kb. Véase por ejemplo (Wu *et al.* 2011).

Si se desean obtener TCR provistos de una gran afinidad hacia los complejos formados por MHC I o II con el p286-1Y2L o con el p286-1Y2L9L, estos péptidos se pueden usar en los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Los linfocitos T de gran afinidad así obtenidos sirven para identificar y aislar los TCR y proceder a la determinación de las secuencias de aminoácidos/DNA y posterior clonación en vectores de expresión mediante métodos conocidos en la materia.

Las variantes de los TCR provistas de alta afinidad también se pueden seleccionar a partir de una biblioteca de CDR mutantes introducida en levaduras, fagos o linfocitos T (Holler *et al.* 2003; Li *et al.* 2005; Chervin *et al.* 2008). Las variantes de TCR que sean candidatas brindan de ese modo orientación acerca de las mutaciones inducidas que es preciso conseguir en las CDR de los TCR para obtener las variantes de TCR de gran afinidad (Robbins *et al.* 2008; Zoete *et al.* 2007).

## Ejemplo 3: Clonación de los TCR

Los métodos para la clonación de TCR son conocidos en la disciplina, como, por ejemplo, los descritos en la patente de EE. UU. 8.519.100. Para amplificar la región variable de la cadena alfa se usan el oligonucleótido A1, que codifica la diana de restricción para NdeI, una metionina introducida para el inicio eficiente de la expresión en bacterias y el oligonucleótido A2, específico de la secuencia de la región constante de la cadena alfa, que codifica la diana de restricción para Sall. En el caso de la cadena beta, la región variable de la misma se amplifica mediante un oligonucleótido específico de la secuencia de la región variable de la cadena beta, que codifica la diana de restricción para NdeI, una metionina introducida para lograr el inicio eficiente de la expresión en bacterias y el oligonucleótido B2, específico de la secuencia de la región constante de la cadena beta, que codifica la diana de restricción para AgeI.

Las regiones variables de las cadenas alfa y beta se clonaron en plásmidos de expresión basados en el pGMT7 que contenían C $\alpha$  o C $\beta$  mediante métodos estándar descritos en *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, tercera edición, de Sambrook y Russell. Los plásmidos se secuenciaron con un analizador de DNA Applied Biosystems 3730x1.

Las secuencias de DNA codificantes de la cadena alfa del TCR cortadas con NdeI y con Sall se ligaron en el vector pGMT7+C $\alpha$ , previamente cortado con NdeI y XhoI. Las secuencias de DNA codificantes de la cadena beta del TCR cortadas con NdeI y AgeI se ligaron en otro vector pGMT7+C $\beta$  distinto, también previamente cortado con NdeI y AgeI. Los plásmidos ligados se introducen por transformación en células competentes de la cepa de *Escherichia coli* XL1-

azul que a continuación se siembran en placas de LB/agar con ampicilina 100 µg/ml. Tras permanecer en incubación hasta el día siguiente a 37 °C, se repican colonias aisladas que se cultivan hasta el día siguiente en 10 ml de LB con ampicilina 100 µg/ml a 37 °C y en agitación. Los plásmidos clonados se purifican con un kit Miniprep (Qiagen) y el inserto se secuencian con un secuenciador automático de DNA (Lark Technologies).

#### Ejemplo 4: Genomanipulación de linfocitos T autólogos

Los linfocitos T se pueden genomanipular para que expresen TCR de gran afinidad (para las llamadas terapias con TCR) o receptores quiméricos de antígeno derivados de la fusión de proteínas (CAR) provistos de una especificidad de antígeno reforzada hacia el complejo MHC I/MAG-003 o el complejo MHC II/MAG-003. En un aspecto, esta estrategia solventa algunas de las limitaciones que acarrea la tolerancia central y periférica y genera linfocitos T que serán más eficientes a la hora de reconocer y atacar los tumores sin necesidad de la activación *de novo* de los linfocitos T en el paciente.

Con el fin de obtener linfocitos T que expresen los TCR de la presente descripción, los ácidos nucleicos codificantes de las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta identificadas y aisladas, como las descritas en los ejemplos 1 a 3, se clonan en vectores de expresión, como retrovirus gamma o lentivirus. Se crearon los virus recombinantes y se analizó su funcionalidad, como la especificidad antigénica y la afinidad funcional. A continuación, se toma una alícuota del producto final para transducir a la población destinataria de linfocitos T (generalmente purificada a partir de los PBMC del paciente), que se expande antes de administrarla vía infusión al paciente.

Las cadenas del TCR introducidas en un linfocito T de sangre periférica pueden competir con cadenas de TCR endógenas por su asociación con el complejo CD3, que es necesario para la expresión del TCR en la superficie celular. Puesto que la expresión profusa del TCR en la superficie celular es esencial para conferir la sensibilidad adecuada para la activación por las células que expresan el antígeno asociado a tumor diana (Cooper *et al.*, 2000; Labrecque *et al.*, 2001), las estrategias que potencian la expresión de los genes de las cadenas alfa y beta del TCR son importantes en la terapia génica con TCR.

Con el fin de aumentar la expresión de TCR de la presente descripción, en la presente descripción se pueden usar promotores potentes, como repeticiones terminales largas de retrovirus (LTR), citomegalovirus (CMV), virus de citoblastos murino (MSCV) U3, fosfoglicerato cinasa (PGK),  $\beta$ -actina, ubiquitina y un promotor compuesto de virus simiesco 40 (SV40)/CD43, el factor de elongación (EF)-1a (Tsuji *et al.*, 2005) y el promotor del virus formador de focos en el bazo (SFFV) (Joseph *et al.*, 2008).

Además de promotores potentes, muchos casetes de expresión del TCR contienen otros elementos adicionales para potenciar la expresión del transgén, como un tracto central polipurínico (cPPT), el cual promueve la traslocación nuclear de los constructos lentivíricos (Follenzi *et al.*, 2000), o el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (wPRE), que aumenta el nivel de expresión del transgén al reforzar la estabilidad del RNA (Zufferey *et al.*, 1999).

Alcanzar un alto nivel de expresión del TCR en la superficie celular exige que tanto las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido se transcriban en abundancia. Con ese fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción se pueden clonar en constructos bicistrónicos en un mismo vector, los cuales han demostrado ser capaces de superar ese obstáculo. La inserción de un sitio de entrada intrarribosómico del virus (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta da pie a la expresión coordinada de ambas cadenas, porque ambas son generadas a partir de un único transcrito que se escinde en dos proteínas durante la traducción, asegurando así la producción equimolar de ambas cadenas (Schmitt *et al.* 2009). (Schmitt *et al.* 2009).

Otra modificación que ha demostrado ser beneficiosa para aumentar la expresión del transgén del TCR es la optimización de los codones. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos sean codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos «idóneos» que otros por la disponibilidad relativa de los tRNA correspondientes, entre otros factores (Gustafsson *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la modificación de las secuencias génicas de la TCR-alfa y la TCR-beta de modo tal que cada aminoácido sea codificado por el codón más idóneo para la expresión génica en mamíferos, así como la supresión de los motivos que provocan inestabilidad en el mRNA o de los sitios ocultos de corte y empalme mejora notablemente la expresión génica de ambas cadenas (Scholten *et al.*, 2006).

Además, el emparejamiento erróneo entre las cadenas de TCR introducidas y las endógenas puede derivar en la adquisición de especificidades que supongan un riesgo significativo para la autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros mixtos de las cadenas del TCR puede reducir el número de moléculas disponibles para formar complejos TCR correctamente aparejados y por tanto reducir notablemente la afinidad funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball *et al.*, 2007).

A fin de reducir el emparejamiento erróneo se puede modificar el dominio C-terminal de las cadenas del TCR introducidas que forman parte de la presente descripción para promover la afinidad entre las cadenas, al tiempo que reducir las posibilidades de que esas cadenas introducidas se emparejen con los TCR endógenos. Tales estrategias



pueden consistir en: La sustitución de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta humanas con sus contrapartidas murinos (dominio C-terminal murinizado); la creación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína tanto en las cadenas TCR-alfa como TCR-beta del TCR introducido (modificación con cisteína); cambiar los residuos que interactúan de los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta («knob-in-hole»); y la fusión directa de los dominios variables de ambas cadenas con el CD3 $\zeta$  (fusión con CD3 $\zeta$ ) (Schmitt *et al.* 2009).

La presente descripción proporciona proteínas de TCR que son útiles para el tratamiento de cánceres y tumores, preferentemente el cáncer de pulmón no microcítico que sobrepresenta o que presenta exclusivamente el MAG-003.

#### Ejemplo 5: Genomanipulación de linfocitos T alogénicos

Los linfocitos T gamma-delta ( $\gamma\delta$ ), que son linfocitos T efectores no convencionales implicados en la primera línea de defensa contra los patógenos, pueden interactuar con las células tumorales y erradicarlas sin el concurso del MHC a través de receptores activadores, entre otros, las cadenas gamma y delta del TCR. Estos linfocitos T  $\gamma\delta$  muestran un fenotipo preactivado que permite la rápida producción de citocinas (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y una potente respuesta citotóxica tras la activación. Estos linfocitos T poseen actividad antitumoral contra muchos tipos de cáncer, lo que sugiere que la inmunoterapia mediada por linfocitos T  $\gamma\delta$  es factible y puede propiciar respuestas objetivas del tumor (Braza *et al.* 2013).

Los avances recientes con antígenos inmovilizados, anticuerpos monoclonales agonistas (AcM), células presentadoras de antígenos artificiales derivadas de tumor (aAPC), o combinaciones de AcM activadores y aAPC han logrado expandir con éxito linfocitos T gamma-delta con repertorios oligoclonales o policlonales de TCR. Por ejemplo, la proteína A relacionada con la cadena del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MICA) inmovilizada ha resultado ser un estímulo para linfocitos T que expresaban isotipos TCR $\delta$ 1 y anticuerpos activadores fijados sobre placa han expandido a linfocitos V $\delta$ 1 y V $\delta$ 2 en condiciones *ex vivo*. Se han producido cantidades clínicamente suficientes de TCR $\delta$ 1, TCR $\delta$ 2 y TCR $\delta$ 1<sup>neg</sup>TCR $\delta$ 2<sup>neg</sup> mediante el cultivo conjunto con aAPC y estas subpoblaciones mostraron diferencias en el fenotipo de memoria y en la reactividad hacia los tumores en condiciones *in vitro* e *in vivo* (Deniger *et al.* 2014).

Asimismo, los linfocitos T  $\gamma\delta$  son susceptibles de ser modificados genéticamente, tal y como pone de manifiesto la introducción en ellos de cadenas alfa y beta de los TCR (Hiasa *et al.* 2009). Otro aspecto de la presente descripción se refiere a la producción de linfocitos T  $\gamma\delta$  que expresan cadenas alfa y beta de TCR que se unen al MAG-003. Para ello, los linfocitos T  $\gamma\delta$  se expanden mediante los métodos descritos por Deniger *et al.* 2014 y después a dichos linfocitos expandidos se los somete a transducción mediante virus recombinantes para que expresen los TCR que se unen al MAG-003 (como se describe en el ejemplo 3). Por último, los linfocitos T  $\gamma\delta$  transducidos con el virus se le infunden al paciente.

#### Ejemplo 6: Inmunogenicidad y datos de los linfocitos T funcionales

La inmunogenicidad de MAG-003 se analizó con protocolos que replican el procedimiento de fabricación de un producto farmacéutico. En los donantes sanos se observó la sensibilización de linfocitos T específicos para el MAG-003. Los linfocitos T generados fueron capaces de destruir células diana cargadas con dicho péptido, lo cual demuestra su funcionalidad. Los datos demostraron: 1) que MAG-003 es una diana inmunogénica; y 2) que los linfocitos T generados contra MAG-003 son funcionales.

Otros datos generados aportan pruebas de que MAG-003 es un péptido que presenta una unión excelente al alelo HLA-A\*02:01.

#### Ejemplo 7: Expresión del mRNA de MAGEA4 en tejidos

Se usó la hibridación *in situ* (ISH) para detectar la expresión del mRNA directamente en cortes de tejido congelados o fijados en formol. En virtud de su alta sensibilidad y de su resolución espacial, constituye un método adecuado para determinar la expresión de la diana en ciertos tipos de células, así como la distribución o la frecuencia de la expresión de esa diana en cortes de tejido tumoral.

La ISH efectuada con el fin de detectar el mRNA de MAGEA4 se llevó a cabo con la tecnología BaseScope™, desarrollada por Advanced Cell Diagnostics (ACD). La tecnología BaseScope™ se basa en la hibridación de cuatro pares de sondas oligonucleotídicas con forma de Z a la secuencia diana. La amplificación de la señal se consigue con la amplificación de DNA ramificado, que se basa en múltiples pasos de hibridación de los oligonucleótidos, que en última instancia acaban conformando un árbol de DNA ramificado (bDNA). Por último, un gran número de sondas de marcaje se hibridan con las ramas del árbol de DNA ramificado lo que permite detectar la señal intensificada. El kit de detección cromogénica BaseScope™ (RED) contiene sondas de marcaje que están unidas a una enzima (fosfatasa alcalina). La detección de la señal depende de la conversión enzimática del sustrato cromogénico FastRed, el cual amplifica la señal original. BaseScope™ es una tecnología sumamente sensible en virtud del eficiente proceso de amplificación de la señal, aunado con la alta sensibilidad y con la fuerte unión de los pares de sondas Z al mRNA

diana, aunque este esté parcialmente entrelazado o degradado. Según ACD, la unión de una sola pareja de sondas a cada molécula de mRNA basta para generar una señal detectable de ISH.

Cada experimento de ISH se subdivide en dos procesos metodológicos: 1) Tratamiento previo del tejido para recuperar la diana; y 2) hibridación con la diana, amplificación de la señal y detección de la misma. Es esencial que el tratamiento previo cumpla las condiciones óptimas para poder detectar la diana en los cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. El proceso de fijación provoca el entrecruzamiento de proteínas, DNA y RNA en las células y en los tejidos, fenómeno que enmascara los sitios de hibridación. Por tanto, para garantizar que el mRNA diana sea accesible y que el juego de sondas se pueda unir correctamente, es preciso eliminar esos entrecruzamientos antes de la hibridación. El tratamiento previo del tejido incluye tres pasos: 1) Bloqueo de la fosfatasa alcalina endógena mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno; 2) recuperación de la diana mediante la ebullición del reactivo de recuperación; y 3) recuperación de la diana mediante la digestión con proteasas. Puesto que el grado de fijación y de entrecruzamiento puede variar en los distintos bloques de muestras fijados con formol y parafina, es preciso determinar experimentalmente las condiciones óptimas para la recuperación de la diana con cada bloque de muestra. Por consiguiente, los cortes de tejido se sometieron a ebullición y a la digestión con proteasas durante distintos plazos de tiempo antes de proceder a la hibridación con un juego de sondas de control positivo y negativo. Las condiciones óptimas se determinaron mediante el examen al microscopio de la intensidad de la señal específica en el control positivo, del fondo inespecífico en el control negativo y de la morfología del tejido. El tratamiento previo del tejido se efectuó siguiendo los protocolos del fabricante. Los reactivos para dicho tratamiento preliminar forman parte de los kits de reactivos BaseScope™. Una vez completados los diversos pasos preparatorios, se evaluó la expresión de la diana mediante la hibridación de los juegos de sondas específicos con el mRNA de interés, con la posterior amplificación de la señal del DNA ramificado y la detección de la señal fluorescente o cromogénica. Todos los análisis se efectuaron siguiendo los protocolos del fabricante.

Tabla 10: Análisis de la expresión

Muestras	Tejido	Expresión de MAGEA4
HNSCC062T1	Cáncer de cabeza y cuello	++
HNSCC064T1	Cáncer de cabeza y cuello	++
NSCLC004T1	Cáncer de pulmón no microcítico	++
NSCLC006T1	Cáncer de pulmón no microcítico	+
OC036T1	Cáncer de ovario	+
Nivel de expresión total de MAGEA4 en el corte correspondiente: ± muy bajo, + bajo a moderado, ++ potente, +++ muy potente		

#### Lista de referencias bibliográficas

Adair SJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 589-601.

Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.

Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.

Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.

Bar-Haim E, Paz A, Machlenkin A, Hazzan D, Tirosh B, Carmon L, Brenner B, Vadai E, Mor O, Stein A, Lemonnier FA, Tzehoval E, Eisenbach L (2004). MAGE-A8 overexpression in transitional cell carcinoma of the bladder: identification of two tumour-associated antigen peptides. *Br. J. Cancer* 91, 398-407.

Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.

Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Rugghetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J. Cancer* 43, 2621-2627.

Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J. Cancer* 125, 1365-1371.

Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.

5 Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.

10 Cabezon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies Mage-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 12, 381-394.

15 Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.

Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.

20 Chen CH, Huang GT, Lee HS, Yang PM, Yan MD, Chen DS, Sheu JC (1999). High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular carcinoma. 1999. *Liver* 19, 110-114.

25 Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.

Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.

30 Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.

35 Cuffel C, Rivals JP, Zaugg y Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.

40 Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS. ONE.* 9, e104099.

Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* 29, 3329-3337.

45 De PE, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De SC, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, . (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.

50 Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 39, 963-974.

Eng KH, Weir I, Tsuji T, Odunsi K (2015). Immunostimulatory/regulatory gene expression patterns in advanced ovarian cancer. *Genes and Cancer.*

55 Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.

60 Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.

65 Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.

Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J Mol. Med.* 35, 1675-1682.

Hasegawa H, Mori M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T (1998). Expression spectrum of melanoma antigen-encoding gene family members in colorectal carcinoma. *Arch. Pathol. Lab Med.* 122, 551-554.

Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.

Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.

Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian y Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A\*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol.* 2010, 567594.

Kageyama S, Ikeda H, Miyahara y Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.*

Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.

Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* 76, 336-339.

Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.

Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432.

Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705.

Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.

Li J, Yang y Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563.

Li M, Yuan YH, Han y Liu YX, Yan L, Wang y Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.

Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.

Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.

Lin J, Lin L, Thomas DG, Greenson JK, Giordano TJ, Robinson GS, Barve RA, Weishaar FA, Taylor JM, Orringer MB, Beer DG (2004). Melanoma-associated antigens in esophageal adenocarcinoma: identification of novel MAGE-A10 splice variants. *Clin Cancer Res* 10, 5708-5716.

Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S (2008). The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled

cancer progression and metastasis. *Cancer Res* 68, 8104-8112.

Marcar L, Ihrig B, Hourihan J, Bray SE, Quinlan PR, Jordan LB, Thompson AM, Hupp TR, Meek DW (2015). MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4. *PLoS. ONE*. 10, e0127713.

Marcar L, MacLaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010a). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.

Marcar L, MacLaine NJ, Hupp TR, Meek DW (2010b). Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin. *Cancer Res* 70, 10362-10370.

Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggiaro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.

Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.

Miyahara y Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Takemitsu T, Yuta A, Majima y Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.

Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggiaro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.

Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C (2006). MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* 103, 11160-11165.

Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.

Naota H, Miyahara y Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka y Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima y Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8+ T-cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4+ T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.

Nishikawa H, Maeda y Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori y Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.

Nishimura S, Fujita M, Terata N, Tani T, Kodama M, Itoh K (1997). Expression of MAGE genes in colorectal carcinomas. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 20, 95-101.

Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosemberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.

Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi y Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumor antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.

Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.

Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.

- Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang y Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
- 5 Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555.
- 10 Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
- Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.
- 15 Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- 20 Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J Cancer* 101, 190-195.
- 25 Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J Oncol.* 26, 817-824.
- 30 Roch N, Kutup A, Vashist y Yekebas E, Kalinin V, Izbicki JR (2010). Coexpression of MAGE-A peptides and HLA class I molecules in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 30, 1617-1623.
- Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.
- 35 Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J Biol Chem* 279, 15505-15514.
- 40 Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.
- Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.
- 45 Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.
- 50 Sharma P, Shen y Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.
- 55 Shichijo S, Hoshino T, Koufuji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J Cancer Res* 88, 414-419.
- Shigematsu y Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki y Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.
- 60 Shirakura y Mizuno y Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gammanull mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.
- 65 Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev. Cancer* 5, 615-625.

- Soga N, Hori y Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.
- 5 Su C, Xu y Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.
- Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi y Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/ killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.
- 10 Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto y Kitano S, Makuuchi M (1999b). Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma 1999. *Cancer* 85, 1234-1240.
- 15 Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka y Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.
- Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.
- 20 Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping y Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.
- 25 Wilson EM (2010). Androgen receptor molecular biology and potential targets in prostate cancer. *Ther. Adv. Urol.* 2, 105-117.
- 30 Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 3997-4013.
- 35 Wong PP, Yeoh CC, Ahmad AS, Chelala C, Gillett C, Speirs V, Jones JL, Hurst HC (2014). Identification of MAGEA antigens as causal players in the development of tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncogene* 33, 4579-4588.
- Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in oesophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.
- 40 Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.
- 45 Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma y Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* 67, 9954-9962.
- 50 Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura y Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi y Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.
- Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.
- 55 Zhang y Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.
- 60 Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korol D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderline tumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. *Virchows Arch.* 462, 565-574.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (KVLEHVVRV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que dicho cáncer se selecciona de cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de pulmón microcítico.
- 10 2. Un receptor de linfocito T, preferiblemente un receptor de linfocito T recombinante, soluble o unido a membrana que es reactivo con un ligando HLA, en donde dicho ligando consiste en un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.
- 15 3. Un anticuerpo, en particular, un anticuerpo soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 cuando se une a una molécula del MHC para su uso en el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.
4. Una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, o el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 o el receptor de linfocitos T de la reivindicación 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables adicionales para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde dicho cáncer se selecciona de cáncer de pulmón no microcítico o cáncer de pulmón microcítico.



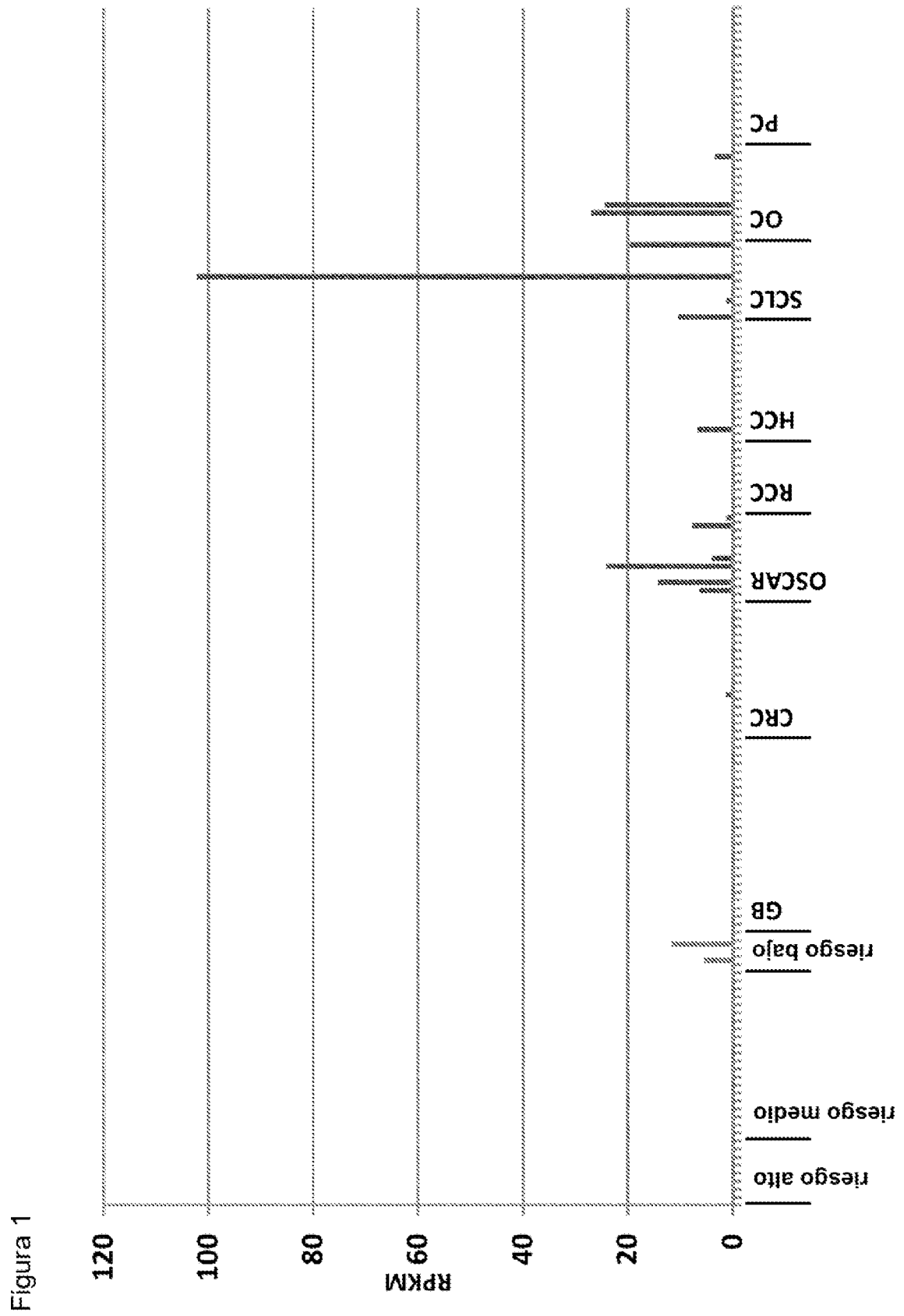


Figura 2

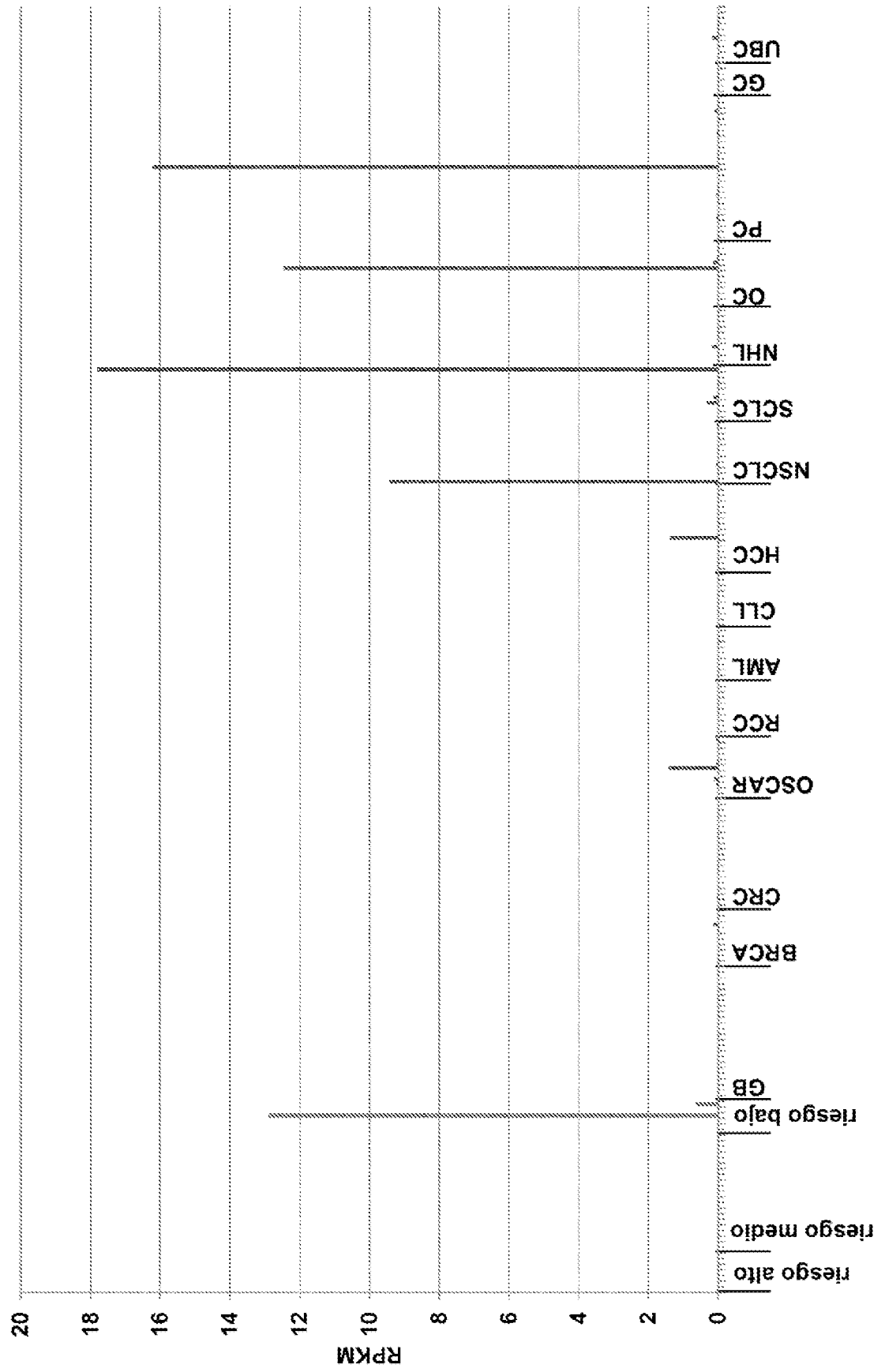


Figura 3

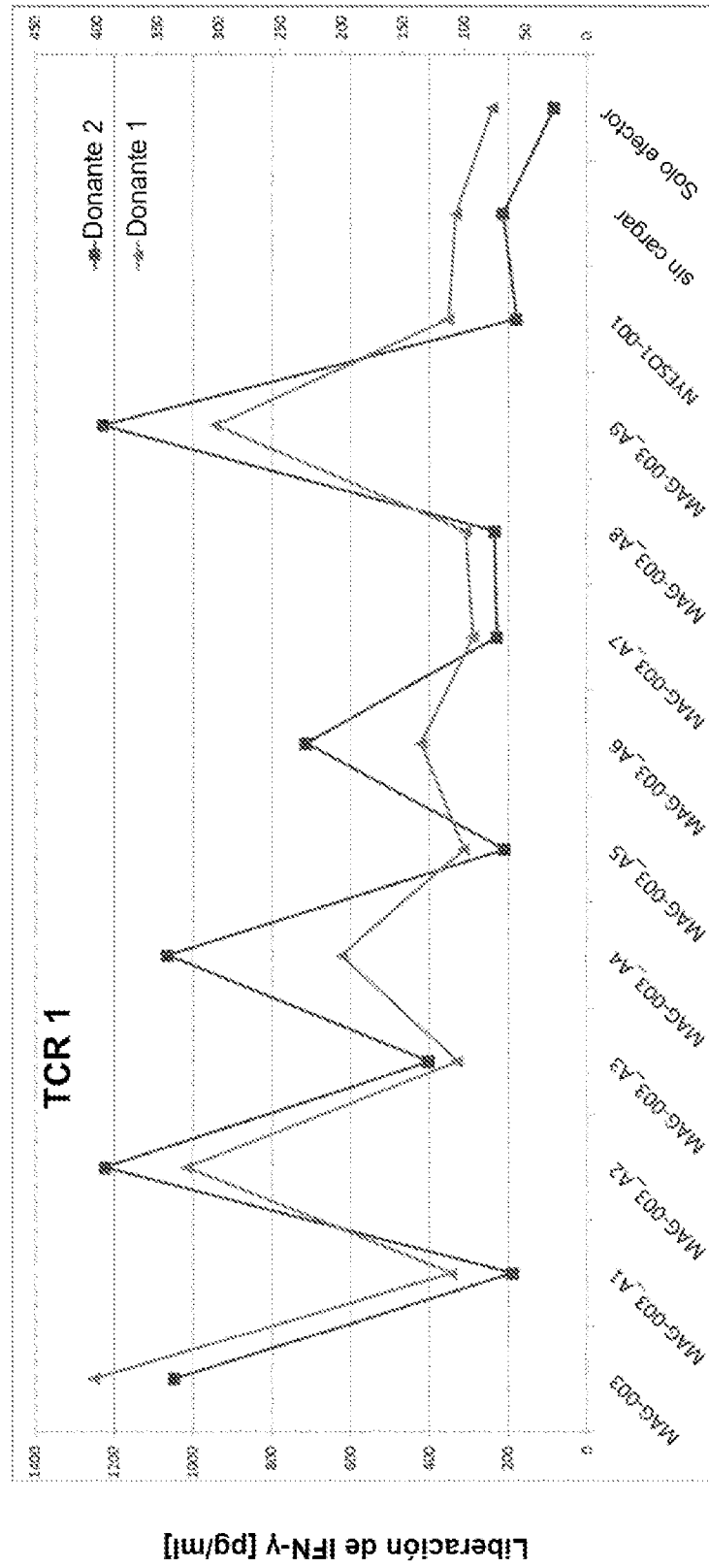


Figura 4

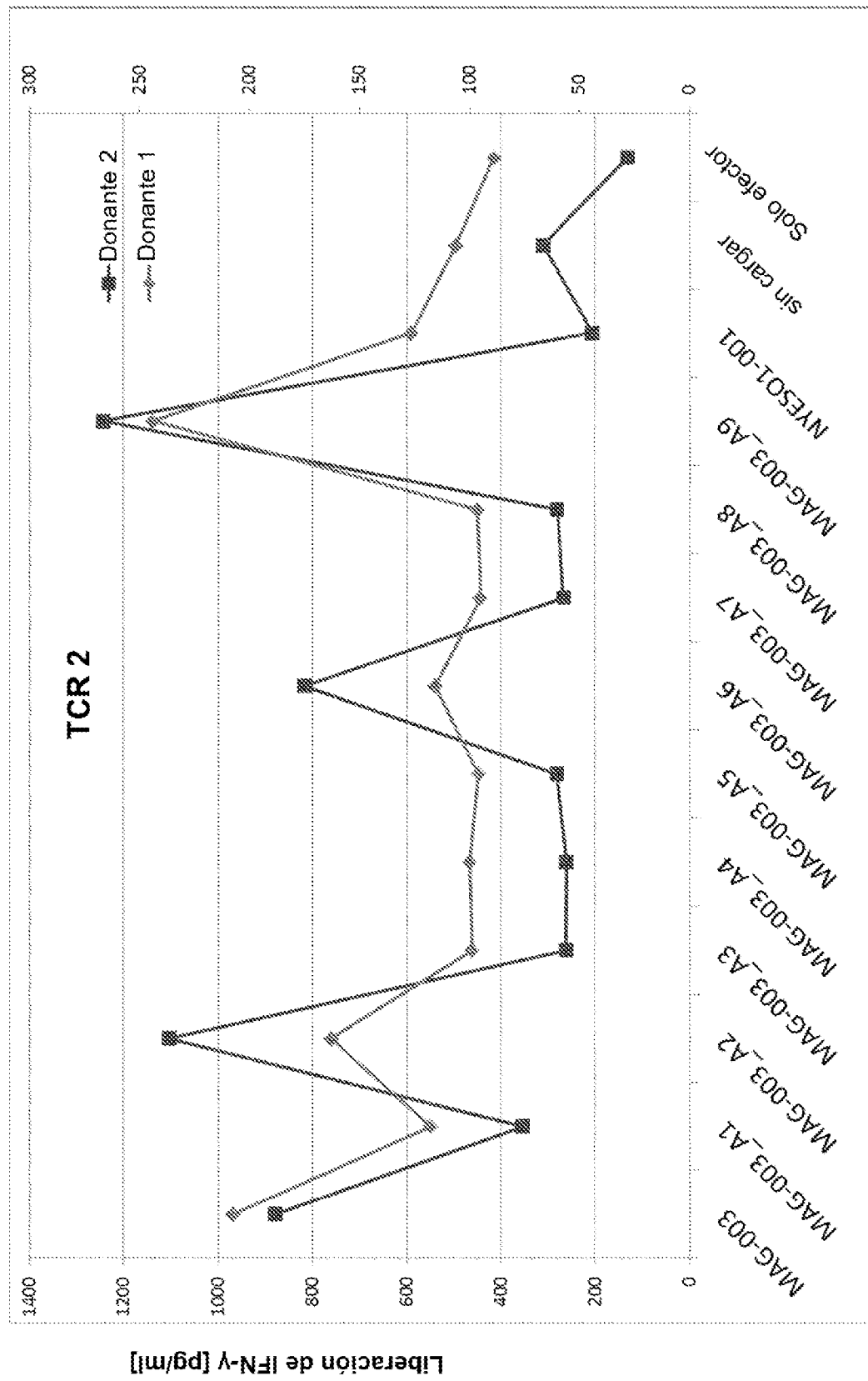


Figura 5

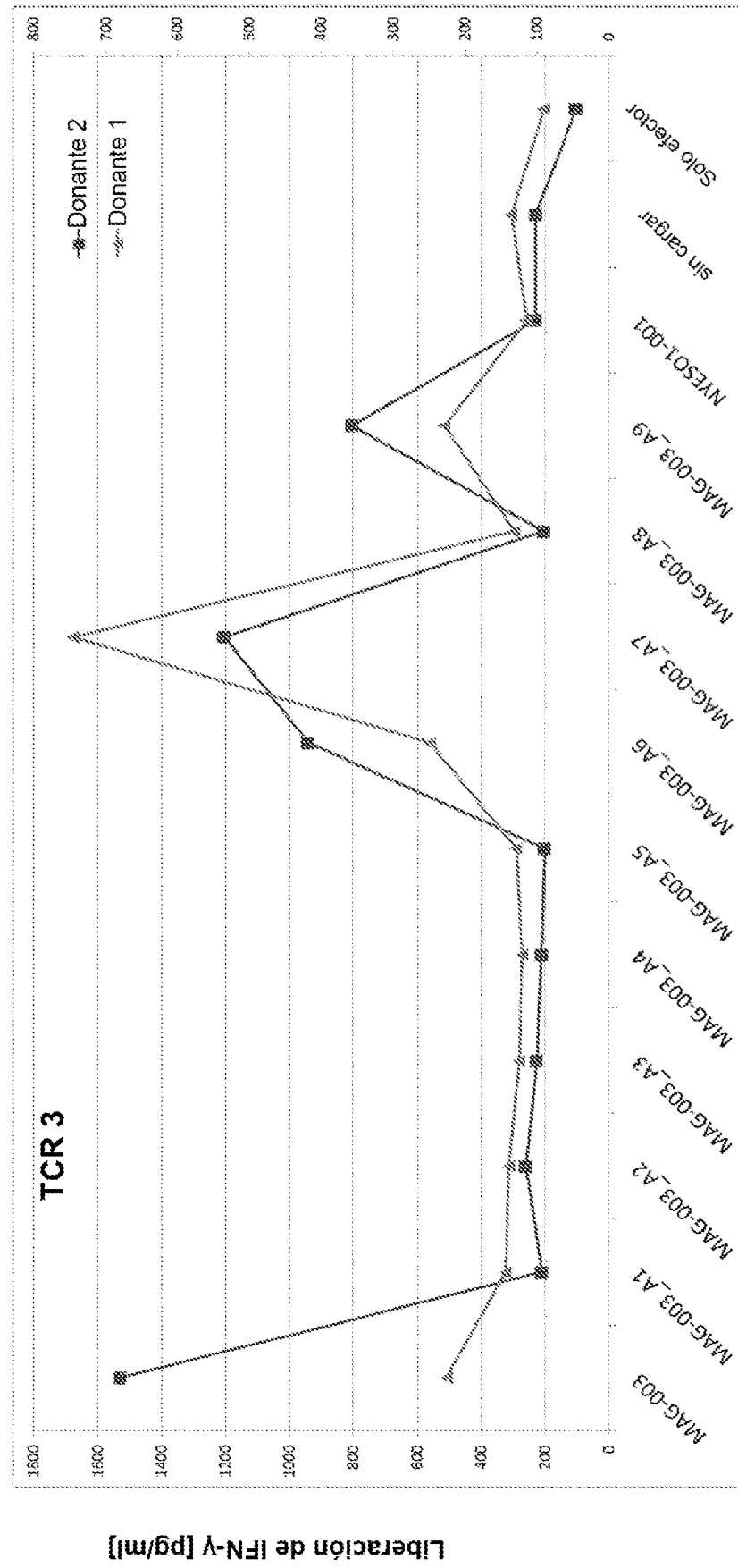


Figura 6

