

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 924**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016** **E 18201235 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3456347**

54 Título: **Péptidos novedosos y combinación de péptidos para usarse en inmunoterapia contra diferentes tumores**

30 Prioridad:

27.03.2015 US 201562139189 P

27.03.2015 GB 201505305

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

28.10.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MAHR, ANDREA;
STEVERMANN, LEA;
WEINSCHENK, TONI;
SCHOOR, OLIVER;
FRITSCH, JENS y
SINGH, HARPREET

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 924 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 novedosos y combinación de péptidos para usarse en inmunoterapia contra diferentes tumores

5 Generalmente, la presente invención se refiere al campo de péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y células para utilizarse en métodos inmunoterapéuticos. Por lo tanto, la presente invención se refiere al campo de la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención adicionalmente se refiere generalmente a epítomos peptídicos de células T asociados con tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados con tumores que, por ejemplo, pueden servir como ingredientes farmacéuticos activos de las composiciones de vacunas que estimulan las respuestas
10 inmunitarias anti-tumorales, o para estimular las células T *ex vivo* y transferirlas a los pacientes. Los péptidos enlazados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o los péptidos como tales, también pueden ser dianas de los anticuerpos, de los receptores de células T solubles, y de otras moléculas de unión.

Se describen en el presente documento varias secuencias peptídicas novedosas y sus variantes derivadas a partir de
15 las moléculas de antígenos de leucocitos humanos (HLA) clase I de las células tumorales humanas que se pueden utilizar en composiciones de vacunas para provocar las respuestas inmunitarias anti-tumorales, o como dianas para el desarrollo de células y compuestos farmacéuticamente/inmunológicamente activos.

Antecedentes de la Invención

20 De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization) (WHO), el cáncer se clasificó entre las cuatro principales enfermedades mortales no transmisibles en todo el mundo en 2012. Para el mismo año, el cáncer colorrectal, el cáncer de mama y los cánceres del tracto respiratorio se enlistaron dentro de las 10 causas principales de muerte en los países de altos ingresos (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>).

Epidemiología

En 2012, se estimaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 32,6 millones de pacientes que padecían de cáncer (dentro de 5 años del diagnóstico), y 8,2 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Ferlay et al., 2013; Bray et al., 2013).

Dentro de los grupos de cáncer de cerebro, leucemia y cáncer de pulmón, la presente invención se enfoca específicamente en glioblastoma (GB), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mieloide aguda (AML), y cáncer de pulmón no microcítico y microcítico (NSCLC y SCLC)), respectivamente.

El glioblastoma (GB) es la malignidad más común del sistema nervioso central con un índice de incidencia ajustado a la edad de 3,19 por 100.000 habitantes dentro de los Estados Unidos. El glioblastoma (GB) tiene un muy mal pronóstico con un índice de supervivencia de 1 año del 35 % y un índice de supervivencia de 5 años menor que el 5 %. El género masculino, la edad más avanzada y la etnicidad parecen ser los factores de riesgo para el glioblastoma (GB) (Thakkar et al., 2014).

La leucemia linfocítica crónica (CLL) es la leucemia más común en el mundo occidental, la cual comprende aproximadamente una tercera parte de todas las leucemias. Los índices de incidencia son similares en los Estados Unidos y Europa, y los nuevos casos estimados son de aproximadamente 16.000 por año. La leucemia linfocítica crónica (CLL) es más común en los caucásicos que en los africanos, más rara en los hispanos y en los americanos nativos, y aparece muy pocas veces en los asiáticos. En las personas de origen asiático, los índices de incidencia de leucemia linfocítica crónica (CLL) son 3 veces menores que en los caucásicos (Gunawardana et al., 2008). La supervivencia global de cinco años para los pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) es de aproximadamente el 79 % (<http://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-lymphocytic-cll/statistics>).

El cáncer de pulmón es el tipo más común de cáncer en todo el mundo y la causa principal de muerte por cáncer en muchos países. El cáncer de pulmón se subdivide en cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico. El cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) incluye los tipos histológicos de adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma macrocelular, y cuenta por el 85 % de todos los cánceres de pulmón en los Estados Unidos. La incidencia del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) está estrechamente correlacionada con la prevalencia del tabaquismo, incluyendo los fumadores actuales y los exfumadores, y se reportó que el índice de supervivencia de cinco años es del 15 % (World Cancer Report, 2014; Molina et al., 2008).

Terapia

Cáncer de mama

El tratamiento convencional para los pacientes con cáncer de mama depende de diferentes parámetros: etapa del tumor, estado del receptor de hormonas y expresión del patrón de HER2. El procedimiento diagnóstico habitual incluye la resección quirúrgica completa del tumor, seguida por terapia de radiación. La quimioterapia con principalmente antraciclina y taxanos se puede iniciar antes o después de la resección. Los pacientes con tumores positivos para

HER2 reciben el anticuerpo anti-HER2 de trastuzumab en adición a los productos quimioterapéuticos (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2012). El cáncer de mama es una entidad de cáncer inmunogénico, y los diferentes tipos de células inmunitarias infiltrantes en los tumores primarios exhiben un significado de pronóstico y predictivo distintivo. Se ha llevado a cabo un gran número de estudios de inmunoterapia en fase temprana en los pacientes con cáncer de mama.

5 Ya están surgiendo los datos clínicos sobre los efectos de la modulación del punto de control inmunitario con ipilimumab y otros anticuerpos activadores de las células T en los pacientes con cáncer de mama (Emens, 2012).

Leucemia linfocítica crónica

10 Aunque la leucemia linfocítica crónica (CLL) no es curable en la actualidad, muchos pacientes muestran solamente un progreso lento de la enfermedad o un empeoramiento de los síntomas. Para los pacientes con la enfermedad sintomática o que progresa rápidamente, hay varias opciones de tratamiento disponibles. Éstas incluyen quimioterapia, terapia dirigida, terapias inmunológicamente basadas tales como los anticuerpos monoclonales, receptores de antígenos quiméricos (CAR) e inmunoterapia activa, y trasplantes de células madre.

15 Varios estudios completados y en curso se basan en las células T autólogas diseñadas modificadas por el receptor de antígeno quimérico (CAR) con especificidad para CD19 (Maus et al., 2014). Hasta ahora, solamente una minoría de los pacientes mostraron receptores de antígenos quiméricos (CAR) detectables o persistentes. Se han detectado una respuesta parcial (PR) y dos respuestas completas (CR) en los estudios en células T de los receptores de antígenos quiméricos (CAR) en Porter et al. y Kalos et al. (Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011).

20 La inmunoterapia activa incluye las siguientes estrategias: terapia genética, vacunas de células tumorales modificadas enteras, vacunas basadas en células dendríticas (DC), y vacunas peptídicas derivadas de antígenos asociados con tumores (TAA).

25 Varios antígenos asociados con tumores (TAA) se sobreexpresan en la leucemia linfocítica crónica (CLL) y son adecuados para las vacunaciones. Éstos incluyen fibromodulina (Mayr et al., 2005), RHAMM/CD168 (Giannopoulos et al., 2006), MDM2 (Mayr et al., 2006), hTERT (Counter et al., 1995), la proteína receptora de laminina inmadura de antígeno oncofetal (OFAiLRP) (Siegel et al., 2003), adipofilina (Schmidt et al., 2004), survivina (Granziero et al., 2001), KW1 a KW14 (Krackhardt et al., 2002), y la región IgVHCDR3 derivada de tumor (Harig et al., 2001; Carballido et al., 2012). Se llevó a cabo un estudio clínico en fase I utilizando el péptido R3 derivado de RHAMM como una vacuna. 5 de 6 pacientes tuvieron respuestas de células T CD8+ específicas de R3 detectables (Giannopoulos et al., 2010).

Cáncer colorrectal

35 Dependiendo de la etapa del cáncer colorrectal (CRC), están disponibles diferentes terapias convencionales para el cáncer de colon y rectal. Los procedimientos convencionales incluyen cirugía, terapia de radiación, quimioterapia y terapia dirigida para el cáncer colorrectal (CRC) (Berman et al., 2015a; Berman et al., 2015b).

40 Los últimos estudios clínicos analizan la inmunoterapia activa como una opción de tratamiento contra el cáncer colorrectal (CRC). Esas estrategias incluyen la vacunación con péptidos a partir de los antígenos asociados con tumores (TAA), células tumorales enteras, vacunas de células dendríticas (DC) y vectores víricos (Koido et al., 2013).

45 Las vacunas peptídicas se han dirigido hasta ahora contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), mucina 1, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por las células T 3 (SART3), gonadotropina coriónica humana beta (beta-hCG), antígeno de tumor de Wilms 1 (WT1), Survivina-2B, MAGE3, p53, proteína de dedo anular 43 y translocasa de la membrana mitocondrial externa 34 (TOMM34), o KRAS mutado. En varios estudios clínicos en fase I y II, los pacientes mostraron respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del antígeno o la producción de anticuerpos. En contraste con las respuestas inmunológicas, muchos pacientes no se beneficiaron de las vacunas peptídicas en el nivel clínico (Koido et al., 2013; Miyagi et al., 2001; Moulton et al., 2002; Okuno et al., 2011).

50 Las vacunas de células dendríticas comprenden células dendríticas (DC) impulsadas con cualquiera de péptidos derivados de los antígenos asociados con tumores (TAA), lisados de células tumorales, células tumorales apoptóticas, o ARN tumoral o productos de fusión de células dendríticas (DC) con células tumorales. Aunque muchos pacientes en los estudios en fase I/II mostraron respuestas inmunológicas específicas, solamente una minoría tuvo un beneficio clínico (Koido et al., 2013).

Cáncer esofágico

60 La estrategia de tratamiento primordial para el cáncer esofágico depende de la etapa del tumor y de su localización, del tipo histológico y de la condición médica del paciente. Los regímenes quimioterapéuticos incluyen oxaliplatino más fluorouracilo, carboplatino más paclitaxel, cisplatino más fluorouracilo, FOLFOX y cisplatino más irinotecán. Los pacientes con tumores positivos para HER2 deben ser tratados de acuerdo con las directrices para el cáncer gástrico, debido a que los datos seleccionados aleatoriamente para las terapias dirigidas en el cáncer esofágico son muy limitados (Stahl et al., 2013).

Los datos sobre los planteamientos inmunoterapéuticos en el cáncer esofágico son escasos, debido a que solamente se ha llevado a cabo un número muy limitado de estudios clínicos en fase temprana. Se administró una vacuna consistente en tres péptidos derivados a partir de tres diferentes antígenos de cáncer de testículos (proteína cinasa TTK, locus K de complejo de antígeno de linfocitos 6 y proteína 3 de unión al ARNm del factor de crecimiento tipo insulina (IGF)-II) a los pacientes con cáncer esofágico avanzado en un estudio en fase I con resultados moderados. La inyección intra-tumoral de células T activadas después de la estimulación *in vitro* con células malignas autólogas provocó respuestas tumorales completas o parciales en cuatro de once pacientes en un estudio en fase I/II (Toomey et al., 2013).

Cáncer gástrico

El cáncer gástrico (GC) empieza en las células que revisten la capa mucosa y se extiende a través de las capas externas a medida que crece. Se utilizan cuatro tipos de tratamiento convencional. El tratamiento para el cáncer gástrico puede implicar la resección endoscópica o quirúrgica, quimioterapia, radioterapia o quimiorradiación (Leitlinie Magenkarzi nom, 2012).

La eficacia de los regímenes terapéuticos de la actualidad para el cáncer gástrico (GC) avanzado es mala, lo cual da como resultado bajos índices de supervivencia de 5 años. La inmunoterapia podría ser un planteamiento alternativo para mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico (GC). La transferencia adoptiva de linfocitos asociados con tumores y linfocitos citolíticos inducidas por citocinas, las vacunas basadas en péptidos dirigidas a HER2/neu, MAGE-3 o el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 1 y 2 y las vacunas basadas en células dendríticas dirigidas a HER2/neu, mostraron resultados prometedores en los estudios clínicos de cáncer gástrico (GC). La inhibición del punto de control inmunitario y las células T diseñadas podrían representar opciones terapéuticas adicionales, las cuales son evaluadas actualmente en estudios pre-clínicos y clínicos (Matsueda y Graham, 2014).

Glioblastoma

Las opciones terapéuticas para el glioblastoma (WHO grado IV) son muy limitadas. Se están investigando diferentes planteamientos inmunoterapéuticos para el tratamiento del glioblastoma (GB), incluyendo la inhibición del punto de control inmunitario, la vacunación y la transferencia adoptiva de las células T diseñadas.

Actualmente se están investigando diferentes estrategias de vacunación para los pacientes con glioblastoma (GB), incluyendo vacunas basadas en péptidos, vacunas de proteína de choque térmico, vacunas de células tumorales autólogas, vacunas basadas en células dendríticas y vacunas basadas en proteínas víricas. En estos planteamientos, se aplican péptidos derivados a partir de proteínas asociadas con glioblastoma (GB) tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico variante III (EGFRvIII) o las proteínas de choque térmico, o las células dendríticas impulsadas con un lisado de células tumorales autólogas o componentes de citomegalovirus, con el objeto de inducir una respuesta inmunitaria anti-tumoral en los pacientes con glioblastoma (GB). Varios de estos estudios revelan buenos perfiles de seguridad y tolerabilidad, así como datos de eficacia prometedores.

La transferencia adoptiva de células T genéticamente modificadas es un planteamiento inmunoterapéutico adicional para el tratamiento del glioblastoma (GB). Diferentes estudios clínicos actualmente evalúan la seguridad y eficacia de las células T portadoras de receptores de antígenos quiméricos dirigidas contra HER2, receptor alfa 2 de IL-13, y EGFRvIII (Ampie et al., 2015).

Cáncer de hígado

El manejo de la enfermedad depende de la etapa del tumor en el momento del diagnóstico y de la condición global del hígado. La quimioterapia contra el carcinoma hepatocelular (HCC) incluye combinaciones de doxorrubicina, 5-fluorouracilo y cisplatino para la terapia sistémica, y doxorrubicina, floxuridina y mitomicina C para las infusiones por las arterias hepáticas. Sin embargo, la mayor parte del carcinoma hepatocelular (HCC) muestra una alta resistencia a los productos quimioterapéuticos (Enguita-German y Fortes, 2014).

Las opciones terapéuticas en el carcinoma hepatocelular (HCC) avanzado no resecionable están limitadas a Sorafenib, un inhibidor de múltiples tirosina cinasas (Chang et al., 2007; Wilhelm et al., 2004). Sorafenib es el único fármaco sistémico que se ha confirmado que aumenta la supervivencia por aproximadamente 3 meses y actualmente representa la única opción de tratamiento experimental para estos pacientes (Chapiro et al., 2014; Llovet et al., 2008).

Últimamente, se ha llevado a cabo un número limitado de estudios de inmunoterapia para el carcinoma hepatocelular (HCC). Las citocinas se han utilizado para activar subconjuntos de células inmunitarias y/o para aumentar la inmunogenicidad tumoral (Reinisch et al., 2002; Sangro et al., 2004). Otros estudios se han enfocado en la infusión de linfocitos infiltrantes de tumores o linfocitos de sangre periférica activados (Shi et al., 2004; Takayama et al., 1991; Takayama et al., 2000).

Hasta ahora, se ha ejecutado un pequeño número de estudios de vacunación terapéutica. Butterfield et al. condujeron

dos estudios utilizando péptidos derivados a partir de alfa-fetoproteína (AFP) como una vacuna, o células dendríticas (DC) cargadas con péptidos de alfa-fetoproteína (AFP) *ex vivo* (Butterfield et al., 2003; Butterfield et al., 2006). En dos estudios diferentes, las células dendríticas (DC) autólogas se impulsaron *ex vivo* con un lisado de tumor autólogo (Lee et al., 2005) o con un lisado de la línea celular de hepatoblastoma HepG2 (Palmer et al., 2009). Hasta ahora, los estudios de vacunación solamente han mostrado mejoras limitadas en los resultados clínicos.

Melanoma

La terapia convencional en el melanoma es la resección quirúrgica completa con el tejido sano circundante. Las opciones terapéuticas incluyen monoquimioterapia, poliquimioterapia y terapias dirigidas con los inhibidores específicos (S3-Leitlinie Melanom, 2013).

Ya se han evaluado varios planteamientos de vacunación diferentes en los pacientes con el melanoma avanzado. Hasta ahora, los estudios en fase III revelaron resultados más bien decepcionantes y claramente es necesario que se mejoren las toxicidad significativos después de la transferencia en los pacientes con melanoma. Desafortunadamente, GM-CSF o el estudio DERMA, tienen como objetivo mejorar la eficacia clínica sin reducir la tolerabilidad (<http://www.cancerresearchuk.org>).

La transferencia adoptiva de células T muestra una gran promesa para el tratamiento de melanoma en etapa avanzada. Los linfocitos infiltrantes de tumores autólogos expandidos *in vitro*, así como las células T que alojan un receptor de células T de alta afinidad para el antígeno de cáncer de testículos NY-ESO-1, tuvieron efectos favorables y de baja toxicidad significativos después de la transferencia en los pacientes con melanoma. Desafortunadamente, las células T con receptores de células T de alta afinidad para los antígenos específicos de melanocitos MART1 y gp100 y el antígeno de cáncer de testículos MAGEA3, indujeron efectos tóxicos considerables en los estudios clínicos. Por consiguiente, la transferencia adoptiva de células T tiene un alto potencial terapéutico, pero se necesita aumentar adicionalmente la seguridad y la tolerabilidad de estos tratamientos (Phan y Rosenberg, 2013; Hinrichs y Restifo, 2013).

Cáncer de pulmón no microcítico

Las opciones de tratamiento son determinadas por el tipo (microcítico o no microcítico) y la etapa del cáncer, e incluyen cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, y terapias biológicas dirigidas, tales como bevacizumab, erlotinib y gefitinib (S 3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

Con el fin de expandir las opciones terapéuticas para el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), se han estudiado diferentes planteamientos inmunoterapéuticos o todavía están bajo investigación. Aunque la vacunación con L-BLP25 o MAGEA3 fracasó para demostrar una ventaja de supervivencia mediada por la vacuna en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), una vacuna derivada de una línea celular alogénica mostró resultados prometedores en los estudios clínicos. Adicionalmente, en la actualidad están en marcha otros estudios de vacunación con dirección a los gangliósidos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico y otros diversos antígenos. Una estrategia alternativa para mejorar la respuesta antitumoral de células T del paciente consiste en bloquear los receptores de células T inhibidores o sus ligandos con anticuerpos específicos. Actualmente se está evaluando el potencial terapéutico de varios de estos anticuerpos, incluyendo ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, MPDL3280A y MEDI-4736, en el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), en los estudios clínicos (Reinmuth et al., 2015).

Cáncer de ovario

La resección quirúrgica es la principal terapia en el carcinoma de ovario en etapa temprana así como avanzada (S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 2013).

La inmunoterapia parece ser una estrategia prometedora para mejorar el tratamiento de los pacientes con cáncer de ovario, debido a que la presencia de linfocitos pro-inflamatorios infiltrantes de tumores, en especial las células T positivas para CD8, se correlaciona con un buen pronóstico, y las células T específicas para los antígenos asociados con tumores, se pueden aislar a partir del tejido de cáncer.

Por consiguiente, se hace una gran cantidad de esfuerzo científico en la investigación de diferentes inmunoterapias en el cáncer de ovario. Ya se ha llevado a cabo un número considerable de estudios pre-clínicos y clínicos, y actualmente están en marcha otros estudios. Hay datos clínicos disponibles para la terapia con citocina, vacunación, tratamiento con anticuerpos monoclonales, transferencia celular adoptiva e inmunomodulación.

Los estudios de vacunación en fases I y II, utilizando péptidos individuales o múltiples, derivados de varias proteínas asociadas con tumores (Her2/neu, NY-ESO-1, p53, tumor de Wilms-1) o antígenos tumorales enteros, derivados de células tumorales autólogas, revelaron buenos perfiles de seguridad y tolerabilidad, pero solamente efectos clínicos bajos a moderados.

La transferencia adoptiva de las células inmunitarias logró resultados heterogéneos en los estudios clínicos. La

transferencia adoptiva de las células T infiltrantes de tumores autólogas expandidas *in vitro* demostró ser un planteamiento prometedor en un estudio piloto. En contraste, la transferencia de las células T que alojan un receptor de antígeno quimérico específico para el receptor de folato alfa no indujo una respuesta clínica significativa en un estudio en fase I. Las células dendríticas impulsadas con un lisado de células tumorales o proteínas asociadas con tumores *in vitro* demostraron mejorar la respuesta anti-tumoral de las células T después de la transferencia, pero el grado de activación de las células T no se correlacionó con los efectos clínicos. La transferencia de los linfocitos citolíticos naturales provocó toxicidades significativas en un estudio en fase II.

La inmunidad anti-tumoral intrínseca, así como la inmunoterapia, son obstaculizadas por un micro-ambiente tumoral inmunosupresor. Con el fin de superar este obstáculo, se prueban fármacos inmunomoduladores, tales como ciclofosfamida, anticuerpos anti-CD25 y doxorubicina liposómica PEGilada en combinación con la inmunoterapia. Los datos más confiables están actualmente disponibles para el ipilimumab, un anticuerpo anti-CTLA4 que potencia la actividad de las células T. Se demostró que el ipilimumab ejerce efectos anti-tumorales significativos en los pacientes con cáncer de ovario (Mantia-Smaldone et al., 2012).

Cáncer pancreático

Las opciones terapéuticas para los pacientes con cáncer pancreático son muy limitadas. Un problema importante para el tratamiento efectivo es la etapa del tumor típicamente avanzada en el diagnóstico.

Las estrategias de vacunación se investigan como una alternativa innovadora y prometedora adicional para el tratamiento de cáncer pancreático. Ya se han evaluado las vacunas basadas en péptidos dirigidas a mutaciones de KRAS, telomerasa reactiva, gastrina, survivina, CEA y MUC1 en los estudios clínicos, con resultados parcialmente prometedores. Adicionalmente, los estudios clínicos para las vacunas basadas en células dendríticas, vacunas alogénicas secretoras de GM-CSF y algenpantucel-L en los pacientes con cáncer pancreático, también revelaron los efectos benéficos de la inmunoterapia. Actualmente están en marcha estudios clínicos adicionales que investigan además la eficiencia de diferentes protocolos de vacunación (Salman et al., 2013).

Cáncer de próstata

La estrategia terapéutica para el cáncer de próstata principalmente depende de la etapa del cáncer. Para el cáncer de próstata localmente restringido sin metástasis, las opciones de tratamiento incluyen vigilancia activa (esperar y observar), resección quirúrgica completa de la próstata y terapia de radiación local de dosis alta con o sin braquiterapia (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 2014).

La vacuna basada en células dendríticas sipuleucel-T fue la primera vacuna contra el cáncer que fue aprobada por la FDA. Debido a su efecto positivo sobre la supervivencia en los pacientes con CRPC, se ha hecho mucho esfuerzo en el desarrollo de inmunoterapias adicionales. Con respecto a las estrategias de vacunación, la vacuna peptídica de antígeno específico de próstata (PSA)-TRICOM, la vacuna peptídica personalizada PPV, la vacuna de ADN pTVG-HP y la vacuna de células enteras que expresa GM-CSF GVAX, mostraron resultados prometedores en diferentes estudios clínicos. Adicionalmente, se demostró que las vacunas basadas en células dendríticas que no fueran la sipuleucel-T, es decir, BPX-101 y DCVAC/Pa, provocaban las respuestas clínicas en los pacientes con cáncer de próstata. Los inhibidores del punto de control inmunitario como ipilimumab y nivolumab se están evaluando actualmente en estudios clínicos como una monoterapia así como en combinación con otros tratamientos, incluyendo terapia de privación de andrógeno, terapia de radiación local, PSA-TRICOM y GVAX. La sustancia inmunomoduladora tasquinimod, la cual hizo significativamente más lento el progreso y aumentó la supervivencia sin progreso en un estudio en fase II, se está investigando actualmente además en un estudio en fase III. La lenalidomida, otro inmunomodulador, indujo efectos prometedores en los estudios clínicos en fase temprana, pero fracasó en mejorar la supervivencia en un estudio en fase III. A pesar de estos resultados decepcionantes, siguen en marcha estudios adicionales de la lenalidomida (Quinn et al., 2015).

Carcinoma de células renales

El tratamiento inicial es más comúnmente la eliminación ya sea parcial o completa de los riñones afectados, y sigue siendo el pilar principal del tratamiento curativo (Rini et al., 2008). Para el tratamiento de primera línea de los pacientes con una mala puntuación de pronóstico una guía elaborada por varias organizaciones y sociedades del cáncer recomienda los inhibidores de receptor de tirosina cinasa (TKI) sunitinib y pazopanib, el anticuerpo monoclonal bevacizumab combinado con interferón- α (IFN- α), y el inhibidor de mTOR temsirolimus. Basándose en las directrices elaboradas por la US NCCN así como las EAU y ESMO europeas, los inhibidores de receptor de tirosina cinasa (TKI) sorafenib, pazopanib o recientemente axitinib se recomiendan como una terapia de segunda línea en los pacientes con carcinoma de células renales (RCC) que han fracasado en la terapia anterior con citocinas (IFN- α , IL-2). Las directrices de NCCN recomiendan también sunitinib en este escenario (evidencia de alto nivel de acuerdo con NCCN Categoría I).

La inmunogenicidad conocida del carcinoma de células renales (RCC) ha representado la base que apoya el uso de la inmunoterapia y de las vacunas de cáncer en el carcinoma de células renales (RCC) avanzado. La interesante

correlación entre la expresión de linfocitos PD-1 y la etapa avanzada, el grado y el pronóstico del carcinoma de células renales (RCC), así como la expresión selectiva de PD-L1 por parte de las células tumorales del carcinoma de células renales (RCC) y su asociación potencial con resultados clínicos peores, han llevado a cabo al desarrollo de nuevos agentes anti-PD-1/PD-L1, solos o en combinación con fármacos anti-angiogénicos u otros planteamientos inmunoterapéuticos, para el tratamiento del carcinoma de células renales (RCC) (Massari et al., 2015). En el carcinoma de células renales (RCC) avanzado, un estudio de una vacuna de cáncer en fase III denominado estudio TRIST evalúa si TroVax (una vacuna que utiliza un antígeno asociado con el tumor, 5T4, con un vector de poxvirus), añadido a la terapia del procedimiento diagnóstico habitual de la primera línea, prolonga la supervivencia de los pacientes con carcinoma de células renales (RCC) localmente avanzado o mRCC. La supervivencia media no se había alcanzado en ningún grupo, quedando 399 pacientes (54 %) en el estudio; sin embargo, el análisis de los datos confirma los resultados clínicos anteriores, demostrando que TroVax es inmunológicamente activo, y que hay una correlación entre la fuerza de la respuesta al anticuerpo específico de 5T4 y la mayor supervivencia. Además, hay varios estudios que buscan las vacunas peptídicas utilizando epítomos que se sobreexpresan en el carcinoma de células renales (RCC).

Varios planteamientos de vacunas tumorales han estado bajo investigación. Se hicieron estudios utilizando planteamientos de tumores enteros, incluyendo lisados de células tumorales, fusiones de células dendríticas con células tumorales, o ARN de tumor entero, en los pacientes con carcinoma de células renales (RCC), y se informaron remisiones de las lesiones tumorales en algunos de estos estudios (Avigan et al., 2004; Holtl et al., 2002; Marten et al., 2002; Su et al., 2003; Wittig et al., 2001).

Cáncer de pulmón microcítico

El tratamiento y pronóstico del cáncer de pulmón microcítico (SCLC) dependen fuertemente de la etapa del cáncer diagnosticada. La etapa del cáncer de pulmón microcítico (SCLC), basándose en los resultados clínicos, es más común que la etapa patológica. La etapa clínica utiliza los resultados de la examinación física, diversas pruebas de imágenes, y biopsias. El quimiotratamiento estándar del cáncer de pulmón microcítico (SCLC) utiliza la combinación de cualquiera de etopósido o irinotecán con cualquiera de cisplatino o carboplatino (American Cancer Society, 2015; S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 2011).

La inmunoterapia presenta un campo excesivamente investigado de la terapia contra el cáncer. Se están estudiando diversos planteamientos en el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico (SCLC). Uno de los planteamientos se dirige al bloqueo de linfocitos T citotóxicos CTLA-4, un inmunosupresor humano natural. La inhibición de linfocitos T citotóxicos CTLA-4 pretende reforzar el sistema inmunológico para combatir el cáncer. Recientemente, ya se ha iniciado el desarrollo de inhibidores del punto de control inmunitario prometedores para el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico (SCLC). Otro planteamiento se basa en vacunas contra el cáncer que están actualmente disponibles para el tratamiento del cáncer de pulmón microcítico (SCLC) en los estudios clínicos (American Cancer Society, 2015; National Cancer Institute, 2015).

Leucemia mieloide aguda

El tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) se divide en dos fases: terapia de inducción y terapia post-remisión/"terapia de consolidación". La terapia de inducción se administra con el objeto de inducir la remisión y consiste en quimioterapia de combinación. La terapia de consolidación consiste en quimioterapia adicional o trasplante de células hematopoyéticas (HCT) (Shewel y Levis, 2014).

Se recomiendan estudios clínicos para los pacientes que pertenecen a los grupos con un pronóstico desfavorable e intermedio-2. Las opciones de tratamiento incluyen agentes hipometilantes (HMA) como azacitidina o decitabina, CPX-351, el cual es una formulación liposómica de daunorrubicina y citarabina en una proporción molar "óptima" de 1:5, y volasertib, el cual es un inhibidor de las polo cinasas. Volasertib se da en combinación con LDAC (citarabina en dosis baja). Se pueden administrar varios inhibidores de FLT3 diferentes en el caso de las mutaciones de FLT3. Éstos incluyen sorafenib, el cual se da en combinación con 3+7, quizartinib, un inhibidor más selectivo de FLT3 ITD que también inhibe CKIT, crenolanib, y midostaurina, un inhibidor no selectivo de FLT3 ITD. Otra opción de tratamiento es la dirección a CD33 con conjugados de anticuerpo-fármaco (anti-CD33 + calicheamicina, SGN-CD33a, anti-CD33 + actinio-225), los anticuerpos biespecíficos (reconocimiento de CD33 + CD3 (AMG 330) o CD33 + CD16), y los receptores de antígenos quiméricos (CARs) (Estey, 2014).

Linfoma no de Hodgkin

El linfoma no de Hodgkin tiene más de 60 subtipos. Los tres subtipos más comunes son linfoma de células B grande difuso (DLBCL, el subtipo más común), linfoma folicular (FL, el segundo subtipo más común), y linfoma microlinfocítico/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL, el tercer subtipo más común). El linfoma de células B grande difuso (DLBCL), el linfoma folicular (FL), y el linfoma microlinfocítico/linfoma linfocítico crónico (SLL/CLL) cuentan por aproximadamente el 85 % del linfoma no de Hodgkin (NHL) (Li et al., 2015). El tratamiento del linfoma no de Hodgkin (NHL) depende del tipo histológico y la etapa (National Cancer Institute, 2015).

Se puede observar la regresión espontánea del tumor en los pacientes con linfoma. Por consiguiente, la inmunoterapia

activa es una opción de terapia (Palomba, 2012).

Una opción de vacunación importante incluye vacunas de Id. Los linfocitos B expresan inmunoglobulinas superficiales con una secuencia específica de aminoácidos en las regiones variables de su cadenas pesada y ligera, única para cada clon celular (= idiotipo, Id). El idiotipo funciona como un antígeno asociado con el tumor.

La inmunización activa incluye la inyección de proteína recombinante (Id) conjugada con un adyuvante (KLH), que se da junto con GM-CSF como un adyuvante inmunitario. El Id específico del tumor se produce mediante cultivos de hibridoma o utilizando la tecnología de ADN recombinante (plásmidos) mediante un cultivo celular bacteriano, de insectos, o de mamífero.

Cáncer uterino

Más del 80 % de los cánceres endometriales se presentan como adenocarcinomas endometrioides (tipo I), una forma que está asociada con la exposición a estrógeno y que está bien a moderadamente diferenciada. El tratamiento de los carcinomas endometriales y de los cánceres cervicales es dependiente de la etapa (World Cancer Report, 2014).

Existen también algunos planteamientos inmunoterapéuticos que se están probando actualmente. En un estudio clínico en fase I/II, los pacientes que padecían de cáncer uterino se vacunaron con las células dendríticas (DC) autólogas electroporadas con el ARNm del gen de tumor de Wilms 1 (WT1). Además de un caso de reacción alérgica local al adyuvante, no se observaron efectos secundarios adversos, y 3 de 6 pacientes mostraron una respuesta inmunológica (Coosemans et al., 2013).

Adenocarcinoma de vesícula biliar y colangiocarcinoma

El colangiocarcinoma (CCC) es difícil de tratar y es usualmente letal. La única opción de tratamiento curativo es la resección completa (R0). La eficacia de las terapias biológicas en los cánceres del conducto biliar ha sido mixta. Ahora se están estudiando los fármacos que se dirigen al crecimiento de los vasos sanguíneos, tales como sorafenib, bevacizumab, pazopanib y regorafenib, para el tratamiento de colangiocarcinoma (CCC).

Adicionalmente, los fármacos que se dirigen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), tales como cetuximab y panitumumab, se utilizan en estudios clínicos en combinación con quimioterapia (American Cancer Society, 2015). Para la mayoría de los fármacos probados hasta ahora, el control de la enfermedad y la supervivencia global no mejoraron significativamente pero hay estudios clínicos adicionales en marcha.

El cáncer de vesícula biliar (GBC) es la malignidad más común y agresiva del conducto biliar en todo el mundo. Debido a la rareza de los carcinomas del conducto biliar en general, hay solamente unos cuantos estudios específicos del cáncer de vesícula biliar (GBC) o del colangiocarcinoma (CCC), mientras que la mayoría de ellos incluyen todos los cánceres del conducto biliar. Ésta es la razón por la cual el tratamiento no mejoró durante las últimas décadas y la resección R0 todavía es la única opción de tratamiento curativo.

Cáncer de vejiga urinaria

El tratamiento convencional para el cáncer de vejiga incluye cirugía, terapia de radiación, quimioterapia e inmunoterapia (National Cancer Institute, 2015).

Un planteamiento inmunoterapéutico efectivo se establece en el tratamiento del agresivo cáncer de vejiga no invasivo del músculo (NMIBC). De esta manera, se aplica una forma debilitada de las bacterias *Mycobacterium bovis* (*bacilo de Calmette-Guérin* = BCG) como una solución intravesical. El efecto principal del tratamiento con BCG es una protección a largo plazo (de hasta 10 años) significativa de la recurrencia del cáncer y una tasa de progreso reducida. En principio, el tratamiento con BCG induce una respuesta inflamatoria local que estimula la respuesta celular inmunitaria. La respuesta inmunitaria a BCG se basa en los siguientes pasos clave: infección de las células de cáncer urotelial y de vejiga mediante el BCG, seguida por un aumento en la expresión de moléculas presentadoras de antígeno, la inducción de respuesta inmunitaria mediada a través de la liberación de citocina, la inducción de la actividad anti-tumoral por medio de involucramiento de diversas células inmunitarias (en lo sucesivo linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, linfocitos citolíticos naturales y macrófagos) (Fuge et al., 2015; Gandhi et al., 2013).

Considerando los graves efectos secundarios y el gasto asociado con el tratamiento de cáncer, existe una necesidad de identificar los factores que se puedan utilizar en el tratamiento de cáncer en general, y de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH), cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC, CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), en particular. También existe una necesidad de identificar los factores que representen biomarcadores para el cáncer en general, y los tipos de cáncer anteriormente mencionados en particular, con el fin de

conducir a un mejor diagnóstico del cáncer, evaluación del pronóstico, y predicción del éxito del tratamiento.

La inmunoterapia contra el cáncer representa una opción de dirección específica hacia las células de cáncer, mientras que se minimizan los efectos secundarios. La inmunoterapia contra el cáncer hace uso de la existencia de antígenos asociados con tumores. La clasificación actual de los antígenos asociados con tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:

a) Antígenos de cáncer de testículos: Los primeros antígenos asociados con tumores (TAA) alguna vez identificados que pueden ser reconocidos por las células T pertenecen a esta clase, los cuales se denominaron originalmente como antígenos de cáncer de testículos (CT) debido a la expresión de sus miembros en tumores humanos histológicamente diferentes y, entre los tejidos normales, solamente en los espermatocitos/espermatogonias de los testículos y, ocasionalmente, en la placenta. Debido a que las células de los testículos no expresan las moléculas de antígenos de leucocitos humanos (HLA) clases I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por las células T en los tejidos normales y, por consiguiente, se pueden considerar como inmunológicamente específicos del tumor. Los ejemplos bien conocidos para los antígenos de cáncer de testículos (CT) son los miembros de la familia MAGE y NY-ESO-1.

b) Antígenos de diferenciación: Estos antígenos asociados con tumores (TAA) son compartidos entre los tumores y el tejido normal a partir del cual se presentó el tumor. La mayor parte de los antígenos de diferenciación conocidos se encuentran en los melanomas y en los melanocitos normales. Muchas de estas proteínas relacionadas con el linaje de los melanocitos están implicadas en la biosíntesis de melanina y, por consiguiente, no son específicas del tumor aunque, no obstante, se utilizan ampliamente para la inmunoterapia de cáncer. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tirosinasa y Melan-A/MART-1 para el melanoma, o PSA para el cáncer de próstata.

c) Antígenos asociados con tumores (TAA) sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican los antígenos asociados con tumores (TAA) ampliamente expresados en tipos histológicamente diferentes de tumores, así como en muchos tejidos normales, en términos generales con niveles más bajos de expresión. Es posible que muchos de los epítomos procesados y potencialmente presentados por los tejidos normales estén por debajo del nivel umbral para el reconocimiento de las células T, mientras que su sobreexpresión en las células tumorales puede desencadenar una respuesta contra el cáncer mediante la ruptura de la tolerancia previamente establecida. Los ejemplos prominentes para esta clase de antígenos asociados con tumores (TAA) son Her-2/neu, survivina, telomerasa, o WT1.

d) Antígenos específicos de tumores: Estos antígenos asociados con tumores (TAA) únicos se presentan a partir de las mutaciones de genes normales (tales como β -catenina, CDK4, etc.). Algunos de estos cambios moleculares están asociados con la transformación y/o el progreso neoplásico. Los antígenos específicos de tumores son en términos generales capaces de inducir fuertes respuestas inmunitarias sin llevar el riesgo de reacciones autoinmunes contra los tejidos normales. Por otra parte, estos antígenos asociados con tumores (TAA), en la mayoría de los casos, son solamente relevantes para el tumor exacto en el que se identificaron, y usualmente no son compartidos entre muchos tumores individuales. La especificidad (o asociación) con el tumor de un péptido también se puede presentar si el péptido se origina a partir de un exón (asociado) con el tumor en el caso de las proteínas con isoformas específicas (asociadas) con el tumor.

e) Antígenos asociados con tumores (TAA) que se presentan a partir de modificaciones anormales posteriores a la traducción: Estos antígenos asociados con tumores (TAA) se pueden presentar a partir de las proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores aunque, no obstante, llegan a asociarse con el tumor mediante los procesos posteriores a la traducción primordialmente activos en los tumores. Los ejemplos para esta clase se presentan a partir de patrones de glucosilación alterados que conducen a epítomos novedosos en los tumores como para MUC1, o eventos como empalme de proteínas durante la degradación, que pueden ser o no específicos del tumor.

f) Proteínas oncovíricas: Estos antígenos asociados con tumores (TAA) son proteínas víricas que pueden tener una función crítica en el proceso oncogénico y, debido a que son extrañas (no de origen humano), pueden provocar una respuesta de células T. Los ejemplos de estas proteínas son las proteínas del virus de papiloma humano tipo 16, E6 y E7, las cuales se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

La inmunoterapia basada en células T se dirige a los epítomos de péptidos derivados de las proteínas asociadas con tumores o específicas de tumores, que son presentadas por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos de tumores, es decir, los epítomos de los mismos, pueden ser moléculas derivadas de todas las clases de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., las cuales se expresan y, comparándose con las células inalteradas del mismo origen, usualmente se sobre-regulan en las células del tumor respectivo.

Existen dos clases de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), MHC clase I y MHC clase II. Las moléculas de MHC clase I se componen de una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina; las moléculas de MHC clase II se componen de una cadena alfa y una cadena beta. Su conformación tridimensional da como resultado un surco de unión, el cual se utiliza para la interacción no covalente con los péptidos.

Las moléculas de MHC clase I se pueden encontrar en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos que resultan de la disociación proteolítica de las proteínas predominantemente endógenas, los productos ribosómicos defectuosos (DRIP), y los péptidos más grandes. Sin embargo, los péptidos derivados de los compartimientos

endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia en las moléculas de MHC clase I. Esta forma no clásica de presentación de clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía (Brossart y Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Las moléculas de MHC clase II se pueden encontrar predominantemente en las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, y en los péptidos primordialmente presentes de las proteínas exógenas o transmembrana que son absorbidas por las células presentadoras de antígeno (APC), por ejemplo, durante la endocitosis, y posteriormente son procesadas.

Los complejos de péptido y MHC clase I son reconocidos por las células T positivas para CD8 portadoras del receptor de células T (TCR) apropiado, mientras que los complejos de péptido y las moléculas de MHC clase II son reconocidos por las células T auxiliares positivas para CD4 portadoras del receptor de células T (TCR) apropiado. Es bien sabido que el receptor de células T (TCR), el péptido, y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) están de esta manera presentes en una cantidad estequiométrica de 1:1:1.

Las células T auxiliares positivas para CD4 tienen una función importante para inducir y sostener respuestas efectivas por parte de las células T positivas para CD8 citotóxicas. La identificación de los epítomos de células T positivos para CD4 derivados a partir de los antígenos asociados con tumores (TAA) es de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos para desencadenar las respuestas inmunitarias anti-tumorales (Gnjatic et al., 2003). En el sitio del tumor, las células T auxiliares soportan una gran cantidad de citocinas amigables con las células T citotóxicas (CTL) (Mortara et al., 2006) y atraen a las células efectoras, por ejemplo, las células T citotóxicas (CTL), los linfocitos citolíticos naturales (NK), los macrófagos, y los granulocitos (Hwang et al., 2007).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas de MHC clase II está principalmente restringida a las células del sistema inmunológico, en especial a las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos, y células dendríticas. En los pacientes con cáncer, se ha encontrado que las células tumorales expresan las moléculas de MHC clase II (Dengjel et al., 2006).

Los péptidos alargados pueden actuar como epítomos activos de MHC clase II.

Las células T auxiliares, activadas por los epítomos de MHC clase II, tienen una función importante en la orquestación de la función efectora de las células T citotóxicas (CTL) en la inmunidad anti-tumoral. Los epítomos de células T auxiliares que desencadenan una respuesta de células T auxiliares del tipo TH1 soportan las funciones efectoras de células T aniquiladoras positivas para CD8, las cuales incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que exhiban complejos de péptido asociado con tumor/MHC sobre sus superficies celulares. De esta manera, los epítomos de péptidos de células T auxiliares asociados con tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados con tumores, pueden servir como ingredientes farmacéuticos activos de las composiciones de vacunas que estimulen las respuestas inmunitarias anti-tumorales.

Se demostró en modelos de animales mamíferos, por ejemplo, en ratones, que incluso en ausencia de linfocitos T positivos para CD8, las células T positivas para CD4 son suficientes para inhibir la manifestación de los tumores por medio de la inhibición de angiogénesis a través de la secreción de interferón-gamma (IFN γ) (Beatty y Paterson, 2001; Mumberg et al., 1999). Hay evidencia de que las células T CD4 son efectores antitumorales directos (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Debido a que la expresión constitutiva de las moléculas de antígenos de leucocitos humanos (HLA) clase II está usualmente limitada a las células inmunitarias, la posibilidad de aislar los péptidos de clase II directamente a partir de tumores primarios no se consideraba posible anteriormente. Sin embargo, Dengjel et al. tuvieron éxito en la identificación de un número de epítomos de MHC Clase II directamente a partir de los tumores (Publicación Internacional de Patente Número WO 2007/028574, Patente Europea Número EP 1 760 088 B1).

Debido a que ambos tipos de respuesta, dependientes de CD8 y CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto anti-tumoral, es importante la identificación y caracterización de los antígenos asociados con tumores reconocidos ya sea por las células T CD8+ (ligando: molécula de MHC clase I + epítomo de péptido) o bien por las células T auxiliares positivas para CD4 (ligando: molécula de MHC clase II + epítomo de péptido), en el desarrollo de las vacunas tumorales.

Para que un péptido de MHC clase I desencadene (provoque) una respuesta inmunitaria celular, también se debe unir a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Este proceso depende del alelo de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen al MHC clase I son usualmente de 8 a 12 residuos de aminoácidos de longitud, y usualmente contienen dos residuos conservados ("anclas") en su secuencia que interactúan con el surco de unión correspondiente de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). De esta manera, cada alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tiene un "motivo de unión" que determina cuáles péptidos pueden unirse específicamente a el surco de unión.

En la reacción inmunológica dependiente del MHC clase I, los péptidos no solamente tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas de MHC clase I expresadas por las células tumorales, sino que posteriormente también tienen que ser reconocidos por las células T portadoras de receptores de células T (TCR) específicos.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos de tumores o asociados con tumores, y para utilizarse en una terapia, se deben satisfacer los requisitos previos particulares. El antígeno debe ser expresado principalmente por las células tumorales, y no debe ser expresado, o sólo en cantidades comparablemente pequeñas, por los tejidos sanos normales. En una realización preferida, el péptido debe ser sobre-presentado por las células tumorales comparándose con los tejidos sanos normales. Es adicionalmente deseable que el antígeno respectivo no esté solamente presente en un tipo de tumor, sino que también en altas concentraciones (es decir, números de copias del péptido respectivo por célula). Los antígenos específicos de tumores y los antígenos asociados con tumores con frecuencia se derivan a partir de las proteínas directamente implicadas en la transformación de una célula normal hasta una célula tumoral, debido a su función, por ejemplo, en el control del ciclo celular o en la supresión de apoptosis. Adicionalmente, los dianas corriente abajo de las proteínas que causan directamente una transformación se pueden sobreregular y, por consiguiente, pueden estar indirectamente asociados con el tumor. Estos antígenos indirectamente asociados con los tumores también pueden ser los dianas de un planteamiento de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). Es esencial que haya epítomos presentes en la secuencia de aminoácidos del antígeno, con el objeto de asegurar que este péptido ("péptido inmunogénico"), el cual deriva de un antígeno asociado con el tumor, conduzca a una respuesta de células T *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) puede funcionar como un epítipo de células T. Un requisito previo para la inducción de una respuesta de células T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de una célula T que tenga un receptor de células T (TCR) correspondiente y la ausencia de tolerancia inmunológica para este epítipo en particular.

Por consiguiente, los antígenos asociados con tumores (TAA) son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en células T, incluyendo, pero no limitándose a, las vacunas tumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los antígenos asociados con tumores (TAA) usualmente se basan en el uso de las células T que se puedan aislar a partir de los pacientes o sujetos sanos, o se basan en la generación de perfiles de transcripción diferencial o patrones de expresión diferencial de péptidos entre los tumores y los tejidos normales. Sin embargo, la identificación de los genes sobre-expresados en los tejidos tumorales o en las líneas celulares tumorales humanas, o selectivamente expresados en esos tejidos o líneas celulares, no proporciona una información precisa con respecto al uso de los antígenos que se transcriben a partir de estos genes en una terapia inmunológica. Esto se debe a que solamente una subpoblación individual de epítomos de estos antígenos son adecuados para dicha aplicación debido a que tiene que estar presente una célula T con un receptor de células T (TCR) correspondiente, y necesita estar ausente o debe ser mínima la tolerancia inmunológica para este epítipo particular. Por consiguiente, es importante seleccionar solamente los péptidos sobre-presentados o selectivamente presentados contra los cuales se pueda encontrar una célula T funcional y/o proliferante. Esta célula T funcional se define como una célula T que, después de la estimulación con un antígeno específico, se puede expandir clonalmente y es capaz de ejecutar funciones efectoras ("célula T efectora").

En el caso de la dirección del péptido-MHC mediante los receptores de células T (TCR) específicos (por ejemplo, los receptores de células T (TCR) solubles), y los anticuerpos u otras moléculas de unión (andamiajes) de acuerdo con la invención, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En estos casos, la presentación es el factor determinante.

El documento GB 2182665 A, el documento WO 2004/014867 A2 y el documento US 2007/248628 A1 desvelan la identificación de antígenos asociados con tumores (TAA) para su uso en la inmunoterapia del cáncer. Bassani-Sternberg et al. (2005), Bourdetsky et al (2014) y Haen et al. (2013) desvelan espectrometría de masas de alto rendimiento para la identificación de péptidos presentadores de HLA asociados con el cáncer.

Sumario de la Invención

La presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 14; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización de la invención, dicho péptido incluye enlaces no peptídicos, y en donde dichos enlaces no peptídicos se seleccionan del grupo que consiste en enlaces peptídicos inversos, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$.

La presente invención se refiere además a un receptor de células T, preferentemente un receptor de células T recombinante, soluble o unido a membrana que es reactivo con un ligando de HLA en complejo con HLA-A*02, en donde dicho ligando consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 14.

La presente invención se refiere además a un anticuerpo, en particular, un anticuerpo soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido de acuerdo con la invención, preferentemente el péptido de acuerdo con la invención cuando se une a una molécula del MHC.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico, que codifica un péptido de acuerdo con la invención o un TCR de acuerdo con la invención, o un anticuerpo de acuerdo con la invención, opcionalmente enlazado a una

secuencia promotora heteróloga, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.

La presente invención se refiere además a una célula hospedadora recombinante que comprende el péptido de acuerdo con la invención, o el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la invención, en donde dicha célula hospedadora preferentemente es una célula presentadora de antígenos tal como una célula dendrítica, o en donde dicha célula hospedadora preferentemente es una célula T o una célula NK.

La presente invención se refiere además a un método para producir el péptido de acuerdo con la invención, o para producir el receptor de células T de acuerdo con la invención, o un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la invención que presenta el péptido de acuerdo con la invención y aislar el péptido o el TCR o el anticuerpo de la célula hospedadora o su medio de cultivo.

La presente invención se refiere además a un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo el método poner en contacto *in vitro* células T con moléculas de MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada o una construcción artificial que imita una célula presentadora de antígenos durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichas células T de una manera específica de antígeno, en donde dicho antígeno es un péptido de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere además a un linfocito T activado, producido mediante el método de acuerdo con la invención que reconoce selectivamente una célula que presenta un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención interactuando a través de su receptor de célula T con el péptido en complejo con HLA.

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 acuerdo con la invención, el receptor de células T de acuerdo con la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la invención, la célula de acuerdo con la invención o el linfocito T activado de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables adicionales.

En una realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende el linfocito T activado de acuerdo con la invención y comprende además uno o más adyuvantes.

En una realización de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención el uno o más adyuvantes se seleccionan de interleucina e inmunoadyuvante.

La presente invención se refiere además al péptido de acuerdo con la invención, el receptor de células T de acuerdo con la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la invención, la célula de acuerdo con la invención o el linfocito T activado de acuerdo con la invención para su uso en medicina, preferentemente para su uso en el diagnóstico y/o el tratamiento de cáncer, o para su uso en la fabricación de un medicamento contra el cáncer.

En una realización, la presente invención se refiere además al péptido de acuerdo con la invención, el receptor de células T de acuerdo con la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la invención, la célula de acuerdo con la invención o el linfocito T activado de acuerdo con la invención para su uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer, o para su uso en la fabricación de un medicamento contra el cáncer de acuerdo con la invención, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH), cáncer de próstata (PCA), cáncer ovárico (OC), melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma No de Hodgkin (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC, CCC), cáncer de la vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC) y otros tumores que muestran una sobrerepresentación del péptido que consiste en SEQ ID NO. 14.

La presente invención se refiere además a un kit que comprende:

a) un recipiente que comprende una composición farmacéutica que contiene el péptido de acuerdo con la invención, el receptor de células T de acuerdo con la invención, el anticuerpo de acuerdo con la invención, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la invención, la célula de acuerdo con la invención o el linfocito T activado de acuerdo con la invención, en solución o en forma liofilizada;

b) opcionalmente, un segundo recipiente que contiene un diluyente o solución reconstituyente para la formulación liofilizada;

c) opcionalmente, al menos uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 13 y 15 a 288 y

d) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) la reconstitución y/o el uso de la formulación

lioofilizada y

e) opcionalmente además comprende uno o más de (iii) un tampón, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja o (vii) una jeringa.

- 5 Se desvela en el presente documento un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, o una secuencia variante de las mismas que es al menos el 77 %, preferentemente al menos el 88 %, homóloga (preferentemente al menos el 77 %, o al menos el 88 % idéntica) a las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, en donde esta variante se enlaza al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y/o induce a las células T a reaccionar de forma cruzada con dicho péptido, o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el péptido no es el polipéptido de longitud completa subyacente.

Aunque el criterio más importante para que un péptido funcione como un objetivo de la terapia contra el cáncer, es su sobre-presentación en los tejidos tumorales primarios comparándose con los tejidos normales, también el perfil de expresión del ARN del gen correspondiente puede ayudar a seleccionar los péptidos apropiados. En particular, algunos péptidos son difíciles de detectar mediante espectrometría de masas, ya sea debido a sus propiedades químicas o bien a sus bajos números de copias en las células, y un planteamiento de rastreo que se enfoque en la detección de la presentación del péptido puede fracasar para identificar estas dianas. Sin embargo, estas dianas se pueden detectar mediante un planteamiento alternativo que empiece con el análisis de la expresión genética en los tejidos normales, y secundariamente evalúe la presentación del péptido y la expresión genética en los tumores. Este planteamiento se llevó a cabo en esta invención utilizando los datos del ARNm a partir de una base de datos públicamente disponible (Lonsdale, 2013) en combinación con los datos de expresión genética adicionales (incluyendo las muestras tumorales), así como los datos de presentación del péptido. Si el ARNm de un gen está casi ausente en los tejidos normales, en especial en los sistemas de órganos vitales, hay más probabilidades de que sea segura la dirección a los péptidos correspondientes mediante estrategias incluso muy potentes (tales como anticuerpos biespecíficos de afinidad optimizada o receptores de células T). Estos péptidos, incluso si se identifican solamente en un pequeño porcentaje de los tejidos tumorales, representan dianas interesantes. El análisis de espectrometría de masas rutinario no es suficientemente sensible para evaluar el cubrimiento de la diana al nivel del péptido. Más bien, se puede utilizar la expresión del ARNm del tumor para evaluar el cubrimiento. Para la detección del péptido por sí mismo, puede ser necesario un planteamiento dirigido de espectrometría de masas con una sensibilidad más alta que en el rastreo de rutina, y puede conducir a una mejor estimación del cubrimiento al nivel de la presentación del péptido.

También se desvela en el presente documento un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, o una variante de las mismas que es al menos el 77 %, preferentemente al menos el 88 %, homóloga (preferentemente al menos el 77 %, o al menos el 88 % idéntica) a las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, en donde el péptido o la variante del mismo tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente de entre 8 y 30, y muy preferentemente de entre 8 y 14 aminoácidos.

Las siguientes tablas muestran el péptido de acuerdo con la presente invención y péptidos adicionales como se desvelan en el presente documento, sus SEQ ID NO respectivas, y los genes de origen (subyacentes) esperados para estos péptidos. Todos los péptidos de la Tabla 1 y de la Tabla 2 se unen a HLA-A*02. Los péptidos de la Tabla 2 se han dado a conocer anteriormente en grandes listados como los resultados de los rastreos de alta producción con altos índices de error, o calculados utilizando algoritmos, pero no se han asociado con el cáncer en absoluto anteriormente.

Tabla 1: El péptido de acuerdo con la presente invención y péptidos adicionales desvelados en el presente documento

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
1	KLQEKIQEL	1062	CENPE
2	SVLEKEIYSI	127602	DNAH14
3	RVIDDSL VGV	2187	FANCB
4	VLFGELPAL	8701	DNAH11
5	GLVDIMVHL	8701	DNAH11
6	FLNAIETAL	8701	DNAH11
7	ALLQALMEL	51236, 728071	FAM203A, FAM203B
8	ALSSSQA EV	3833	KIFC1
9	SLITGQDLLSV	51804	SIX4
10	QLIEKNWLL	56992	KIF15
11	LLDPKTIFL	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	26762	HAVCR1

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
13	RLHDENILL	23322	RPGRIP1L
14	YTFSGDVQL	4312	MMP1
15	GLPSATTTV	94025	MUC16
16	SLADLSLLL	134391	GPR151
17	GLLPSAESIKL	132989	C4orf36
18	KTASINQNV	81930	KIF18A
19	KVFELDLVTL	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	1063	CENPF
21	YLMDDFSSL	1293	COL6A3
22	LMYPYIYHV	54954	FAM120C
23	ALLSPLSLA	4017, 9583	LOXL2, ENTPD4
24	KVWSDVTPL	4320, 4322	MMP11, MMP13
25	LLWGHPRVALA	25878	MXRA5
26	VLDGKVAVV	6660	SOX5
27	GLLGKVTSTV	51297	BPIFA1
28	IKVTDPQLEL	51297	BPIFA1
29	KMISAIPTL	94025	MUC16
30	IITEVITRL	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	94025	MUC16
32	VVMVLVLMML	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	94025	MUC16
35	VIKGLEEI	3832	KIF11
36	TVLQELINV	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	3832	KIF11
38	VLQQESNFL	63967	CLSPN
39	YLEDGFAYV	5558	PRIM2
40	KIWEELSVLEV	4102, 4105	MAGEA3, MAGEA6
41	IVTEIIEI	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	64151	NCAPG
43	LLIPFTIFM	1 237	CCR8
44	AVFNLVHV	56923	NMUR2
45	FLPVSVVYV	56923	NMUR2
46	ISLDEAVVSL	144455	E2F7
47	GLNGFNVLL	144455	E2F7
48	KISDFGLATV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	8532	CPZ
51	LDSEALLTL	84467	FBN3
52	TIGIPFPNV	83990	BRIP1
53	AQHLSTLLL	1469	CST1
54	YLVPGLVAA	64180	DPEP3
55	HLFDKIIKI	654463	FER1L6
56	VLQENSSDYQSNL	3188	HNRNP2

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
	TLYPGRFDYV	338322	NLRP10
58	HLLGEGAFAQV	699	BUB1
59	ALADGIKSFL	5296	PIK3R2
60	YLFSQGLQGL	2491	CENPI
61	ALYPKEITL	203102	ADAM32
62	SLVENIHVL	675	BRCA2
63	KLLPMVIQL	246	ALOX15
64	SLYAGSNNQV	246	ALOX15
65	SLSEKSPEV	158511, 728461	CSAG1, CSAG2
66	AMFPDTIPRV	285220	EPHA6
67	FLIENLLAA	3166	HMX1
68	QLMNLIRSV	51124	IER3IP1
69	LKVLKADVVL	259307	IL4I1
70	GLTEKTVLV	241 37, 285643	KIF4A, KIF4B
71	HMSGKLTNV	55771	PRR11
72	VLSTRVTNV	55771	PRR11
73	SVPKTLGV	11280	SCN11A
74	GLAFLPASV	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	6570	SLC18A1
76	FTAEFLEKV	79801	SHCBP1
77	ALYGNVQQV	91646	TDRD12
78	LFQSRIAGV	7579	ZSCAN20
79	TVLEEIGNRV	9133	CCNB2
80	VLTGQVHEL	10715	CERS1
81	ILAEPIYI	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	55655	NLRP2
83	GLLENSPHL	25788	RAD54B
84	FLLEREQLL	165055	CCDC138
85	KLLDKPEQFL	342184	FMN1
86	SLFSNIESV	54848	ARHGEF38
87	KLLSLLEEA	54848	ARHGEF38
88	LLLPLELSLA	374946	DRAXIN
89	SLAETIFIV	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	3359	HTR3A
92	RLFEEVLGV	9816	URB2
93	RLYGYFHDA	6790	AURKA
94	YLDEVAFML	1238	CCBP2
95	KLIDEDEPLFL	1767	DNAH5
96	ALDTTRHEL	93323	HAUS8
97	KLFEKSTGL	23421	ITGB3BP
98	FVQEKIPEL	84944	MAEL
99	TLFGIQLTEA	84944	MAEL
100	ALQSFEFRV	56130	PCDHB6

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
101	SLLEVNEASSV	149628	PYHIN1
102	GLYPVTLVGV	83696	TRAPPC9
103	YLADTVQKL	100526761, 54937	CCDC169-SOHLH2, SOHLH2
104	DLPTQEPALGTT	354	KLK3
105	AMLASQTEA	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	4477	MSMB
107	RVLPQGAVTGV	55247	NEIL3
108	FIANLPPELKA	6013	RLN1
109	ILGSFELQL	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	7047	TGM4
111	AQLEGKLVSI	3161	HMMR
112	ILAQDVAQL	24137	KIF4A
113	FLFLKEVKV	54596	L1TD1
114	LLFPSDVQTL	23397	NCAPH
115	ILHGEVNKV	54830	NUP62CL
116	ALLSSVAEA	9048	ARTN
117	TLLEGISRA	26256	CABYR
118	IAYNPNGNAL	3824	KLRD1
119	SLIEESEEL	284217	LAMA1
120	LQLJPLKGLSL	6241	RRM2
121	ALYVQAPTV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	150737, 92104	TTC30B, TTC30A
124	ALLRLFTI	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	11130	ZWINT
127	IMKATGLGIQL	154664	ABCA13
128	SILTNISEV	24	ABCA4
129	KMASKVTQV	132612	ADAD1
130	QLYGSAITL	158067	AK8
131	SLYPHFTLL	440138	ALG11
132	ALLNNVIEV	57101	ANO2
133	FLDGRPLTL	83734	ATG10
134	SLYKSFLQL	527	ATP6V0C
135	HLDTVKIEV	135152	B3GAT2
136	LLWDAPAKC	192134	B3GNT6
137	KLIYKDLVSV	85016	C11orf70
138	GIINKLVTV	440087	C12orf69
139	IILENIQSL	55732	C1orf1 12
140	FLDSQITTV	255119	C4orf22
141	NIDINNNEL	57082	CASC5
142	LLDAAHASI	284992	CCDC150
143	MLWESIMRV	166979	CDC20B
144	FLISQTPLL	60437	CDH26

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
145	ALEEKLENV	79172	CENPO
146	VVA AHLAGA	148113	CILP2
147	GLLSALENV	1269	CNR2
148	YLILSSHQL	1269	CNR2
149	NMADGQLHQV	728577, 79937, 100507170, 255313,	CNTNAP3B, CNTNAP3
150	VLLDMVHSL	653282, 728036, 728042, 728049, 728062, 728072, 728075, 728082, 728090, 728096	CT47A1 2, CT47A11, CT47A7, CT47A1 0, CT47A9, CT47A8, CT47A6, CT47A5, CT47A4, CT47A3, CT47A2, CT47A1
151	DISKRIQSL	100128553, 220429, 341689, 4253, 64693	CTAGE4, CTAGE10P, CTAGE16P, CTAGE5, CTAGE1
152	ILVTSIFFL	643	CXCR5
153	KLVELEHTL	203413	CXorf61
154	AIIKEIQT V	1588	CYP19A1
155	TLDSYLKAV	163720, 199974	CYP4Z2P, CYP4Z1
156	VILTSSPFL	10800	CYSLTR1
157	ILQDQGFLV	138009	DCAF4L2
158	YLDPLWHQL	2072	ERCC4
159	QLGPPVPTI	285966	FAM115C
160	TLQEWLTEV	167555	FAM151B
161	NLLDENVC L	26290	GALNT8
162	GLLGNNLTSL	51608	GET4
163	GLEERLYTA	29933	GPR132
164	MLIIRVPSV	80000	GREB1L
165	SLLDYEVS I	116444	GRIN3B
166	LLGDSSFFL	283254	HARBI1
167	LVVDEGSLVSV	92797	HELB
168	VIFEGEPMY L	84072	HORMAD1
169	ALADLSVAV	3363	HTR7
170	FIAAVVEKV	203100	HTRA4
171	LLLLDVPTA	10437	IFI30
172	SLYLQMNSLRTE	28426	IGHV3-43
173	RLIDIYKNV	338567	KCNK18
174	ALYSGDLHAA	157855	KCNU1
175	SLLDLVQSL	57536	KIAA1328
176	VQSGLRILL	57650	KIAA1524
177	ALINVLNAL	146909	KIF18B
178	SLVSWQLLL	3814	KISS1
179	TLGEIHKGV	402569	KPNA7
180	RLYEEEIRI	3887, 3889	KRT81, KRT83
181	LLWAPTAQA	389812	LCN15
182	GLQDGFQITV	284194, 654346	LGALS9B, LGALS9C
183	ALSYILPYL	147172	LRRC37BP1
184	ALDSTIAHL	149499	LRRC71
185	TLYQGLPAEV	80131	LRRC8E
186	SLLSLESRL	57408	LRTM1

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
187	SILKEDPFL	346389	MACC1
188	VLGEEQEGV	4108, 728269	MAGEA9, MAGEA9B
189	MAVSDLLIL	2862	MLNR
190	SLSTELFKV	4622, 4626	MYH4, MYH8
191	AAIEIFEKV	55728	N4BP2
192	TLLPSSGLVTL	344148	NCKAP5
193	ALFHMNILL	126206	NLRP5
194	KLLEEVQLL	126206	NLRP5
195	VIIQNLPAL	387129	NPSR1
196	TLHQWIYYL	120406	NXPE2
197	LGGPTSLLHV	390038	OR51D1
198	ILTNKVSV	119678	OR52E2
199	SVADLAHVL	27334	P2RY10
200	IMPTFDLTKV	203569, 389860	PAGE2, PAGE2B
201	LLFSLCEA	51050	PI15
202	ALAKDELSL	120379	PIH1D2
203	FLFVDPELV	146850	PIK3R6
204	SEWGSPHAAPV	5539	PPY
205	LAFGYDDEL	391004, 654348	PRAMEF17, PRAMEF16
206	GLDAFRIFL	431704	RGS21
207	KLFETVEEL	6121	RPE65
208	HLNNDNRNPL	6406	SEMG1
209	VLQTEELVAN	6406	SEMG1
210	GLAGDNIYL	6582	SLC22A2
211	LLTTVLINA	6582	SLC22A2
212	MTLSEIHAV	9153	SLC28A2
213	ILAVDGVLSV	169026	SLC30A8
214	ALFETLIQL	139420	SMEK3P
215	QIADIVTSV	139420	SMEK3P
216	ALSTVTPRI	166378	SPATA5
217	LLWPSSVPA	246777, 79400	SPESP1, NOX5
218	SLTGANITV	83932	SPRTN
219	GVVPTIQKV	64220	STRA6
220	ALSELERV	51298	THEG
221	IMLNSVEEI	387357	THEMIS
222	LLTGVFAQL	388564	TMEM238
223	ALHPVQFYL	93587	TRMT10A
224	LLFDWSGTGRADA	79465	ULBP3
225	FLPQPVPVLSV	57695	USP37
226	SLAGNLQEL	11023	VAX1
227	SEMEELPSV	26609, 425054, 51481	VCX, VCX3B, VCX3A
228	SLLELDGINLRL	221806	VWDE
229	YLYELEHAL	80217	WDR96
230	KLLNMIFSI	2829	XCR1

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
231	LLDDIFIRL	143570	XRRA1
232	LVVGGIATV	84614	ZBTB37
233	SLFESLEYL	132625	ZFP42

Tabla 2: Péptidos adicionales desvelados en el presente documento

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
234	VLLNEILEQV	64151	NCAPG
235	SLLNQPKAV	63967	CLSPN
236	KMSELQTYV	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	1063	CENPF
238	HLQEKLQSL	1063	CENPF
239	VIIKGLEEITV	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	3832	KIF11
241	KQFEGTVEI	675	BRCA2
242	KLQEEIPVL	1062	CENPE
243	GLAEFQENV	57405	SPC25
244	NVAEIVIH	83540	NUF2
245	ALLEEEGV	4103	MAGEA4
246	ALAGIVTNV	11077	HSF2BP
247	NLLIDDKGTIKL	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	983	CDK1
249	YLYQILQGI	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	983	CDK1
251	LLWGNLPEI	653820, 729533	FAM72B, FAM72A
252	SLMEKNQSL	24137, 285643	KIF4A, KIF4B
253	KLLAVIHEL	25788	RAD54B
254	ALGDKFLLRV	4608	MYBPH
255	FLMKNSDLYGA	79801	SHCBP1
256	FLNDIFERI	337873, 337874	HIST2H2BC, HIST2H2BD
257	KLIDHQGLYL	7579	ZSCAN20
258	QLVQRVASV	5683	PSMA2
259	GPGIFPPPPQP	10879	SMR3B
260	ALNESLVEC	55165	CEP55
261	GLAALAVHL	2175	FANCA
262	LLLEAVWHL	2175	FANCA
263	SIIEYLPTL	79915	ATAD5
264	TLHDQVHLL	2099	ESR1
265	FLLDKPQDLSI	346389	MACC1
266	FLLDKPQDL	346389	MACC1
267	YLLDMPLWYL	7153	TOP2A
268	SLDKDIVAL	7153	TOP2A
269	GLLDCPIFL	2177	FANCD2
270	TLLTFFHEL	55215	FANCI

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	ID de gen o genes	Símbolo o símbolos oficiales de los genes
271	VLIEYNFSI	55215	FANCI
272	FVMEGEPPKL	348654	GEN1
273	SLNKQIETV	57650	KIAA1524
274	TLYNPERTITV	10642, 10643	IGF2BP1, IGF2BP3
275	AVPPPPSSV	10642	IGF2BP1
276	RMPTVLQCV	9622	KLK4
277	KLQEELNKV	3161	HMMR
278	VLEDKVLSV	128239	IQGAP3
279	VLMDEGAVLTL	54596	L1TD1
280	HLWGHALFL	89866	SEC16B
281	LLLESDPKVYSL	6491	STIL
282	SLYALHVKA	79001	VKORC1
283	ALSELLQQV	9816	URB2
284	KLMDPGSLPPL	2118	ETV4
285	MLLDTVQKV	54892	NCAPG2
286	FLTEMVHFI	93517	SDR42E1
287	KIQEILTQV	10643	IGF2BP3
288	SLYKGLLSV	25788	RAD54B
J = Fosfoserina			

La presente invención se refiere al péptido de acuerdo con la invención (véase la Tabla 1) y a su uso en la inmunoterapia de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH), cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC, CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC).

También se desvelan en el presente documento los péptidos, solos o en combinación, seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 274, 21, 23, 25, 157, 168, 11, 253, 85, 89, 40, 264, 155, 233 y 245 (véanse las Tablas 1, 2 y 10), y sus usos en la inmunoterapia de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y leucemia linfocítica crónica (CLL).

La presente invención adicionalmente se refiere al péptido de acuerdo con la presente invención, que tiene la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase-I o, en una forma alargada, tal como una variante en longitud, del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase-II.

La presente invención se refiere además al péptido de acuerdo con la presente invención, en donde este péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 14.

La presente invención se refiere además al péptido de acuerdo con la presente invención, en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos y en donde dichos enlaces no peptídicos se seleccionan del grupo que consiste en enlaces peptídicos inversos, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$. La presente divulgación se refiere además a los péptidos desvelados en el presente documento, en donde el péptido está modificado y/o incluye enlaces no peptídicos.

También se desvelan péptidos, en donde el péptido es parte de una proteína de fusión, en particular está fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada con el antígeno HLA-DR (II) o está fusionado con (o en la secuencia de) un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico para las células dendríticas.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con la presente invención. La presente invención se refiere además al ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, que es ADN, ADNc, PNA, ARN o combinaciones de los mismos.

- 5 La presente invención se refiere además a un vector de expresión capaz de expresar y/o que expresa un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere además al péptido de acuerdo con la presente invención, a un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, o a un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, para utilizarse en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en particular en el tratamiento de cáncer.

La presente invención se refiere además a los anticuerpos que son específicos contra el péptido de acuerdo con la presente invención o contra complejos de dicho péptido de acuerdo con la presente invención con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y a los métodos para la elaboración de los mismos.

La presente invención se refiere además un receptores de células T (TCR), en particular a los receptores de células T solubles (sTCR), y a los receptores de células T (TCR) clonados diseñados en células T autólogas o alogénicas, y a los métodos para la elaboración de los mismos, así como a las linfocitos citolíticos naturales (NK) o a otras células portadoras de dichos receptores de células T (TCR) o que reaccionan de forma cruzada con dichos receptores de células T (TCR).

Los anticuerpos y receptores de células T (TCR) son las realizaciones adicionales del uso inmunoterapéutico del péptido de acuerdo con la invención disponibles.

- 25 La presente invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión como se describe anteriormente. La presente invención se refiere además a la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, que es una célula presentadora de antígeno, y preferentemente es una célula dendrítica.

30 La presente invención se refiere además a un método para producir el péptido de acuerdo con la presente invención, en donde este método comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, y aislar el péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere además al método de acuerdo con la presente invención, en donde el antígeno se carga sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o una célula presentadora de antígeno artificial, poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere además al método de acuerdo con la presente invención, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar o que expresa el péptido que consiste en SEQ ID NO. 14 de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere además a las células T activadas, producidas mediante el método de acuerdo con la presente invención, en donde dicha célula T reconoce selectivamente una célula que presenta un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención interactuando a través de su receptor de células T con el péptido en complejo con HLA.

Se desvela en el presente documento un método para aniquilar las células diana en un paciente, en donde las células diana expresan aberrantemente un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente divulgación, en donde el método comprende administrar al paciente, un número efectivo de células T producidas de acuerdo con la presente divulgación.

La presente invención se refiere además al uso del péptido de la invención, al ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, al vector de expresión de acuerdo con la presente invención, a la célula de acuerdo con la presente invención, al linfocito T activado, al receptor de células T o al anticuerpo o a otras moléculas que se unen al péptido y/o al péptido-MHC de acuerdo con la presente invención, como un medicamento o en la elaboración de un medicamento. Preferentemente, dicho medicamento es activo contra el cáncer.

Preferentemente, dicho medicamento es adecuado y se utiliza para una terapia celular, una vacuna o una proteína basada en un receptor de células T (TCR) o anticuerpo soluble.

La presente invención se refiere además al uso de acuerdo con la presente invención, en donde dichas células de cáncer son células de HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, o CLL.

La presente invención se refiere además a biomarcadores basados en el péptido de acuerdo con la presente invención,

en el presente documento denominados como "dianas" que se pueden utilizar en el diagnóstico de cáncer, preferentemente de HCC, CRC, GB, GC, cáncer esofágico, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA, OC, MCC, melanoma, cáncer de mama, SCLC, NHL, AML, GBC, CCC, UBC, UEC, y CLL. El marcador puede ser ya sea la sobre-presentación de los péptidos por sí mismos, o la sobre-expresión de los genes correspondientes. Los marcadores

5 también se pueden utilizar para predecir la probabilidad de éxito de un tratamiento, preferentemente de una inmunoterapia, y más preferentemente de una inmunoterapia con dirección a la misma diana que se identifica mediante el biomarcador. Por ejemplo, un anticuerpo o receptor de células T (TCR) soluble se puede utilizar para tefir secciones del tumor para detectar la presencia de un péptido de interés en complejo con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

10 Opcionalmente, el anticuerpo tiene una función efectora adicional, tal como un dominio inmunoestimulante o una toxina.

La presente invención también se refiere al uso de estas dianas novedosas en el contexto del tratamiento de cáncer.

15 MMP1 codifica un miembro de la familia de la peptidasa M10 de las metaloproteinasas de matriz (MMP). Las proteínas en esta familia están implicadas en la rotura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, tales como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejido, así como en procesos de enfermedad, tales como artritis y metástasis (RefSeq, 2002). Muchos autores han demostrado una correlación positiva entre el patrón de la expresión de MMP y el potencial invasivo del tumor y metastásico, incluyendo: cáncer rectal y gástrico, carcinoma pulmonar, cáncer de mama, de ovario, de próstata, de tiroides y tumores cerebrales (Velinov et al., 2010). MMP1 se identificó como un biomarcador con expresión dependiente de la fase tumoral en carcinoma de células escamosas laríngeo (Hui et al., 2015). Los pacientes con cáncer de mama con células tumorales circulantes con transición epitelial-mesenquimal (CTC_EMT) en sangre periférica tenían expresión significativamente aumentada de MMP1 en células

20 tumorales ($p = 0,02$) y estroma asociado al tumor ($p = 0,05$) que aquellos de los pacientes sin CTC_EMT (Cierna et al., 2014). En un modelo de ratón la expresión y la secreción de MMP1 se bloqueó mediante un anticuerpo monoclonal anti-FGFR3 específico que bloqueó sustancialmente la progresión del tumor (Du et al., 2014).

La estimulación de una respuesta inmunitaria es dependiente de la presencia de antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmunológico del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados con tumores ha elevado la posibilidad de utilizar el sistema inmunológico de un hospedador para intervenir en el crecimiento tumoral. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las secciones tanto humoral como celular del sistema inmunológico para la inmunoterapia de cáncer.

35 Los elementos específicos de la respuesta celular inmunitaria son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de las células T a partir de las poblaciones de células infiltrantes del tumor o a partir de la sangre periférica, sugiere que estas células tienen una función importante en la defensa inmunológica natural contra el cáncer. Las células T positivas para CD8 en particular, que reconocen los péptidos portadores de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I de usualmente 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados a partir de las proteínas o los productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, tienen una función importante en esta respuesta. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del ser humano son también designadas como antígenos de leucocitos humanos (HLA).

45 La expresión "respuesta de células T" significa la proliferación y activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. Para las células T citotóxicas restringidas al MHC clase I, las funciones efectoras pueden ser la lisis de las células diana naturalmente presentadoras del péptido o impulsadas por el precursor del péptido, la secreción de citocinas, preferentemente interferón-gamma, TNF-alfa, o IL-2 inducida por el péptido, la secreción de las moléculas efectoras, preferentemente granzimas o perforinas, inducida por el péptido, o la desgranulación.

50 El término "péptido" se utiliza en el presente documento para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados unos con otros típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos son preferentemente de 9 aminoácidos de longitud, pero pueden ser tan cortos como de 8 aminoácidos de longitud, y siempre que sean de 10, 11, 12 o 13 aminoácidos o más largos, y en el caso de los péptidos de MHC clase II (variantes alargadas del péptido de la invención), pueden ser tan largos como de 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más aminoácidos de longitud.

60 Adicionalmente, el término "péptido" incluirá las sales de una serie de residuos de aminoácidos, conectados unos con otros típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente, las sales son las sales farmacéuticas aceptables de los péptidos, tales como, por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoro-acetato). Se debe observar que las sales de los péptidos de acuerdo con la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado *in vivo*, debido a que los péptidos no son sales *in vivo*.

65 El término "péptido" también incluirá "oligopéptido". El término "oligopéptido" se utiliza en el presente documento para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados unos con otros típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crítica para la

invención, siempre que se mantenga el epítipo o los epítipos correctos en el mismo. Los oligopéptidos son típicamente de menos de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos de longitud, y mayores que aproximadamente 15 aminoácidos de longitud.

- 5 El término "polipéptido" designa una serie de residuos de aminoácidos, conectados unos con otros típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crítica para la invención, siempre que se mantengan los epítipos correctos. En contraste con los términos péptido u oligopéptido, el término polipéptido pretende referirse a las moléculas que contienen más de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos.

- 10 Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifique para dicha molécula es "inmunogénico" (y por consiguiente, es un "inmunógeno" dentro de la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para inducir una respuesta de células T. Por consiguiente, un "inmunógeno" sería una molécula que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria, y en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de células T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), el oligopéptido, y/o la proteína que se utiliza para elevar los anticuerpos específicos o los receptores de células T (TCR) contra el mismo.

- 20 Un "epítipo" de células T clase I requiere de un péptido corto que se une a un receptor de MHC clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC clase I, beta-2-microglobulina, y péptido) que puede ser reconocido por una célula T portadora de un receptor de células T emparejado que se enlaza al complejo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)/péptido con una afinidad apropiada. Los péptidos que se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I son típicamente de 8 a 14 aminoácidos de longitud, y más típicamente de 9 aminoácidos de longitud.

- 30 En los seres humanos hay tres diferentes loci genéticos que codifican las moléculas de MHC clase I (las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del ser humano son también designadas como antígenos de leucocitos humanos (HLA)): HLA-A, HLA-B, y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02, y HLA-B*07, son los ejemplos de diferentes alelos de MHC clase I que se pueden expresar a partir de estos loci.

- 35 Tabla 1: 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 et al. (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 unión. Para más detalles véase Chanock et al. (Chanock et al., 2004).

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1 %
A*02	Afroamericana (América del Norte)	34,1 %
A*02	Asioamericana (América del Norte)	43,2 %
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3 %
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4 %
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2 %
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6 %
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7 %
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3 %
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7 %
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8 %
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7 %
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1 %
DR1	Afroamericana (América del Norte)	13,20 %
DR2	Afroamericana (América del Norte)	29,80 %
DR3	Afroamericana (América del Norte)	24,80 %
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10 %
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10 %

(continuación)

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70 %
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20 %
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10 %
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80 %
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80 %
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80 %
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20 %
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60 %
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00 %
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10 %
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40 %
DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70 %
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60 %
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30 %
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20 %
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20 %
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80 %
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00 %
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10 %
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20 %
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60 %
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10 %
A*24	Filipinas	65 %
A*24	Nenets de Rusia	61 %
A*24:02	Japón	59 %
A*24	Malasia	58 %
A*24:02	Filipinas	54 %
A*24	India	47 %
A*24	Corea del Sur	40 %
A*24	Sri Lanka	37 %
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 péptido de la invención, preferentemente cuando se incluye en una vacuna, como se describe en el presente documento, se une a A*02. Una vacuna también puede incluir los péptidos de MHC clase II de unión pan. Por consiguiente, la vacuna se puede utilizar para el tratamiento de cáncer en los pacientes que son positivos para A*02, mientras que no es necesaria ninguna selección para los alotipos de MHC clase II debido a la naturaleza de unión pan de estos péptidos.

Si un péptido de A*02 de la invención se combina con péptidos que se unen a otro alelo, por ejemplo, A*24, se puede tratar un porcentaje más alto de cualquier población de pacientes comparándose con la dirección hacia cualquier alelo de MHC clase I solo. Aunque en la mayoría de las poblaciones menos del 50 % de los pacientes podrían ser resueltos

por cualquier alelo solo, una vacuna que comprenda los epítomos de HLA-A*24 y HLA-A*02 puede tratar al menos al 60 % de los pacientes en cualquier población relevante. De una manera específica, los siguientes porcentajes de los pacientes serán positivos para al menos uno de estos alelos en diversas regiones: EUA 61 %, Europa Occidental 62 %, China 75 %, Corea del Sur 77 %, Japón 86 % (calculados a partir de www.allele frequencies.net).

En una realización preferida, la expresión "secuencia de nucleótidos" se refiere a un heteropolímero de desoxiribonucleótidos.

La secuencia de nucleótidos que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido particular, se puede presentar naturalmente o se puede construir sintéticamente. En términos generales, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos, y proteínas de esta invención, se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y enlazadores de oligonucleótidos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar un gen sintético que es capaz de expresarse en una unidad de transcripción recombinante que comprende los elementos reguladores derivados de un operón microbiano o viral.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "un nucleótido que codifica (o que codifica) un péptido", se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido, incluyendo codones de inicio y de parada artificiales (hechos por el hombre) compatibles para el sistema biológico, la secuencia va a ser expresada, por ejemplo, por una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de receptores de células T (TCR).

Como se utiliza en el presente documento, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye ácido nucleico tanto de una sola cadena como de doble cadena. Por consiguiente, por ejemplo, para el ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto lo indique de otra manera, se refiere al ADN de una sola cadena de esa secuencia, al dúplex de esa secuencia con su complemento (ADN de doble cadena), y al complemento de dicha secuencia.

La expresión "región codificante" se refiere a la porción de un gen que codifica ya sea naturalmente o bien normalmente el producto de expresión de ese gene en su medio ambiente genómico natural, es decir, la región codificante *in vivo* para el producto de expresión nativo del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado ("normal"), mutado o alterado, o incluso puede derivar de una secuencia de ADN, o gen, completamente sintetizado en el laboratorio empleando los métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia de la síntesis de ADN.

La expresión "producto de expresión" significa el polipéptido o la proteína que es el producto de traducción natural del gen y cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y, por consiguiente, que codifique los mismos aminoácidos.

El término "fragmento", cuando se hace referencia a una secuencia codificante, significa una porción de ADN que comprende menos de la región codificante completa, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma función o actividad biológica que el producto de expresión de la región codificante completa.

La expresión "segmento de ADN" se refiere a un polímero de ADN, en la forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ADN más grande, el cual se ha derivado del ADN aislado al menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, libre de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que haga posible la identificación, manipulación y recuperación del segmento y sus secuencias de nucleótidos componentes mediante los métodos bioquímicos convencionales, por ejemplo, utilizando un vector de clonación. Estos segmentos se proporcionan en la forma de un marco de lectura abierta no interrumpido por secuencias no traducidas internas, o intrones, los cuales están típicamente presentes en los genes eucarióticos. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes corriente abajo desde el marco de lectura abierta, en donde las mismas no interfieran con la manipulación o expresión de las regiones codificantes.

El término "cebador" significa una secuencia de ácido nucleico corta que se puede emparejar con una cadena de ADN y puede proporcionar un extremo 3'-OH libre en el cual una polimerasa de ADN empieza la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótido.

El término "promotor" significa una región de ADN implicada en la unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

El término "aislado" significa que el material se elimina de su medio ambiente original (por ejemplo, el medio ambiente natural, si se presenta naturalmente). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se presenta naturalmente presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Esos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o esos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y todavía estarían aislados debido a que dicho vector o dicha composición no es parte de su medio ambiente natural.

Los polinucleótidos y polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, que se dan a conocer de acuerdo con la presente

invención, también pueden estar en una forma "purificada". El término "purificada" no requiere de una pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa, y puede incluir las preparaciones que estén altamente purificadas o las preparaciones que estén sólo parcialmente purificadas, como son entendidos estos términos por aquellos con experiencia en el campo pertinente. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una biblioteca de ADNc se han purificado convencionalmente hasta la homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de partida o del material natural hasta al menos un orden de magnitud, preferentemente dos o tres órdenes, y de una manera muy preferible cuatro o cinco órdenes de magnitud. Adicionalmente, se abarca expresamente un polipéptido reivindicado que tiene una pureza preferentemente del 99,999 %, o de al menos el 99,99 % o el 99,9 %; e incluso deseablemente del 99 % en peso o mayor.

Los ácidos nucleicos y los productos de expresión de polipéptidos que se dan a conocer de acuerdo con la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen estos ácidos nucleicos y/o esos polipéptidos, pueden estar en una "forma enriquecida". Como se utiliza en el presente documento, el término "enriquecida" significa que la concentración del material es al menos aproximadamente 2, 5, 10, 100 o 1,000 veces su concentración natural (por ejemplo), convenientemente del 0,01 % en peso, preferentemente de al menos aproximadamente el 0,1 % en peso. También se contemplan las preparaciones enriquecidas de aproximadamente el 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, y 20 % en peso. Las secuencias, construcciones, vectores, clones, y otros materiales que comprenden la presente invención pueden estar convenientemente en una forma enriquecida o aislada. La expresión "fragmento activo" significa un fragmento, usualmente de un péptido, polipéptido o secuencia de ácido nucleico, que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que tiene una actividad inmunogénica), cuando se administra, solo u opcionalmente con un adyuvante adecuado o en un vector, a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo, a un conejo o un ratón, y también incluyendo a un ser humano, en donde esta respuesta inmunitaria toma la forma de estimular una respuesta de células T dentro del animal receptor, tal como un ser humano. De una manera alternativa, el "fragmento activo" también se puede utilizar para inducir una respuesta de células T *in vitro*.

Como se utilizan en el presente documento, los términos "porción", "segmento" y "fragmento", cuando se utilizan en relación con los polipéptidos, se refieren a una secuencia continua de residuos, tales como residuos de aminoácidos, en donde esta secuencia forma un subconjunto de una secuencia más grande. Por ejemplo, si un polipéptido se sometiera al tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas comunes, tales como tripsina o quimiotripsina, los oligopéptidos resultantes del tratamiento representarían porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido de partida. Cuando se utilizan en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos mediante el tratamiento de estos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "porcentaje de identidad" o "porcentaje idéntico", cuando se hace referencia a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después del alineamiento de la secuencia que se vaya a comparar (la "secuencia comparada") con la secuencia descrita o reclamada (la "secuencia de referencia"). El porcentaje de identidad se determina entonces de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

en donde C es el número de las diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada sobre la longitud de alineamiento entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, en donde:

- (i) cada base o aminoácido en la secuencia de referencia que no tenga una base o aminoácido alineado correspondiente en la secuencia comparada, y
- (ii) cada hueco en la secuencia de referencia, y
- (iii) cada base o aminoácido alineado en la secuencia de referencia que sea diferente de una base o aminoácido alineado en la secuencia comparada, constituye una diferencia, y
- (iiii) el alineamiento tiene que empezar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

y R es el número de bases o de aminoácidos en la secuencia de referencia sobre la longitud del alineamiento con la secuencia comparada, en donde cualquier hueco creado en la secuencia de referencia también se cuenta como un base o aminoácido.

Si existe un alineamiento entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para el cual el porcentaje de identidad calculado anteriormente es aproximadamente igual o mayor a un porcentaje de identidad mínimo especificado, entonces la secuencia comparada tiene el porcentaje de identidad mínimo especificado con la secuencia de referencia, incluso cuando puedan existir alineamientos en los cuales el porcentaje de identidad calculado anteriormente en el presente documento sea menor que el porcentaje de identidad especificado.

Como se menciona anteriormente, la presente divulgación, por consiguiente, proporciona un péptido que comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, o una variante de las mismas que sea el 88 % homóloga a las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, o una variante de las mismas que induzca a las células T a reaccionar de forma cruzada con dicho péptido. Los péptidos de la presente divulgación tienen la capacidad para unirse a una molécula

del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase-I o las versiones alargadas de estos péptidos para la clase II.

En la presente invención, el término "homóloga" se refiere al grado de identidad (véase el porcentaje de identidad anteriormente) entre secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir, secuencias de péptidos o polipéptidos. La "homología" anteriormente mencionada se determina comparando dos secuencias alineadas bajo condiciones óptimas sobre las secuencias que se vayan a comparar. Dicha homología de la secuencia se puede calcular mediante la creación de un alineamiento utilizando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW. El software de análisis de secuencias comúnmente disponible, de una manera más específica, Vector NTI, GENETYX, u otras herramientas, se proporcionados por las bases de datos públicas.

Una persona experta en la materia será capaz de evaluar si las células T inducidas por una variante de un péptido específico serán capaces de reaccionar de forma cruzada con el péptido por sí mismo (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

Por una "variante" de la secuencia de aminoácidos dada, los inventores quieren decir que se alteran las cadenas laterales, por ejemplo, de uno o dos de los residuos de aminoácidos (por ejemplo, mediante su reemplazo con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido o alguna otra cadena lateral que se presente naturalmente), de tal manera que el péptido todavía sea capaz de unirse a una molécula de antígenos de leucocitos humanos (HLA) de una manera sustancialmente igual a aquella de un péptido que consista en la secuencia de aminoácidos dada que consista en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288. Por ejemplo, un péptido se puede modificar de tal manera que al menos mantenga, si no es que mejore, la capacidad para interactuar con, y para unirse a, el surco de unión de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) adecuada, tal como HLA-A*02 o -DR, y de tal manera que al menos mantenga, si no es que mejore, la capacidad para unirse al receptor de células T (TCR) de las células T activadas.

Estas células T posteriormente pueden reaccionar de forma cruzada con las células y aniquilar a las células que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido cognado, como se define en los aspectos de la invención. Como se puede derivar a partir de la bibliografía científica y de las bases de datos (Rammensee et al., 1999; Godkin et al., 1997), ciertas posiciones de los péptidos que se enlazan a los antígenos de leucocitos humanos (HLA) son típicamente residuos de ancla que forman una secuencia de núcleo que se ajusta al motivo de unión del receptor de antígenos de leucocitos humanos (HLA), la cual es definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas de polipéptido que constituyen el surco de unión. Por consiguiente, una persona experta en la materia sería capaz de modificar las secuencias de aminoácidos estipuladas en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, mediante el mantenimiento de los residuos de ancla conocidos, y sería capaz de determinar si estas variantes mantienen la capacidad para unirse a las moléculas de MHC clase I o II. Las variantes de los péptidos desvelados en el presente documento conservan la capacidad para unirse al receptor de células T (TCR) de las células T activadas, las cuales posteriormente pueden reaccionar de forma cruzada con, y aniquilar a, las células que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido cognado, como se define en la presente divulgación.

Los péptidos originales (no modificados), como se da a conocer en el presente documento, se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en diferentes sitios, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se menciona de otra manera. Preferentemente estas sustituciones se localizan al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de una naturaleza conservadora, por ejemplo, en donde un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de una estructura y características similares, tal como en donde un aminoácido hidrófobo es reemplazado por otro aminoácido hidrófobo. Sería todavía más conservador el reemplazo de aminoácidos del mismo tamaño o de un tamaño y naturaleza química similares, tal como en donde la leucina es reemplazada por isoleucina. En los estudios de las variaciones de secuencias en las familias de las proteínas homólogas que se presentan naturalmente, ciertas sustituciones de aminoácidos son toleradas con mayor frecuencia que otras, y éstas con frecuencia muestran una correlación con las similitudes en el tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, y ésta es la base para definir "las sustituciones conservativas".

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

Las sustituciones menos conservativas podrían implicar el reemplazo de un aminoácido por otro que tenga características similares pero que sea de un tamaño un poco diferente, tal como el reemplazo de un residuo de alanina por un residuo de isoleucina. Los reemplazos altamente no conservadores podrían implicar la sustitución con un aminoácido ácido para uno que sea polar, o incluso para uno que sea de un carácter básico. Sin embargo, estas sustituciones de "radicales" no se pueden descartar como potencialmente inefectivas debido a que los efectos químicos no son totalmente predecibles, y las sustituciones de radicales podrían bien dar lugar a efectos sorprendidos no predecibles de otra manera a partir de los simples principios químicos.

Desde luego, estas sustituciones pueden implicar estructuras diferentes de los L-aminoácidos comunes. Por consiguiente, los D-aminoácidos se podrían utilizar para sustituir a los L-aminoácidos comúnmente encontrados en los péptidos antigénicos de la invención, e incluso todavía son abarcados por la divulgación del presente documento.

5 En adición, también se pueden utilizar aminoácidos no estándares (es decir, diferentes de los aminoácidos proteinogénicos comunes que se presentan naturalmente) para propósitos de sustitución con el fin de producir los inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos de acuerdo con la presente invención.

10 Si se encuentran sustituciones en más de una posición para dar como resultado un péptido con una actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más adelante, entonces se probarán combinaciones de estas sustituciones para determinar si las sustituciones combinadas dan como resultado efectos aditivos o sinérgicos sobre la antigenicidad del péptido. Cuando mucho, no más de cuatro posiciones en el péptido serían simultáneamente sustituidas.

15 Un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en el presente documento, puede tener uno o dos aminoácidos no de ancla (véase más adelante con respecto al motivo de ancla) intercambiados sin que se cambie sustancialmente o sea negativamente afectada la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I o II, al compararse con el péptido no modificado. En otra realización, en un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se indica en el presente documento, uno o dos aminoácidos se pueden intercambiar con sus componentes de intercambio conservativos (véase más adelante en el presente documento), sin que se cambie sustancialmente o sea negativamente afectada la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I o II, al compararse con el péptido no modificado.

25 Los residuos de aminoácidos que no contribuyan sustancialmente a las interacciones con el receptor de células T se pueden modificar mediante el reemplazo con otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de las células T y no elimine la unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) relevante. Por consiguiente, aparte de la condición dada, el péptido de la divulgación puede ser cualquier péptido (mediante cuyo término los inventores incluyen oligopéptido o polipéptido) que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o variante de las mismas, como se han dado.

Tabla 2: Variantes y motivos de los péptidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 4, 13 y 15

Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 4	V	L	F	G	E	L	P	A	L
Variantes									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I
		T							
		T							A
		Q							V
		Q							I
		Q							

ES 2 983 924 T3

(continuación)

		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 15	G	L	P	S	A	T	T	T	V
Variantes		I							L
		I							I
		I							
		I							A
		M							L
		M							I
		M							
Variantes		M							A
		A							L
		A							I
		A							
		A							A
		V							L
		V							I
		V							
		V							A
		T							L
		T							I
		T							
		T							A
		Q							L
		Q							I
		Q							
		Q							A
Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SEQ ID NO: 13	R	L	H	D	E	N	I	L	L
Variantes									V
									I
									A
		M							V
		M							I
		M							
		M							A
		A							V
		A							I
		A							
		A							A
		V							V
		V							I
		V							
		V							A
		T							V
		T							I

(continuación)

	T							
	T							A
	Q							V
	Q							I
	Q							
	Q							A

Los péptidos más largos (alargados) también pueden ser adecuados. Es posible que los epítomos de MHC clase I, aunque usualmente son de entre 8 y 11 aminoácidos de largo, se generan mediante el procesamiento de péptidos a partir de péptidos más largos o proteínas que incluyan el epítomo actual. Se prefiere que los residuos que flanqueen el epítomo actual sean residuos que no afecten sustancialmente a la disociación proteolítica necesaria para exponer al epítomo actual durante el procesamiento.

Los péptidos adicionales desvelados en el presente documento se pueden alargar por hasta cuatro aminoácidos, es decir, se pueden agregar 1, 2, 3 o 4 aminoácidos a cualquier extremo en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4. Las combinaciones de los alargamientos como se describen en el presente documento se pueden encontrar en la Tabla 3.

Tabla 3: Combinaciones de los alargamientos de los péptidos de la invención

Extremo C	Extremo N
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
Extremo N	Extremo C
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 el alargamiento/la extensión pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualesquiera otros aminoácidos. El alargamiento se puede utilizar para mejorar la estabilidad o solubilidad de los péptidos.

Por consiguiente, los epítomos de la presente invención pueden ser idénticos a los epítomos asociados con tumores o específicos de tumores que se presentan naturalmente o pueden incluir epítomos que difieran por no más de cuatro residuos a partir del péptido de referencia, siempre que tengan una actividad antigénica sustancialmente idéntica.

En una realización alternativa, el péptido se alarga en cualquiera o ambos lados por más de 4 aminoácidos, preferentemente hasta una longitud total de hasta 30 aminoácidos. Esto puede conducir a péptidos que se unen al MHC clase II. La unión a MHC clase II se puede probar mediante los métodos conocidos en la técnica.

De conformidad con lo anterior, la presente divulgación proporciona péptidos y variantes de epítomos de MHC clase I, en donde el péptido o variante tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente de entre 8 y 30, y más preferentemente de entre 8 y 14, es decir, de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 aminoácidos, en el caso de los péptidos que se enlazan a clase II alargados, la longitud también puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 aminoácidos.

Desde luego, el péptido o la variante de acuerdo con la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I o II. La unión de un péptido o de una variante a un complejo MHC se puede probar mediante los métodos conocidos en la técnica.

Preferentemente, cuando las células T específicas para un péptido de acuerdo con la presente invención se prueban contra los péptidos sustituidos, la concentración del péptido en la cual los péptidos sustituidos logran un incremento medio máximo en la lisis en relación con el fondo no es mayor que aproximadamente 1 mM, preferentemente no es mayor que aproximadamente 1 μ M, más preferentemente no es mayor que aproximadamente 1 nM, y todavía más

preferentemente no es mayor que aproximadamente 100 pM, y de una manera muy preferible no es mayor que aproximadamente 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por las células T a partir de más de un individuo, de al menos dos, y de una manera muy preferible de tres individuos.

- 5 El péptido de la invención consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 14. La presente divulgación también se refiere a un péptido que consiste o que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288.

- 10 "Que consiste esencialmente en" significará que un péptido, en adición a la secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, o una variante de las mismas, contiene estiramientos de aminoácidos N- y/o C-terminalmente localizados adicionales que no necesariamente forman parte del péptido que funciona como un epítipo para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

- 15 No obstante, estos estiramientos pueden ser importantes para proporcionar una introducción eficiente del péptido de acuerdo con la presente invención en las células. En una realización desvelada en el presente documento, el péptido es parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada con el antígeno HLA-DR (p33, en lo siguiente "I") como se deriva del NCBI, GenBank Número de acceso X00497. En otras fusiones, los péptidos desvelados en el presente documento se puede fusionar con un anticuerpo como se describe en el presente documento, o con una parte funcional del mismo, en particular en una
20 secuencia de un anticuerpo, como para ser específicamente dirigidos por este anticuerpo, o, por ejemplo, con o en un anticuerpo que sea específico para las células dendríticas, como se describe en el presente documento.

- 25 En adición, el péptido o la variante se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con el objeto de provocar una respuesta inmunitaria más fuerte. Los métodos para dicha optimización de una secuencia peptídica son bien conocidos en la materia e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o enlaces no peptídicos.

- 30 En un enlace peptídico inverso, los residuos de aminoácidos no se unen mediante enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico se invierte. Estos peptidomiméticos retro-inversos se pueden hacer empleando los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como aquellos descritos en Meziere et al. (1997) (Meziere et al., 1997). Este planteamiento involucra hacer pseudo-péptidos que contengan cambios que involucren el segmento principal, y no la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al. (Meziere et al., 1997) muestran que para la unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y las respuestas de células T auxiliares, estos pseudo-péptidos son útiles. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces de NH-CO en lugar de los enlaces peptídicos de CO-NH, son mucho
35 más resistentes a la proteólisis.

- Un enlace no peptídico es, por ejemplo, -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH = CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas de polipéptido que implican polipéptidos sintetizados
40 mediante los procedimientos convencionales, y el enlace no peptídico sintetizado mediante la reacción de un amino aldehído y un aminoácido en la presencia de NaCNBH₃.

- Los péptidos que comprenden las secuencias descritas anteriormente se pueden sintetizar con los grupos químicos adicionales presentes en sus términos amino y/o carboxilo, para mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y/o afinidad
45 de los péptidos. Por ejemplo, se pueden agregar grupos hidrófobos, tales como los grupos carbobenzoxilo, dansilo o t-butiloxicarbonilo, a los términos amino de los péptidos. De la misma manera, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenil-metoxi-carbonilo en los términos amino de los péptidos. Adicionalmente, se puede agregar el grupo hidrófobo, t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido, a los términos carboxilo de los péptidos.

- 50 Además, el péptido de la invención se puede sintetizar para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, se puede utilizar el isómero-D de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido, en lugar del isómero-L usual. Todavía además, al menos uno de los residuos de aminoácidos de los péptidos desvelados en el presente documento puede estar sustituido por uno de los residuos de aminoácidos bien conocidos que no sean de origen natural. Las alteraciones tales como éstas pueden servir para aumentar la estabilidad, biodisponibilidad y/o acción de enlace de los péptidos.
55

- De una manera similar, un péptido o variante desvelados en el presente documento se puede modificar químicamente mediante la reacción de los aminoácidos específicos ya sea antes o después de la síntesis del péptido. Los ejemplos para estas modificaciones son bien conocidos en la materia y se resumen, por ejemplo, en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3a Edición, CRC Press, 2004 (Lundblad, 2004). La modificación química de los
60 aminoácidos incluye, pero no se limita a, modificación mediante acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductiva, trinitrobencilación de los grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencen sulfónico (TNBS), modificación con amida de los grupos carboxilo, y modificación con sulfhidrilo mediante oxidación con ácido per fórmico de cisteína hasta ácido cisteico, formación de derivados mercúricos, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol, reacción con maleimida, carboxi-metilación con ácido yodo-acético o yodo-acetamida, y
65 carbamoiación con cianato a un pH alcalino, aunque sin limitarse a las mismas. En este aspecto, se remite a la persona experta al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Editores Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-

2000) (Coligan et al., 1995) para ver una metodología más extensa en relación con la modificación química de las proteínas.

Dicho de una manera breve, la modificación, por ejemplo, de los residuos de arginilo en las proteínas, con frecuencia se basa en la reacción de compuestos de dicarbonilo vecinales, tales como fenil-glioxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción de metil-glioxal con residuos de arginina. La cisteína se puede modificar sin la modificación concomitante de otros sitios nucleofílicos, tales como lisina e histidina. Como un resultado, está disponible un gran número de reactivos para la modificación de cisteína. Los sitios web de compañías tales como Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) proporcionan información sobre los reactivos específicos.

También es común la reducción selectiva de los enlaces de disulfuro en las proteínas. Los enlaces de disulfuro se pueden formar y oxidar durante el tratamiento por calor de los productos biofarmacéuticos. Se puede utilizar el reactivo K de Woodward para modificar los residuos de ácido glutámico específicos. Se puede utilizar la N-(3-(dimetil-amino)-propil)-N'-etil-carbodiimida para formar reticulaciones intra-moleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el pirocarbonato de dietilo es un reactivo para la modificación de los residuos de histidilo en las proteínas. La histidina también se puede modificar utilizando el 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α -amino, por ejemplo, es útil en la unión de los péptidos a las superficies o en la reticulación de las proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de unión de poli(etilenglicol) y el principal sitio de modificación en la glucosilación de las proteínas. Los residuos de metionina en las proteínas se pueden modificar, por ejemplo, con yodoacetamida, bromo-etil-amina y cloramina T.

Se pueden utilizar tetranitro-metano y N-acetil-imidazol para la modificación de los residuos de tirosilo. La reticulación por medio de la formación de ditirosina se puede llevar a cabo con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

Los estudios recientes sobre la modificación de triptófano han utilizado N-bromo-succinimida, 2-hidroxi-5-nitro-bromuro de bencilo o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitro-fenil-mercapto)-3H-indol (BPNS-skatole).

La modificación con éxito de las proteínas terapéuticas y péptidos con PEG con frecuencia está asociada con una prolongación de la vida media circulatoria, mientras que la reticulación de las proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído, se utiliza para la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos para inmunoterapia con frecuencia se logra mediante la carbamilación con cianato de potasio.

Un péptido, en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos, es una realización preferida de la invención. Se desvela un péptido, en donde el péptido está modificado. En términos generales, los péptidos y las variantes (al menos aquéllas que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) se pueden sintetizar mediante el modo de síntesis de péptidos en fase sólida de Fmoc-poli-amida, como es dado a conocer por Lukas et al. (Lukas et al., 1981) y por las referencias citadas en el mismo. Se proporciona la protección temporal del grupo N-amino mediante el grupo 9-fluorenil-metilo-xi-carbonilo (Fmoc). La disociación repetitiva de este grupo protector altamente lábil a la base se hace utilizando piperidina al 20 % en N, N-dimetil-formamida. Las funcionalidades de cadena lateral se pueden proteger como sus butil-éteres (en el caso de serina, treonina y tirosina), butil-ésteres (en el caso del ácido glutámico y ácido aspártico), derivados de butilo-xi-carbonilo (en el caso de lisina e histidina), derivados de tritilo (en el caso de cisteína), y derivados de 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencen-sulfonilo (en el caso de arginina). Cuando la glutamina o la asparagina son residuos C-terminales, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxi-benzhidrido para la protección de las funcionalidades de amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de poli-dimetil-acrilamida constituido a partir de los tres monómeros de dimetil-acrilamida (monómero del segmento principal), bisacrilol-etilen-diamina (reticulante), y metil-éster de acrilol-sarcosina (agente funcionalizante). El agente enlazado disociable del péptido a la resina utilizado es el derivado de ácido 4-hidroxi-metil-fenoxi-acético lábil al ácido. Todos los derivados de aminoácidos se agregan como sus derivados de anhídrido simétricos preformados, con la excepción de asparagina y glutamina, que se agregan utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso mediado por N,N-diciclohexil-carbodi-imida/1-hidroxi-benzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se monitorean utilizando procedimientos de prueba con ninhidrina, ácido trinitro-bencen-sulfónico o isotina. Al completarse la síntesis, los péptidos se disocian a partir del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoro-acético (TFA) al 95 % que contiene una mezcla de depuradores al 50 %. Los depuradores comúnmente utilizados incluyen etandiol, fenol, anisol y agua, en donde la elección exacta depende de los aminoácidos constituyentes del péptido que se esté sintetizando. También es posible utilizar una combinación de metodologías en fase sólida y en fase de solución para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, (Bruckdorfer et al., 2004), y las referencias citadas en el mismo).

El ácido trifluoroacético se elimina mediante evaporación al vacío, con la subsiguiente trituración con dietil-éter, para proporcionar el péptido crudo. Cualesquiera depuradores presentes se eliminan mediante un simple procedimiento de extracción que, después de la liofilización de la fase acuosa, proporciona el péptido crudo exento de depuradores. Los reactivos para la síntesis de péptidos están generalmente disponibles en, por ejemplo, Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido (UK)).

La purificación se pueden llevar a cabo mediante cualquier técnica o combinación de técnicas, tales como re-

cristalización, cromatografía de exclusión de tamaños, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de interacción hidrofóbica y (usualmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa utilizando, por ejemplo, una separación en gradiente de acetonitrilo/agua.

- 5 El análisis de los péptidos se puede llevar a cabo utilizando cromatografía de capa delgada, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa, análisis de aminoácidos después de la hidrólisis de ácido, y mediante análisis espectrométrico de masas con bombardeo rápido de átomos (FAB), así como análisis espectrométrico de masas MALDI y ESI-Q-TOF.
- 10 Para la identificación de los péptidos de la presente invención, se rastreó la base de datos de los datos de expresión de ARN públicamente disponible (Lonsdale, 2013) de aproximadamente 3000 muestras de tejido normal, para determinar los genes con una expresión casi ausente en los sistemas de órganos vitales, y una baja expresión en otros sistemas de órganos importantes. En un segundo paso, se identificaron los péptidos asociados con cáncer derivados a partir de los productos de proteína de estos genes, mediante espectrometría de masas, utilizando la
- 15 plataforma XPRESIDENT^{MR}, como se describe en el presente documento.

En detalle, para seleccionar los genes de interés utilizando los datos de RNASeq de dicha base de datos, se consideró que los sistemas de órganos vitales son: cerebro, corazón, vaso sanguíneo, pulmón e hígado. Se requirió que la media de lecturas por kilobase por millón de lecturas (RPKM) para los órganos vitales fuera menor de 2, y se requirió que el

20 75 % percentil fuera menor de 5 RPKM para la selección del gen. Si los sistemas de órganos eran cubiertos por más de una clase de muestra, por ejemplo, diferentes regiones del cerebro que se hubieran analizado por separado, se utilizó el 75 % percentil medio máximo y máximo sobre las múltiples clases de muestras para el cálculo. Se consideró que otros sistemas de órganos importantes son: piel, nervio, pituitaria, colon, riñón, tejido adiposo, glándula suprarrenal, vejiga urinaria, sangre entera, esófago, músculo, páncreas, glándula salival, intestino delgado, estómago,

25 mama, bazo, glándula tiroides. Se requirió que la RPKM media máxima para estos órganos fuera menor de 10 para la selección del gen. Otros órganos se consideraron como no vitales y, por consiguiente, no se aplicó ningún valor de corte para la expresión genética. Estos órganos fueron cuello uterino y útero, trompa de Falopio, vagina, próstata, testículos y ovario. Utilizando este rastreo, se seleccionaron alrededor de 14,000 genes candidatos. En seguida, se analizaron los perfiles de presentación de péptidos derivados a partir de las proteínas correspondientes. Los péptidos

30 se consideraron interesantes si se presentaban en menos de cinco muestras normales en un conjunto de más de 170 muestras normales (es decir, no cancerosas) analizadas, y si la presentación más alta en el tejido normal fue menor del 30 % de la señal tumoral media (sobre todas las muestras tumorales).

Con el objeto de seleccionar los péptidos sobrerepresentados, se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación media de la muestra, así como la variación de las réplicas. El perfil yuxtapone las muestras de la entidad tumoral de interés en una línea base de las muestras de tejido normal. Cada uno de estos perfiles se puede consolidar entonces en una puntuación de sobre-presentación mediante el cálculo del valor-p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015), ajustando para el análisis múltiple con el índice de descubrimiento falso (Benjamini y Hochberg, 1995).

40 Para la identificación y cuantificación relativa de los ligandos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) mediante espectrometría de masas, se purificaron las moléculas de antígenos de leucocitos humanos (HLA) a partir de las muestras de tejido congeladas, y se aislaron los péptidos asociados con antígenos de leucocitos humanos (HLA). Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante experimentos de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) con ionización por nano-electropulverización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron mediante una comparación del patrón de fragmentación de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) naturales registrados a partir de las muestras tumorales primarias con los patrones de fragmentación de los péptidos de referencia sintéticos correspondientes de las secuencias idénticas. Debido a que los péptidos se identificaron directamente como moléculas de ligandos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) de

45 tumores primarios, estos resultados proporcionan una evidencia directa para el procesamiento natural y la presentación de los péptidos identificados en el tejido de cáncer primario.

Los números de muestras fueron (todas juntas/muestras que pasan el QC): para el cáncer pancreático (PC) N = 39 (36), para el carcinoma de células renales (RCC) N=22 (18), para el cáncer colorrectal (CRC) N = 31 (28), para el carcinoma esofágico N = 14 (11), para la hiperplasia prostática benigna (BPH) y cáncer de próstata N = 53 (43), para el carcinoma hepatocelular (HCC) N = 15 (15), para el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) N = 96 (87), para el

55 cáncer gástrico (GC) N = 35 (33), para el glioblastoma (GB) N = 38 (27), para el cáncer de mama N = 2 (2), para el melanoma N = 5 (2), para el cáncer de ovario N = 21 (20), para la leucemia linfocítica crónica (CLL) N = 5 (4), para el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) N = 18 (17), NHL N = 18 (18), leucemia mieloblástica aguda (AML) N = 23 (18),

60 cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC) N = 18 (17), para el cáncer de vejiga urinaria (UBC) N = 17 (15), para el cáncer uterino (UEC) N = 19 (16). Las muestras han pasado el control de calidad (QC) si se adquieren 5 réplicas de espectrometría de masas o si la muestra se consume completamente, y los péptidos utilizados para calcular el factor de normalización (es decir, que se presentan en las réplicas técnicas de la misma muestra con menos del 50 % de variación, y que se presentan al menos en 2 muestras independientes) son al menos el 30 % de todos los

65 péptidos medidos en la muestra. Las muestras que se subtipificaron que dieron como resultado un subtipo raro (tal como A*02:05, A*02:06) se excluyeron para la selección de los péptidos de esta invención.

La plataforma para el descubrimiento de fármacos patentada XPRESIDENT® v2.1 (véase por ejemplo US 2013-0096016) permite hacer la identificación y la selección de los candidatos a vacunas peptídicas sobre-presentados relevantes basándose en la cuantificación relativa directa de los niveles de péptidos restringidos a los antígenos de leucocitos humanos (HLA) en los tejidos de cáncer en comparación con varios tejidos y órganos no cancerosos diferentes. Esto se logró mediante el desarrollo de la cuantificación diferencial sin marcadores utilizando los datos de CL-EM adquiridos procesados mediante una plataforma de análisis de datos patentada que combina los algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, desconvolución del estado de carga y normalización.

Se calcularon los niveles de presentación, incluyendo las estimaciones de error para cada péptido y cada muestra. Se identificaron los péptidos presentados exclusivamente en tejido tumoral y los péptidos sobre-presentados en tejido tumoral con respecto a los tejidos y órganos no cancerosos.

Se purificaron las muestras de los complejos de antígeno de leucocitos humano (HLA)-péptido a partir del carcinoma hepatocelular (HCC) primario, carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y leucemia linfocítica crónica (CLL), y se aislaron los péptidos asociados con antígenos de leucocitos humanos (HLA), y se analizaron mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) (véanse los ejemplos). Todos los péptidos asociados con tumores (TUMAP) contenidos en la presente solicitud se identificaron con este planteamiento en las muestras de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y/o leucemia linfocítica crónica (CLL), confirmando su presentación en estos tipos de tumores.

Los péptidos asociados con tumores (TUMAP) identificados en múltiples tejidos tumorales y tejidos normales se cuantificaron utilizando un recuento iónico de los datos de CL-EM sin marcadores. El método asume que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas producidas por cada péptido en varios experimentos de CL-EM se normalizaron basándose en la tendencia central, se promediaron por muestra, y se combinaron en una gráfica de barras denominada como perfil de presentación. El perfil de presentación consolida diferentes métodos de análisis, tales como la búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupación de espectros, desconvolución del estado de carga (descarga) y alineamiento del tiempo de retención y normalización.

Además, la plataforma para el descubrimiento de fármacos XPRESIDENT® v2.x permite la cuantificación absoluta directa de niveles de péptidos restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), preferentemente a los antígenos de leucocitos humanos (HLA), en los tejidos de cáncer o en otros tejidos infectados. Dicho de una manera breve, el recuento total de células se calculó a partir del contenido de ADN total de la muestra de tejido analizada. La cantidad total de péptido para un péptido asociado con tumores (TUMAP) en una muestra de tejido, se midió mediante nanoCL-EM/EM como la proporción del péptido asociado con tumores (TUMAP) natural y una cantidad conocida de una versión marcada con isótopo del péptido asociado con tumores (TUMAP), el denominado como patrón interno.

La eficiencia del aislamiento del péptido asociado con tumores (TUMAP) se determinó mediante la adición de complejos de péptido: complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de todos los péptidos seleccionados asociados con tumores (TUMAP) en el lisado de tejido en el punto más temprano posible del procedimiento de aislamiento del péptido asociado con tumores (TUMAP) y su detección mediante nanoCL-EM/EM en seguida de llevar a cabo el procedimiento de aislamiento de péptidos. El recuento total de células y la cantidad total de péptido se calcularon a partir de mediciones por triplicado por muestra de tejido. Las eficiencias de aislamiento específicas de péptidos se calcularon como un promedio de 10 experimentos de adición, cada uno medido por triplicado (véanse el Ejemplo 6 y la Tabla 11).

Este análisis combinado de datos de expresión de ARN y espectrometría de masas dio como resultado los 288 péptidos de la presente invención. En muchos casos, el péptido se identificó solamente en un bajo número de tumores. Sin embargo, debido a la sensibilidad limitada del análisis de espectrometría de masas de rutina, los datos de ARN proporcionan una base mucho mejor para la estimación del cubrimiento (véase el Ejemplo 2).

La presente invención proporciona un péptido que es útil en el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de

Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y leucemia linfocítica crónica (CLL), que sobre-presentan o que exclusivamente presentan el péptido de la invención. Se demostró mediante espectrometría de masas que este péptido se presenta naturalmente por las moléculas de antígenos de leucocitos humanos (HLA) en las muestras de carcinoma hepatocelular (HCC) humano primario, carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), leucemia linfocítica crónica (CLL), y/o en las muestras de cáncer pancreático (PC).

Se demostró que muchos de los genes/proteínas de origen (también designadas como "proteínas de longitud completa" o "proteínas subyacentes") a partir de las cuales se derivan los péptidos se sobre-expresan altamente en el cáncer comparándose con los tejidos normales - "tejidos normales" en relación con esta invención significará cualquiera de los tejidos sanos del tipo correspondiente de tumor (hígado, colon/recto, cerebro, estómago, esófago, pulmón, páncreas, riñón, próstata, ovario, piel, mama y leucocitos) u otras células de tejido normal, demostrando un alto grado de asociación con el tumor de los genes de origen (véase el Ejemplo 2). Más aún, los péptidos por sí mismos son fuertemente sobre-presentados en el tejido tumoral - "tejido tumoral" en relación con esta invención significará una muestra a partir de un paciente que padezca de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL), pero no en los tejidos normales (véase el Ejemplo 1).

Los péptidos unidos a los antígenos de leucocitos humanos (HLA) pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico, específicamente los linfocitos T. Las células T pueden destruir las células que presentan el complejo de antígeno de leucocitos humano (HLA)/péptido reconocido, por ejemplo, las células de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer pancreático (PC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL), que presentan los péptidos derivados.

El péptido de la presente invención ha demostrado ser capaz de estimular las respuestas de células T y/o son sobre-presentados y, por consiguiente, se pueden utilizar para la producción de anticuerpos y/o receptores de células T (TCR), tales como los receptores de células T (TCR) solubles, de acuerdo con la presente invención (véase el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4). Adicionalmente, los péptidos, cuando forman complejo con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) respectivo, también se pueden utilizar para la producción de anticuerpos y/o receptores de células T (TCR), en particular los receptores de células T solubles (sTCR), de acuerdo con la presente invención. Los métodos respectivos son bien conocidos por la persona experta, y se pueden encontrar en la bibliografía respectiva también. Por consiguiente, el péptido de la presente invención es útil para generar una respuesta inmunitaria en un paciente, mediante la cual se pueden destruir las células tumorales. Una respuesta inmunitaria en un paciente puede ser inducida mediante la administración directa de los péptidos descritos o sustancias precursoras adecuadas (por ejemplo, los péptidos alargados, proteínas, o ácidos nucleicos que codifican estos péptidos) al paciente, idealmente en combinación con un agente mejorador de la inmunogenicidad (es decir, un adyuvante). Se puede esperar que la respuesta inmunitaria que se origine a partir de dicha vacunación terapéutica sea altamente específica contra las células tumorales debido a que el péptido diana de la presente invención no se presenta en los tejidos normales en números de copias comparables, previniendo el riesgo de tener reacciones autoinmunes indeseadas contra las células normales en el paciente.

La presente descripción se refiere además a receptores de células T (TCR), los cuales comprenden una cadena alfa y una cadena beta ("receptores de células T (TCR) alfa/beta"). También se proporciona el péptido capaz de unirse a los receptores de células T (TCR) y a los anticuerpos cuando se presenta por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras para la expresión de los receptores de células T (TCR) y de los péptidos de la presente descripción; y a los métodos para utilizar los mismos.

El término "receptor de células T" (abreviado como TCR) se refiere a una molécula heterodimérica que comprende una cadena de polipéptido alfa (cadena alfa), y una cadena de polipéptido beta (cadena beta), en donde el receptor heterodimérico es capaz de unirse a un antígeno de péptido presentado por una molécula de antígenos de leucocitos humanos (HLA). El término también incluye los denominados como receptores de células T (TCR) gamma/delta.

En una realización, la descripción proporciona un método para la producción de un receptor de células T (TCR) como se describe en el presente documento, en donde el método comprende cultivar una célula hospedadora capaz de expresar el receptor de células T (TCR) bajo condiciones adecuadas para promover la expresión del receptor de células T (TCR).

La descripción, en otro aspecto, se refiere a métodos de acuerdo con la descripción, en donde el antígeno se carga sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o II expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o una célula presentadora de antígeno artificial, poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno, o el antígeno se carga sobre tetrámeros de MHC clase I o II mediante la tetramerización de los monómeros del complejo de antígeno/MHC clase I o II.

En general se considera que las cadenas alfa y beta de los receptores de células T (TCR) alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los receptores de células T (TCR) gamma/delta tienen cada una, en términos generales, dos "dominios", es decir, dominios variable y constante. El dominio variable consiste en una concatenación de la región variable (V) y la región de unión (J). El dominio variable también puede incluir una región líder (L). Las cadenas beta y delta también pueden incluir una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta también pueden incluir dominios transmembranales (TM) C-terminales que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana celular.

Con respecto a los receptores de células T (TCR) gamma/delta, la expresión "dominio variable gamma del receptor de células T (TCR)", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concatenación de la región gamma V del receptor de células T (TRGV) sin la región líder (L) y la región gamma J del receptor de células T (TRGJ), la expresión término "dominio constante gamma del receptor de células T (TCR)" se refiere a la región gamma C del receptor de células T (TRGC) extracelular, o a una secuencia de la región gamma C del receptor de células T (TRGC) truncada C-terminal. De la misma manera, la expresión "dominio variable delta del receptor de células T (TCR)" se refiere a la concatenación de la región delta V del receptor de células T (TRDV) sin la región líder (L), y la región delta D/J del receptor de células T (TRDD/TRDJ), y la expresión "dominio constante delta del receptor de células T (TCR)" se refiere a la región delta C del receptor de células T (TRDC) extracelular, o a una secuencia de la región delta C del receptor de células T (TRDC) truncada C-terminal.

Los receptores de células T (TCR) de la presente descripción preferentemente se enlazan a un complejo de péptido-molécula de antígenos de leucocitos humanos (HLA) con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μ M o menos, de aproximadamente 50 μ M o menos, de aproximadamente 25 μ M o menos, o de aproximadamente 10 μ M o menos. Se prefieren más los receptores de células T (TCR) de alta afinidad que tienen afinidades de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, de aproximadamente 100 nM o menos, de aproximadamente 50 nM o menos, o de aproximadamente 25 nM o menos. Los ejemplos no limitantes de los intervalos de afinidad de unión preferidos para los receptores de células T (TCR) de la presente invención incluyen de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 10 nM; de aproximadamente 10 nM a aproximadamente 20 nM; de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 30 nM; de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM; de aproximadamente 40 nM a aproximadamente 50 nM; de aproximadamente 50 nM a aproximadamente 60 nM; de aproximadamente 60 nM a aproximadamente 70 nM; de aproximadamente 70 nM a aproximadamente 80 nM; de aproximadamente 80 nM a aproximadamente 90 nM; y de aproximadamente 90 nM a aproximadamente 100 nM.

Como se utiliza en el presente documento, en relación con los receptores de células T (TCR) de la presente descripción, "unión específica" y las variantes gramaticales del mismo, se utilizan para significar un receptor de células T (TCR) que tiene una afinidad de unión (KD) por un complejo de péptido-molécula de antígenos de leucocitos humanos (HLA) de 100 μ M o menos.

Los receptores de células T (TCR) heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener un enlace de disulfuro introducido entre sus dominios constantes. Los receptores de células T (TCR) preferidos de este tipo incluyen aquellos que tienen una secuencia de dominio constante de TRAC y una secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2, excepto que Thr 48 de TRAC y Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 son reemplazados por residuos de cisteína, en donde las cisteínas forman un enlace de disulfuro entre la secuencia de dominio constante de TRAC y la secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2 del receptor de células T (TCR).

Con o sin el enlace inter-cadena introducido mencionado anteriormente, los receptores de células T (TCR) heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden tener una secuencia de dominio constante de TRAC y una secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante de TRAC y la secuencia de dominio constante de TRBC1 o TRBC2 del receptor de células T (TCR) se pueden enlazar mediante el enlace de disulfuro nativo entre Cys4 del exón 2 de TRAC y Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

Los receptores de células T (TCR) de la presente descripción pueden comprender una marca detectable seleccionada a partir del grupo que consiste en un radionúclido, un fluoróforo y biotina. Los receptores de células T (TCR) de la presente descripción se pueden conjugar con un agente terapéuticamente activo, tal como un radionúclido, un agente quimioterapéutico o una toxina.

En una realización, un receptor de células T (TCR) de la presente descripción que tiene al menos una mutación en la

cadena alfa y/o que tiene al menos una mutación en la cadena beta tiene una glucosilación modificada comparándose con el receptor de células T (TCR) no mutado.

En una realización, un receptor de células T (TCR) que comprende al menos una mutación en la cadena alfa del receptor de células T (TCR) y/o en la cadena beta del receptor de células T (TCR), tiene una afinidad de unión por, y/o una vida media de unión por, un complejo de péptido-molécula de antígenos de leucocitos humanos (HLA), el cual es al menos el doble de aquél de un receptor de células T (TCR) que comprende la cadena alfa del receptor de células T (TCR) no mutado y/o la cadena beta del receptor de células T (TCR) no mutado. La mejora en la afinidad de los receptores de células T (TCR) específicos de tumores, y su explotación, depende de la existencia de una ventana para las afinidades óptimas de los receptores de células T (TCR). La existencia de dicha ventana se basa en las observaciones de que los receptores de células T (TCR) específicos para los patógenos restringidos al HLA-A2 tienen valores KD que son en general aproximadamente 10 veces más bajos cuando se comparan con los receptores de células T (TCR) específicos para los auto-antígenos asociados a tumores restringidos a HLA-A2. Ahora se sabe que, aunque los antígenos tumorales tienen el potencial para ser inmunogénicos, debido a que los tumores aparecen a partir de las propias células del individuo, solamente las proteínas mutadas o las proteínas con un procesamiento de traducción alterado serán vistas como extrañas por el sistema inmunológico. Los antígenos que se sobre-regulan o se sobreexpresan (los denominados como auto-antígenos) no necesariamente inducirán una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor. Las células T que expresan los receptores de células T (TCR) que son altamente reactivos a estos antígenos habrán sido seleccionadas negativamente dentro del timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que solamente quedan las células T con receptores de células T (TCR) de baja afinidad por los auto-antígenos. Por consiguiente, la afinidad de los receptores de células T (TCR) o las variantes de la presente descripción, con los péptidos de acuerdo con la invención, se puede mejorar mediante los métodos bien conocidos en la materia.

La presente descripción se refiere además a un método para identificar y aislar un receptor de células T (TCR) de acuerdo con la presente descripción, en donde este método comprende incubar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de donantes sanos con monómeros de A2/péptido negativos para HLA-A*02, incubar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con tetrámero-ficoeritrina (PE), y aislar las células T con alta avidez mediante un análisis de selección de células activada por fluorescencia (FACS)-Calibur.

La presente descripción se refiere además a un método para identificar y aislar un receptor de células T (TCR) de acuerdo con la presente descripción, en donde este método comprende obtener un ratón transgénico con los loci del gen de TCR $\alpha\beta$ humano entero (1,1 Mb y 0,7 Mb), cuyas células T expresan un diverso repertorio de receptores de células T (TCR) humanos que compensan la deficiencia de receptores de células T (TCR) de ratón, inmunizar al ratón con el péptido de interés, incubar las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas a partir de los ratones transgénicos con tetrámero-ficoeritrina (PE), y aislar las células T con alta avidez mediante un análisis de selección de células activada por fluorescencia (FACS)-Calibur.

En un aspecto, para obtener las células T que expresan los receptores de células T (TCR) de la presente descripción, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción se clonan en vectores de expresión, tales como retrovirus gamma o lentivirus. Se generan los virus recombinantes y entonces se prueban para determinar la funcionalidad, tal como la especificidad del antígeno y la avidez funcional. Entonces se utiliza una alícuota del producto final para transducir la población de células T diana (generalmente purificadas a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente), la cual se expande antes de infundirse en el paciente.

En otro aspecto, para obtener las células T que expresan los receptores de células T (TCR) de la presente descripción, se sintetizan los ARN de los receptores de células T (TCR) mediante las técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, mediante los sistemas de transcripción *in vitro*. Los ARN sintetizados *in vitro* de los receptores de células T (TCR) se introducen entonces en las células T CD8+ primarias obtenidas a partir de donantes sanos mediante electroporación para reexpresar las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta específicas de tumores.

Con el fin de aumentar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican los receptores de células T (TCR) de la presente descripción se pueden enlazar operativamente a promotores fuertes, tales como repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas, citomegalovirus (CMV), virus de células madre murinas (MSCV) U3, fosfoglicerato-cinasa (PGK), β -actina, ubiquitina, y un promotor compuesto de virus de simio 40 (SV40)/CD43, factor de elongación (EF)-1a y el promotor de virus formador de foco en el bazo (SFFV). En una realización preferida, el promotor es heterólogo para el ácido nucleico que se esté expresando.

En adición a los promotores fuertes, los casetes de expresión de los receptores de células T (TCR) de la presente descripción pueden contener elementos adicionales que pueden mejorar la expresión transgénica, incluyendo un tracto de polipurina central (cPPT), que promueve la translocación nuclear de las construcciones lentivíricas (Follenzi et al., 2000), y el elemento regulador posterior a la transcripción del virus de hepatitis de marmota (wPRE), el cual aumenta el nivel de la expresión transgénica mediante el aumento de la estabilidad del ARN (Zufferey et al., 1999).

Las cadenas alfa y beta de un receptor de células T (TCR) de la presente invención pueden ser codificadas por ácidos

nucleicos localizados en vectores separados, o pueden ser codificadas por polinucleótidos localizados en el mismo vector.

El alcance de la expresión superficial de los receptores de células T (TCR) de alto nivel requiere que tanto la cadena TCR-alfa como la cadena TCR-beta del receptor de células T (TCR) introducidas se transcriban en altos niveles. Para hacer esto, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción se pueden clonar en construcciones bicistrónicas en un solo vector, el cual haya demostrado que es capaz de superar este obstáculo. El uso de un sitio de entrada intra-ribosómico viral (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta da como resultado la expresión coordinada de ambas cadenas, debido a que las cadenas TCR-alfa y TCR-beta se generan a partir de una sola transcripción que se separa en dos proteínas durante la traducción, asegurando que se produzca una proporción molar igual de cadenas TCR-alfa y TCR-beta. (Schmitt et al., 2009).

Los ácidos nucleicos que codifican los receptores de células T (TCR) de la presente descripción se pueden optimizar en sus codones para aumentar la expresión a partir de una célula hospedadora. La redundancia en el código genético permite que algunos aminoácidos sean codificados por más de un codón, pero ciertos codones son menos "óptimos" que otros debido a la disponibilidad relativa de ARNt coincidentes, así como a otros factores (Gustafsson et al., 2004). Se ha demostrado que la modificación de las secuencias genéticas de TCR-alfa y TCR-beta de tal manera que cada aminoácido sea codificado por el codón óptimo para la expresión genética en mamífero, así como la eliminación de los motivos de inestabilidad del ARNm o los sitios de empalme crípticos, mejoran significativamente la expresión genética de TCR-alfa y TCR-beta (Scholten et al., 2006).

Adicionalmente, el mal emparejamiento entre las cadenas de TCR introducidas y endógenas puede dar como resultado la adquisición de especificidades que presenten un riesgo significativo de autoinmunidad. Por ejemplo, la formación de dímeros de TCR mixtos puede reducir el número de moléculas CD3 disponibles para formar los complejos de TCR apropiadamente emparejados y, por consiguiente, puede disminuir significativamente la avidez funcional de las células que expresen el receptor de células T (TCR) introducido (Kuball et al., 2007).

Con el fin de reducir el mal emparejamiento, se puede modificar el dominio del extremo C de las cadenas de receptores de células T (TCR) introducidas de la presente descripción, con el objeto de promover la afinidad entre cadenas, mientras que se disminuye la capacidad de las cadenas introducidas para emparejarse con el receptor de células T (TCR) endógeno. Estas estrategias pueden incluir el reemplazo de los dominios del extremo C de TCR-alfa y TCR-beta humanos con sus contrapartes murinas (dominio del extremo C murinizado); la generación de un segundo enlace de disulfuro entre cadenas en el dominio del extremo C mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína en ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del receptor de células T (TCR) introducido (modificación de cisteína); la permutación de los residuos interactuantes en los dominios del extremo C de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta ("botón en el ojal"); y la fusión de los dominios variables de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta directamente con CD3 ζ (fusión CD3 ζ). (Schmitt et al., 2009).

En una realización, una célula hospedadora se diseña para expresar un receptor de células T (TCR) de la presente descripción. En las realizaciones preferidas, la célula hospedadora es una célula T humana o un progenitor de células T humanas. En algunas realizaciones la célula T o el progenitor de células T se obtiene de un paciente con cáncer. En otras realizaciones, la célula T o el progenitor de células T se obtiene de un donante sano. Las células hospedadoras de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas con respecto a un paciente que se vaya a tratar. En una realización, el huésped es un una célula T gamma/delta transformada para expresar un TCR alfa/beta.

Una "composición farmacéutica" es una composición adecuada para su administración a un ser humano en un contexto médico. Preferentemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se elabora de acuerdo con las directrices de Buenas Prácticas de Elaboración (GMP).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también anteriormente). Tal y como se utiliza en la presente descripción, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado de los péptidos descritos en donde 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 -NH₂ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen los 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 cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, así como los 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 preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

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

Preferentemente, el medicamento de la presente invención es un agente inmunoterapéutico, tal como una vacuna. La vacuna se puede administrar directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de una forma intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.), o se puede aplicar *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administre al paciente, o se puede utilizar *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente, las cuales después se vuelven a administrar al paciente. Si el ácido nucleico se administra a las células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimulantes, tales como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o se puede combinar con un adyuvante inmunoestimulante (véase más adelante), o se puede utilizar en combinación con citocinas inmunoestimulantes, o bien se puede administrar mediante otro sistema de liberación adecuado, tal como, por ejemplo, liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado, tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase la Solicitud Internacional de Patente Número WO 95/18145 y (Longenecker et al., 1993)). El péptido también puede estar marcado, o puede ser una proteína de fusión, o puede ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a las células T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de las células T CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de las células T auxiliares CD4. De esta manera, en el caso de los epítomos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I que estimulan a las células T CD8, la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuadamente proporcionan epítomos que estimulan a las células T positivas para CD4. Los epítomos estimulantes de CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen aquellos que se identifican en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos estipulada en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, y al menos otro péptido adicional, preferentemente de dos a 50, más preferentemente de dos a 25, incluso muy preferentemente de dos a 20, y de una manera todavía más preferible dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivarse a partir de uno o más antígenos asociados con tumores (TAA) específicos y se pueden enlazar a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica el péptido peptídica de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, de una sola cadena y/o de doble cadena, o las formas nativas o estabilizadas de los polinucleótidos, tales como, por ejemplo, los polinucleótidos con una estructura base de fosforotioato, y que pueden o no contener intrones, siempre que codifiquen el péptido. Por supuesto, solamente los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Un aspecto todavía adicional de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con la invención.

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

Otro método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores es el de los enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen enlazadores sintéticos comercialmente disponibles que contienen una variedad de sitios de endonucleasa de restricción que facilitan varios proveedores, incluyendo International Biotechnologies Inc., New Haven, CN, EUA.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como es dada a conocer por Saiki RK et al. (Saiki et al., 1988). Este método se puede utilizar para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo, mediante su diseño en los sitios de restricción adecuados, o puede ser empleado para modificar el ADN de otras maneras útiles conocidas en este campo. Si se utilizan los vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un huésped adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido de la invención. De esta manera, el ADN que codifica el péptido de la invención se puede utilizar de acuerdo con las técnicas conocidas, y se puede modificar adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente descripción para construir un vector de expresión, el cual entonces se utiliza para transformar una célula hospedadora apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Estas técnicas incluyen las que se dan a conocer en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 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 ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención, se puede unir a una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirse en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, del modo de introducir el ADN en el interior del hospedador, y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con las secuencias de nucleótidos de control apropiadas que regulan la transcripción o la traducción y que sean reconocidas por el huésped deseado, aunque en general estos controles ya están generalmente disponibles en el vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el huésped mediante las técnicas convencionales. En general, el vector no consigue transformar todos los huéspedes. Por consiguiente, será necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan sido transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios, que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, tal como, por ejemplo, la resistencia a antibióticos.

De una manera alternativa, el gen para ese rasgo seleccionable puede estar en otro vector, el cual se utiliza para co-transformar la célula hospedadora deseada.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la invención, se cultivan entonces durante un tiempo suficiente y bajo las condiciones apropiadas que las personas expertas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas que se dan a conocer en la presente descripción, para permitir la expresión del polipéptido, el cual entonces se puede recuperar.

Son muchos los sistemas de expresión conocidos, incluyendo bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo, el género *Aspergillus*), células vegetales, células de animales o células de insectos. Preferentemente, el sistema consistirá en células de mamífero, tales como las células CHO disponibles en 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 tal como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL disponible en Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA. Un ejemplo de un vector de expresión inducible en mamífero es el pMSG, también disponible en Pharmacia. Los vectores plasmídicos de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416, y están en general disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (Yip) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores basados en el promotor del CMV (por ejemplo, de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, la expresión o secreción en el citoplasma, y el marcado 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 marca proporcionan flexibilidad en la detección.

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de proteínas tan elevados como de hasta 1 mg/l en células COS. Para las líneas celulares menos potentes, los niveles de proteínas son típicamente de aproximadamente 0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 dará como resultado niveles elevados de replicación del ADN en células COS que permiten 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 ft-lactamasa para la selección de resistencia a la ampicilina en bacterias, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la pre-pro-tripsina (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 bien otros vectores y sistemas de expresión para utilizarse con una variedad de células hospedadoras.

En otra realización, se codifican dos o más péptidos de la invención, y de este modo se expresan en un orden sucesivo (similar a las construcciones de "collar de cuentas"). Al hacerlo de esta manera, los péptidos o las variantes peptídicas se pueden enlazar o fusionar entre sí mediante segmentos de aminoácidos enlazadores, tales como, por ejemplo, LLLLLL, o se pueden enlazar sin ningún otro péptido adicional entre los mismos. Estas construcciones también se pueden utilizar para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector de polinucleótido de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas preferidas en algunas circunstancias, y normalmente son cepas de *E. coli*, tales como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* DH5 disponible en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EUA, y RR1 disponible en la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EUA (Número ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen células de levadura, de insecto y de mamífero, preferentemente células de vertebrado, tales como las líneas celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, las cuales en general están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles en la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles en 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 de baculovirus. Se puede encontrar una revisión general con respecto a la elección de las células hospedadoras más adecuadas para la expresión, por ejemplo, en el libro de texto de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Parte Uno, Segunda Edición, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas expertas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras apropiadas con una construcción de ADN de la presente invención se lleva a cabo mediante los métodos bien conocidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. Con respecto a la transformación de las células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen et al. (Cohen et al., 1972) y (Green y Sambrook, 2012). La transformación de las 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 las células de vertebrados, los reactivos útiles para transfectar estas células, por ejemplo, hay formulaciones de fosfato de calcio y DEAE-dextrano o liposomas, disponibles en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EUA. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, células bacterianas, células de insecto y células de vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, aquellas que contengan una construcción de ADN de la presente invención, se pueden identificar mediante las técnicas bien conocidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De una manera alternativa, se puede detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de los anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la invención son útiles para la preparación del péptido de la invención, por ejemplo, las células bacterianas, de levadura y de insecto. Sin embargo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar las células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas, para expresar el péptido de la invención, de tal manera que se puedan cargar en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) apropiadas. De esta manera, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o una célula presentadora de antígeno. Las células presentadoras de antígeno (APC) cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EUA (FDA) el 29 de abril de 2010, para tratar el cáncer de próstata hormonorrefractario (HRPC) metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para la producción del péptido de la invención, en donde dicho método comprende el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

En otra realización, el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido o su variante se puede preparar para la inyección por vía intravenosa (i.v.), inyección por vía subcutánea (s.c.), inyección por vía intradérmica (i.d.), inyección por vía intraperitoneal (i.p.) o inyección por vía intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen inyección por vía subcutánea (s.c.), inyección por vía intradérmica (i.d.), inyección por vía intraperitoneal (i.p.) o inyección por vía intramuscular (i.m.) e inyección por vía intravenosa (i.v.). Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen inyección por vía intradérmica (i.d.), inyección por vía intramuscular (i.m.), inyección por vía subcutánea (s.c.), inyección por vía intraperitoneal (i.p.) e inyección por vía intravenosa (i.v.). Se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferentemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN, y dependerán del péptido o ADN respectivo. Las dosificaciones en esos intervalos se han empleado con éxito en ensayos anteriores (Walter et al., 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o puede estar contenido en un vector o en un sistema de suministro adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, PNA, ARN 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 puede consultar una perspectiva general, por ejemplo, en Teufel et al. (Teufel et al., 2005). Las vacunas de polinucleótidos son fáciles de preparar, pero no se conoce con exactitud el mecanismo de acción por el cual estos vectores inducen la respuesta inmunitaria. Los vectores y sistemas de suministro adecuados incluyen los de ADN y/o ARN virales, tales como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunales, retrovirus, virus de herpes, virus adeno-asociados o híbridos que contengan elementos de más de un virus. Los sistemas de suministro no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos en la técnica para la introducción de ADN. También se puede utilizar el suministro físico, tal como la "pistola de genes". El péptido o los péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo, con un epítopo que estimule las células T para la región determinante de complementariedad (CDR) opuesta respectiva, tal y como se ha indicado anteriormente.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de una forma no específica la respuesta inmunitaria (por ejemplo, las respuestas inmunitarias

mediadas por células T positivas para CD8 y células T auxiliares (TH)) contra un antígeno, por lo que se podrían considerar útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, pero no se limitan a: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados a partir 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, monofosforilo-lípido 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 basadas en 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 celular bacteriana, y otros adyuvantes patentados tales como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes tales 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 y Krummel, 1995). También se pueden utilizar 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 la maduración de las células dendríticas hasta convertirlas en células presentadoras antígeno eficientes para los linfocitos T (por ejemplo, GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5.849.589), y en el que actúan como inmunoadyuvantes (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimulantes potencian los efectos de los adyuvantes en un contexto de vacunas. Sin obligarse por la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan mediante la activación del sistema inmunológico innato (no adaptable) 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 antígenos contra una amplia variedad de antígenos, incluidos los 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 da como resultado una mayor activación de las células TH1 y una generación más potente de los linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de las células T CD4. La tendencia hacia la respuesta de TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en la presencia de adyuvantes de vacunas, tales como el alumbre o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta de TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o se administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones tales 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 inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, y se han obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la vacuna de dosis completa sin CpG (Krieg, 2006). La Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos, y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica del antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG de TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), elaborado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se enlazan a los TLR, tales como ARN que se enlaza a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de los adyuvantes útiles también se incluyen, sin limitación, CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, Idera), análogos de ARNbc tales como poli-(I:C) y derivados de los mismos (por ejemplo, AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli-(IC-R), pol i-(I:C 12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas, tales 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 se dirigen a las estructuras clave del sistema inmunológico (por ejemplo, anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor de TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de una forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas expertas 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, ARN, sildenafil, y formulaciones en partículas con PLG o virosomas.

En una realización preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, el adyuvante se selecciona del grupo consistente en factores estimulantes de colonias, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón-alfa.

En una realización preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, el adyuvante se selecciona a partir del grupo consistente en factores estimulantes de colonias, tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod y resiquimod. En una realización preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o

resiquimod. Los adyuvantes todavía 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 mismos.

Esta composición se utiliza para administración parenteral, tal como la administración subcutánea, intradérmica intramuscular u oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como reguladores del pH, agentes aglutinantes, agentes disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimulantes, tales como citocinas. En una composición como ésta, se puede usar una extensa 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 de ejemplo se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente Europea Número EP2112253.

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna de acuerdo con la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además, se atacan diferentes sendas de señalización asociadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solamente van dirigidas contra uno o unos cuantos dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores individuales expresan el mismo patrón de antígenos. Por consiguiente, la combinación de varios péptidos asociados con tumores asegura que cada tumor en cuestión contiene al menos alguno de los dianas. La composición se diseña de tal manera que se espere que cada tumor exprese varios de los antígenos y abarque varias sendas independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. De esta manera, la vacuna se puede utilizar con facilidad en la forma ya preparada ("del mostrador") para una población de pacientes más amplia. Esto significa que la selección previa de los pacientes que se vayan a tratar con la vacuna se puede restringir a la tipificación del HLA, que no será precisa ninguna otra evaluación de biomarcadores para la expresión de los antígenos, pero que todavía se asegure que la respuesta inmunitaria estimulada atacará simultáneamente a varios dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Tal y como se emplea en la presente descripción, el término "andamiaje" se refiere a una molécula que se enlaza específicamente a un determinante (por ejemplo, antigénico). En una realización, un andamiaje es capaz de dirigir la entidad a la que se ha unido (por ejemplo, una (segunda) fracción de unión al antígeno) a un sitio objetivo, por ejemplo, a un tipo específico de célula tumoral o de estroma tumoral portador del determinante antigénico (por ejemplo, el complejo de un péptido con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de acuerdo con la presente solicitud). En otra realización, un andamiaje es capaz de activar la señalización mediante su antígeno objetivo, por ejemplo, un antígeno del complejo del receptor de células T. Los andamiajes incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fragmentos de los mismos, los dominios de unión al antígeno de un anticuerpo que comprenden una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo, proteínas de unión que comprenden al menos un motivo de repetición de anquirina y moléculas con un solo dominio de unión al antígeno (SDAB), aptámeros, receptores de células T (TCR) (solubles) y células (modificadas) tales como células T alogénicas o autólogas. Con el fin de evaluar si una molécula es un andamiaje que se enlaza a un objetivo, se pueden efectuar ensayos de unión.

Unión "específica" significa que el andamiaje se enlaza al complejo de péptido-MHC de interés mejor que a otros complejos de péptido-MHC que se presentan naturalmente, hasta el punto de que un andamiaje dotado de una molécula activa que es capaz de aniquilar a una célula portadora del objetivo específico no puede aniquilar a otra célula que carezca de ese objetivo específico aunque presente otro u otros complejos de péptido-MHC. La unión a otros complejos de péptido-MHC es irrelevante si el péptido del complejo de péptido-MHC que reacciona de forma cruzada no se presenta naturalmente, es decir, no se deriva del peptidoma del antígeno de leucocitos humano (HLA). Las pruebas para evaluar la aniquilación de las células diana son perfectamente conocidas en la materia. Se deben realizar utilizando las células diana (células o líneas celulares primarias) con una presentación intacta del péptido-MHC, o las células cargadas con péptidos, de tal manera que se alcancen los niveles de péptido-MHC que se presentan naturalmente.

Cada andamiaje puede comprender un marcador que disponga que se pueda detectar el andamiaje enlazado mediante la determinación de la presencia o la ausencia de una señal generada por dicho marcador. Por ejemplo, el andamiaje se puede marcar con un colorante fluorescente o con cualquier otra molécula marcadora celular aplicable. Tales moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, en el caso del marcador por fluorescencia, como el proporcionado por un colorante fluorescente, éste puede proporcionar una visualización del aptámero enlazado mediante microscopía de fluorescencia o de barrido con láser o mediante citometría de flujo.

Cada andamiaje se puede conjugar con una segunda molécula activa, tal como, por ejemplo, IL-21, anti-CD3 y anti-CD28.

Para mayor información sobre los andamiajes de polipéptidos, véase, por ejemplo, la sección de antecedentes de la Solicitud Internacional de Patente Número WO2014/071978A1 y las referencias citadas en la misma.

La presente divulgación se refiere, además, a aptámeros. Los aptámeros (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional

de Patente Número WO 2014/191359 y la bibliografía citada en la misma) son moléculas de ácidos nucleicos de una sola cadena cortas, que se pueden plegar hasta adoptar estructuras tridimensionales definidas y que pueden reconocer las estructuras objetivo específicas. Parecen ser alternativas adecuadas para el desarrollo de terapias dirigidas. Se ha demostrado que los aptámeros se enlazan de una manera selectiva a una variedad de dianas complejos con una alta afinidad y especificidad.

En la pasada década se han identificado aptámeros que reconocen las moléculas situadas en la superficie celular que constituyen un medio para el desarrollo de estrategias de diagnóstico y terapéutico. Debido a que se ha demostrado que los aptámeros casi no poseen toxicidad e inmunogenicidad, son candidatos prometedores para las aplicaciones biomédicas. En realidad los aptámeros, por ejemplo, los aptámeros que reconocen el antígeno de membrana específico de la próstata, se han empleado con éxito en las terapias dirigidas y se ha demostrado su funcionalidad en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Además, se han identificado aptámeros que reconocen líneas celulares tumorales específicas.

Es posible seleccionar aptámeros de ADN para desvelar las propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas, y particularmente aquéllas derivadas a partir de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros identificados reconocen no solamente un subtipo de tumor específico, sino que más bien interactúan con una serie de tumores, esto hace que los aptámeros sean aplicables para el diagnóstico y la terapia de amplio espectro.

Además, la investigación de su comportamiento de unión a células mediante la citometría de flujo ha demostrado que los aptámeros presentan una muy buena afinidad aparente que se encuentra en la escala nanomolar.

Los aptámeros resultan útiles para propósitos de diagnóstico y terapéuticos. Además, ha sido posible demostrar que algunos de los aptámeros son absorbidos por las células tumorales y pueden funcionar de esta manera como vehículos moleculares para el suministro dirigido de los agentes contra el cáncer, tales como ARNpi en las células tumorales.

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejos, tales como células y tejidos, y los complejos de péptidos que comprendan, y que preferentemente consistan en, una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, con la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

El péptido de la presente invención se puede utilizar para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra los complejos de MHC/péptido. Éstos se pueden utilizar 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 imágenes, tales como PET. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o a determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos.

Por consiguiente, existe otro aspecto de la invención que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se enlaza específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II que forma un complejo con un antígeno restringido a los antígenos de leucocitos humanos (HLA), en donde dicho método comprende: inmunizar a un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II con una forma soluble de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o II que forme complejo con dicho antígeno restringido a los antígenos de leucocitos humanos (HLA); aislar las moléculas de ARNm a partir de las células productoras de anticuerpos del mamífero no humano mencionado; producir una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislar al menos un fago de dicha fagoteca, en donde al menos ese fago contenga dicho anticuerpo que se une específicamente al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II mencionado que forme complejo con el antígeno restringido a los antígenos de leucocitos humanos (HLA).

Es un aspecto adicional de la invención proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I o II que forme un complejo con un antígeno restringido a los antígenos de leucocitos humanos (HLA), en donde el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

En las Solicitudes Internacionales de Patente Números WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en las publicaciones (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkbeg et al., 2003), se dan a conocer los métodos respectivos para producir estos anticuerpos y complejos de histocompatibilidad mayor de clase I de una sola cadena, así como otras herramientas para la producción de tales anticuerpos.

Preferentemente, el anticuerpo se une al complejo con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar, preferentemente inferior a 10 nanomolar, el cual también se considera como "específico" en el contexto de la presente invención.

La presente invención se refiere a un péptido que consiste en SEQ ID NO: 14 que induce reactividad cruzada de las

células T con dicho péptido.

Se desvela además en el presente documento un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo consistente en las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, o una variante de las mismas que sea al menos un 88 % homóloga (preferentemente idéntica) a las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 15 a SEQ ID NO: 288, en donde dicho péptido o variante tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferentemente de entre 8 y 30, y de una manera muy preferible de entre 8 y 14 aminoácidos.

La presente invención se refiere, además, al péptido de acuerdo con la presente invención que tiene la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I.

La presente invención se refiere, además, al péptido de acuerdo con la presente invención en donde el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 14.

La presente invención se refiere, además, al péptido de acuerdo con la presente invención, en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos y en donde dichos enlaces no peptídicos se seleccionan del grupo que consiste en enlaces peptídicos inversos, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$. La presente divulgación se refiere, además, a los péptidos desvelados en el presente documento, en donde el péptido se modifica (químicamente).

La presente divulgación se refiere, además, a los péptidos desvelados en el presente documento, en donde el péptido es parte de una proteína de fusión, en particular que comprende los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II), o en donde el péptido se fusiona con (o en) un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico para las células dendríticas.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico que codifica el péptido de acuerdo con la presente invención, siempre que el péptido no sea la proteína humana completa (entera).

La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que es ADN, ADNc, PNA, ARN, o combinaciones de los mismos.

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

La presente invención se refiere, además, al péptido de acuerdo con la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, o el vector de expresión de acuerdo con la presente invención, para usarse en medicina, en particular en el tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL).

La presente invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de expresión de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere además a la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, que es una célula presentadora de antígeno, y preferentemente una célula dendrítica.

La presente invención se refiere además a un método para la producción de un péptido de acuerdo con la presente invención, en donde este método comprende cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, y aislar el péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere además al método de acuerdo con la presente invención, en donde el antígeno se carga sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o II expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada, poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere además al método de acuerdo con la invención, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar el péptido que contiene SEQ ID NO: 14.

La presente invención se refiere además a las células T activadas, producidas mediante el método de acuerdo con la presente invención, en donde dichas células T reconocen selectivamente una célula que exprese aberrantemente un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención.

También se desvela en el presente documento un método para aniquilar las células diana en un paciente, en donde

las células diana expresan aberrantemente un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, en donde el método comprende administrar al paciente, un número efectivo de células T de acuerdo con la presente invención.

- 5 La presente invención se refiere además al péptido de la presente invención, el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión de acuerdo con la presente invención, la célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, o el linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la presente invención para su uso en medicina. En algunas realizaciones, el péptido para el uso de la presente invención se refiere al uso como un medicamento o el uso en la elaboración de un medicamento. La presente invención se refiere además al péptido de
10 la presente invención para su uso de acuerdo con la presente invención, en donde el medicamento es activo contra el cáncer.

- La presente invención se refiere además al péptido para su uso de acuerdo con la invención, en donde el medicamento es una vacuna. La presente invención se refiere además al péptido para su uso de acuerdo con la invención, en donde
15 el medicamento es activo contra el cáncer.

- La presente invención se refiere además al péptido para su uso de acuerdo con la invención, en donde dichas células de cáncer son las células de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de
20 células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL).

- La presente invención se refiere además a proteínas marcadoras particulares y biomarcadores basados en el péptido de acuerdo con la presente invención, denominados en el presente documento como "dianas" que se pueden utilizar en el diagnóstico y/o pronóstico de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB),
25 cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL). La presente invención también se refiere al uso de estas dianas novedosas para el tratamiento de cáncer.

- El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se utiliza en el presente documento en un sentido amplio e incluye los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. En adición a las moléculas de inmunoglobulina intactas o "completas", también se incluyen en el término "anticuerpos" los fragmentos (por ejemplo, las regiones determinantes de complementariedad (CDR), y los fragmentos Fv, Fab y Fc) o polímeros de estas moléculas de inmunoglobulina y las versiones humanizadas de las moléculas de inmunoglobulina, siempre que éstas exhiban cualquiera de las
40 propiedades deseadas (por ejemplo, la unión específica de un (poli)péptido marcador de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML),
45 cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL); el suministro de una toxina a una célula de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML),
50 cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC) o leucemia linfocítica crónica (CLL), que exprese un gen marcador de cáncer en un nivel incrementado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL)), de acuerdo con la invención.

- Siempre que sea posible, los anticuerpos de la invención se pueden adquirir en las fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden generar utilizando los métodos bien conocidos. La persona experta entenderá que se pueden utilizar polipéptidos marcadores de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer
65 pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón

microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL) de longitud completa, o los fragmentos de los mismos, para generar los anticuerpos de la invención. Un polipéptido para utilizarse con el fin de generar un anticuerpo de la invención puede ser parcialmente o completamente purificado a partir de una fuente natural, o se puede producir utilizando técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifica un péptido de acuerdo con la presente invención, tal como un péptido de acuerdo con SEQ ID NO: 14, o una variante o un fragmento de las mismas, se puede expresar en células procariotas (por ejemplo, bacterias) o en células eucariotas (por ejemplo, células de levadura, insecto o mamífero), después de lo cual, la proteína recombinante se puede purificar y se utiliza para generar una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se enlaza específicamente con el polipéptido marcador de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL), utilizado para generar el anticuerpo de acuerdo con la invención.

Una persona experta en la materia se dará cuenta de que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo con la especificidad y afinidad requeridas para su uso pretendido (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, toma de imágenes *in vivo*, terapia con inmunotoxinas). Los anticuerpos se prueban para determinar su actividad deseada mediante los métodos conocidos, de acuerdo con el propósito para el cual se vayan a utilizar los anticuerpos (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para una guía adicional sobre la generación y prueba de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014)). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden probar en ensayos ELISA o transferencias Western, tinte inmunohistoquímico de cánceres fijados en formalina o secciones de tejido congeladas. Después de su caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos pretendidos para uso terapéutico o de diagnóstico *in vivo* se prueban de acuerdo con los métodos de prueba clínicos conocidos.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones que se presentan naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales de la presente incluyen específicamente los anticuerpos "quiméricos", en donde una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, u homóloga de, las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados a partir de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase del anticuerpo particular, mientras que la porción restante de la(s) cadena(s) es idéntica a, u homóloga de, las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados a partir de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de estos anticuerpos, siempre que éstos exhiban la actividad antagonista deseada (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4.816.567).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar utilizando métodos de hibridoma. En un método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado típicamente se inmuniza con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o que sean capaces de producir anticuerpos que se enlazarán específicamente al agente inmunizante. De una manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante, tales como aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuenciar fácilmente empleando los procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican los anticuerpos de las cadenas pesada y ligera murinas).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de los anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo utilizando las técnicas de rutina conocidas en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede llevar a cabo utilizando papaína. Los ejemplos de la digestión con papaína se describen en la Solicitud Internacional de Patente Número WO 94/29348 y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4.342.566. La digestión con papaína de los anticuerpos típicamente produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados como los fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ y un fragmento pFc'.

Los fragmentos de anticuerpos, ya sea unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, supresiones, sustituciones, u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o residuos de aminoácidos específicos, en el entendido de que la actividad del fragmento no sea significativamente alterada o deteriorada, comparándose con el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como para remover/agregar aminoácidos capaces de tener enlace de

disulfuro, para aumentar su bio-longevidad, para alterar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el fragmento del anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, tal como la actividad de unión, la regulación de la unión en el dominio de unión, etc. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo se pueden identificar mediante mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y prueba del polipéptido expresado.

5 Estos métodos son fácilmente evidentes para una persona experta en la materia y pueden incluir la mutagénesis específica del sitio del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o los fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab' u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contengan una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor), en donde los residuos a partir de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por residuos a partir de una región determinante de complementariedad (CDR) de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas instancias, los residuos de estructura (FR) Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo del receptor ni en las regiones determinantes de complementariedad (CDR) o secuencias de estructura (FR) importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de complementariedad (CDR) corresponden a aquéllas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de estructura (FR) son aquéllas de una secuencia de inmunoglobulina humana en consenso. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquélla de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para la humanización de los anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. En términos generales, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son referidos como residuos de "importación", los cuales se toman típicamente a partir de un dominio variable de "importación". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente mediante la introducción de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) o de las secuencias de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de roedor para sustituir las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De conformidad con lo anterior, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente a partir de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en donde algunos residuos de regiones determinantes de complementariedad (CDR) y posiblemente algunos residuos de regiones de estructura (FR) son sustituidos por residuos a partir de sitios análogos en los anticuerpos de roedores.

Se pueden emplear animales transgénicos (por ejemplo, los ratones) que sean capaces de producir, después de la inmunización, un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en los ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal, da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en esos ratones mutantes en la línea germinal, dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después del estímulo con el antígeno. También se pueden producir anticuerpos humanos en bibliotecas de exhibición de fagos (fagotecas).

Los anticuerpos de la invención preferentemente se administran a un sujeto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Típicamente, se utiliza una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación se haga isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y de una manera muy preferible de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Otros vehículos incluyen las preparaciones de liberación sostenida, tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en donde las matrices están en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para las personas expertas en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se esté administrando.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, paciente, o célula mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o mediante otros métodos, tales como infusión, que aseguren su suministro a la corriente sanguínea en una forma efectiva. Los anticuerpos también se pueden administrar por la vía intratumoral o peritumoral, para ejercer los efectos terapéuticos locales así como sistémicos. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosificaciones y los programas efectivos para administrar los anticuerpos se pueden determinar empíricamente,

y la realización de tales determinaciones está dentro de la experiencia en la materia. Los expertos en este campo entenderán que la dosificación de anticuerpos que se deben administrar variará dependiendo, por ejemplo, del sujeto que recibirá el anticuerpo, de la vía de administración, el tipo particular de anticuerpo utilizado, y de otros fármacos que se estén administrando. Una dosificación diaria típica del anticuerpo utilizado solo podría estar en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal o más al día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En seguida de la administración de un anticuerpo, preferentemente para el tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL), se puede evaluar la eficacia del anticuerpo terapéutico en diversas formas bien conocidas al practicante experto. Por ejemplo, el tamaño, número y/o distribución del cáncer en un sujeto que reciba el tratamiento, se puede monitorear utilizando técnicas de tomas de imágenes tumorales convencionales. Un anticuerpo terapéuticamente administrado que detenga el crecimiento tumoral, da como resultado el encogimiento del tumor y/o previene el desarrollo de nuevos tumores, comparándose con el progreso de la enfermedad que se presentaría en ausencia del anticuerpo administración, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento de cáncer.

Es un aspecto adicional de la invención, proporcionar un método para producir un receptor de células T soluble (sTCR) que reconozca un complejo de péptido-MHC específico. Estos receptores de células T solubles se pueden generar a partir de clones de células T específicos, y su afinidad se puede aumentar mediante mutagénesis dirigida hacia las regiones determinantes de complementariedad. Para el propósito de la selección del receptor de células T, se puede utilizar la exhibición de fagos (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 2010/01 13300 (Liddy et al., 2012)). Para el propósito de la estabilización de los receptores de células T durante la exhibición de fagos y en el caso del uso práctico como un fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar, por ejemplo, mediante enlaces de disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de células T de una sola cadena), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de células T se puede enlazar a toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 2013/ 0115191), y dominios que recluten las células efectoras, tales como un dominio anti-CD3, etc., con el objeto de ejecutar funciones particulares sobre las células diana. Más aún, se podría expresar en las células T utilizadas para la transferencia adoptiva. Se puede encontrar mayor información en las Publicaciones Internacionales Números WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. Una combinación de los receptores de células T solubles (sTCR) se describe en la Publicación Internacional Número WO 201 2/056407A1. Otros métodos para la producción se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO 2013/057586A1.

Además, los péptidos y/o los receptores de células T (TCR) o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente invención se pueden utilizar para verificar un diagnóstico de un cáncer por parte del patólogo, basándose en una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o receptores de células T (TCR) también se pueden utilizar para estudios de diagnóstico *in vivo*. En términos generales, el anticuerpo se marca con un radionucleótido (tal como ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P o ³⁵S), de tal manera que el tumor se pueda localizar utilizando inmunocintilografía. En una realización, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos se enlazan a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste en las proteínas mencionadas anteriormente, y el valor de afinidad (Kd) es menor de 1 x 10 µM.

Anticuerpos para uso de diagnóstico se pueden marcar con sondas adecuadas para la detección mediante diversos métodos de toma de imágenes. Los métodos para la detección de sondas incluyen, pero no se limitan a, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y de electrones; toma de imágenes de resonancia magnética y espectroscopia; fluoroscopia, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Adicionalmente, las sondas pueden ser bi- o multi-funcionales y pueden ser detectables mediante más de uno de los métodos enlistados. Estos anticuerpos se pueden marcar directa o indirectamente con dichas sondas. La unión de las 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 enlazar la sonda, entre otros métodos bien reconocidos en la materia. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido enfermo puede estar fresca o congelada, o se puede empotrar en parafina y fijar con un conservador, tal como formalina. La sección fijada o empotrada que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, en donde el anticuerpo se utiliza para detectar la expresión de las proteínas *in situ*.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir células T activadas, en donde el método comprende poner en contacto *in vitro* las células T con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humanas cargadas con antígeno expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar la célula T de una manera específica del antígeno, en donde el

antígeno es el péptido de acuerdo con la invención. Preferentemente se utiliza una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Preferentemente, la célula de mamífero carece o tiene un nivel o una función reducida del transportador de péptidos TAP. Las células adecuadas que carecen del transportador de péptidos TAP incluyen las células T2, RMA-S y de *Drosophila*. TAP es el transportador relacionado con el procesamiento de los antígenos.

La línea celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EUA, bajo el Catálogo No CRL 1992; la línea celular de *Drosophila* Schneider línea 2 está disponible en la ATCC bajo Catálogo No CRL 19863; la línea celular de ratón RMA-S se describe en Ljunggren et al. (Ljunggren y Karre, 1985).

Preferentemente, antes de la transfección, la célula hospedadora sustancialmente no expresa moléculas de MHC clase I. También se prefiere que la célula estimulante exprese una molécula importante para proporcionar una señal co-estimulante para las células T, tales como cualquiera de B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas de MHC clase I y de las moléculas co-estimulantes están públicamente disponibles en las bases de datos GenBank y EMBL.

En el caso de que se utilice un epítipo de MHC clase I como un antígeno, las células T son las células T positivas para CD8.

Si una célula presentadora de antígeno se transfecta para expresar este epítipo, preferentemente la célula comprende un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288, o una secuencia de aminoácidos variante de las mismas.

Se pueden emplear otros numerosos métodos para generar células T *in vitro*. Por ejemplo, se pueden utilizar linfocitos autólogos infiltrantes de tumores en la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL). Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) hacen uso de los linfocitos de sangre periférica (PLB) autólogos, en la preparación de células T. Adicionalmente, es posible la producción de células T autólogas mediante el impulso de las células dendríticas con péptidos o polipéptidos, o por medio de infección con virus recombinantes. También, las células B se pueden utilizar en la producción de células T autólogas. En adición, se pueden utilizar los macrófagos estimulados con péptidos o polipéptidos, o infectados con virus recombinantes, en la preparación de células T autólogas. S. Walter et al. (Walter et al., 2003) describen la estimulación *in vitro* de las células T utilizando células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), la cual también es una manera adecuada de generar células T contra el péptido de elección. En la presente invención, se generaron células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) mediante el acoplamiento de complejos de MHC:péptido preformados con la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) mediante la bioquímica de biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), lo cual permite desencadenar selectivamente respuestas específicas de los antígenos de células T con una avidez alta o baja a partir de las muestras de sangre, con una alta eficiencia. Aparte de los complejos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC):péptido, las células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) deben incorporar otras proteínas con una actividad co-estimulante tales como los anticuerpos anti-CD28 acoplados a su superficie. Adicionalmente tales sistemas basados en células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) con frecuencia requieren de la adición de factores solubles apropiados, por ejemplo, citocinas, tales como interleucina-12.

También se pueden utilizar células alogénicas en la preparación de células T, y se describe con detalle un método en la Publicación Internacional Número WO 97/26328. Por ejemplo, en adición a las células de *Drosophila* y a las células T2, se pueden utilizar otras células para presentar antígenos, tales como las células CHO, células de insectos infectadas por baculovirus, y células diana infectadas por bacterias, levadura y virus vaccinia. En adición, se pueden utilizar virus vegetales; véase, por ejemplo, Porta et al. (Porta et al., 1994) que describen el desarrollo del virus del mosaico del chicharo como un sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños.

Las células T activadas que se dirigen contra el péptido de la invención son útiles en terapia. Por consiguiente, un aspecto adicional de la invención proporciona células T activadas que se pueden obtener mediante los métodos anteriores de la invención.

Las células T activadas, que se producen mediante el método anterior, reconocerán selectivamente una célula que exprese aberrantemente un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 288.

Preferentemente, la célula T reconoce la célula mediante su interacción a través de su receptor de células T (TCR) con el complejo de HLA/péptido (por ejemplo, mediante un enlace). Las células T son útiles en un método para aniquilar las células diana en un paciente cuyas células diana expresen aberrantemente un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención, en donde al paciente se le administre un número efectivo de las células T activadas. Las células T que se administran al paciente se pueden derivar a partir del paciente y se pueden activar como se describe anteriormente (es decir, son células T autólogas). De una manera alternativa, las células T no son

a partir del paciente sino que proceden a partir de otro individuo. Desde luego, se prefiere si el individuo es un individuo sano. Mediante "individuo sano", los inventores pretenden significar que el individuo tiene una buena salud en general, preferentemente tiene un sistema inmunológico competente y, de una manera más preferible, no padece de ninguna enfermedad que se pueda probar y detectar fácilmente.

En condiciones *in vivo*, las células diana para las células T positivas para CD8 de acuerdo con la presente invención pueden ser las células del tumor (las cuales algunas veces expresan el MHC clase II) y/o las células estromales que se encuentren alrededor del tumor (células tumorales) (las cuales algunas veces también expresan el MHC clase II; (Dengjel et al., 2006)).

Las células T de la presente invención se pueden utilizar como ingredientes activos de una composición terapéutica. Se desvela además un método para aniquilar las células diana en un paciente, en donde las células diana expresen aberrantemente un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos como se desvela en el presente documento, en donde el método comprende administrar al paciente, un número efectivo de células T, como se define anteriormente.

Mediante "expresado aberrantemente", los inventores también pretenden significar que el polipéptido se sobreexpresa comparándose con los niveles de expresión normales, o que el gen está reprimido en el tejido a partir del cual deriva el tumor pero que se expresa en el tumor. Mediante "sobreexpresado", los inventores pretenden significar que el polipéptido está presente en un nivel al menos 1,2 veces de aquél presente en el tejido normal; preferentemente al menos 2 veces, y de una manera muy preferible al menos 5 veces o 10 veces el nivel presente en el tejido normal.

Las células T se pueden obtener mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos anteriormente.

Los protocolos para la denominada como transferencia adoptiva de células T son bien conocidos en la materia. Se pueden encontrar revisiones en: Gattioni et al., y en Morgan et al. (Gattioni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los péptidos que forman complejo con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para generar un receptor de células T cuyo ácido nucleico se clona y se introduce en una célula hospedadora, preferentemente en una célula T. Esta célula T diseñada se puede transferir entonces a un paciente para la terapia contra el cáncer.

Cualquier molécula de la invención, es decir, el péptido, ácido nucleico, anticuerpo, vector de expresión, célula, célula T activada, receptor de células T, o ácido nucleico que lo codifica, es útil para el tratamiento de los trastornos caracterizados por las células que escapan a la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención se puede utilizar como medicamento o en la elaboración de un medicamento. La molécula se puede utilizar por sí misma o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o cualesquiera moléculas conocidas.

La presente invención proporciona además un medicamento que es útil en el tratamiento de cáncer, en particular de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC) o leucemia linfocítica crónica (CLL), y otras neoplasias malignas.

La presente invención se refiere además a un kit, el cual comprende:

- (a) un recipiente que contiene una composición farmacéutica como se describe anteriormente, en solución o en una forma liofilizada;
- (b) opcionalmente un segundo recipiente que contiene un diluyente o una solución reconstituyente para la formulación liofilizada; y
- (c) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada.

El kit puede comprender además uno o más de (iii) un regulador, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja, o (v) una jeringa. El recipiente es preferentemente una botella, un frasco, una jeringa o un tubo de ensayo; y puede ser un recipiente para múltiples usos. La composición farmacéutica preferentemente se liofiliza.

Los kits de la presente invención preferentemente comprenden una formulación liofilizada de la presente invención en un recipiente adecuado, e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos (por ejemplo, frascos de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de doble cámara), y tubos de ensayo. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. Preferentemente, el kit y/o recipiente contiene un instructivo sobre o asociado con el recipiente, que indica las

instrucciones para la reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada se debe reconstituir hasta obtener las concentraciones del péptido, como se describe anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada para su administración subcutánea.

- 5 El recipiente que contenga la formulación puede ser un frasco para múltiples usos que permita hacer administraciones repetidas (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El kit puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, una solución de bicarbonato de sodio).

- 10 Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferentemente de al menos 0,15 mg/ml/péptido (= 75 µg), y preferentemente no mayor de 3 mg/ml/péptido (= 1.500 µg). El kit puede incluir además otros materiales recomendables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros reguladores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos de paquetes con instrucciones para usarse.

- 15 Los kits de la presente invención pueden tener un solo recipiente que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención con o sin otros componentes (por ejemplo, otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden tener un recipiente distinto para cada componente.

- 20 Preferentemente, los kits de la invención incluyen una formulación de la invención empacada para utilizarse en combinación con la administración conjunta de un segundo compuesto (tal como adyuvantes (por ejemplo, GM-CSF), un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénesis, un agente inductor de la apoptosis o un quelante), o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del kit se pueden agrupar previamente en complejos o cada componente puede estar en un recipiente distinto separado antes de su administración a un paciente. Los componentes del kit se pueden proporcionar en una o más soluciones líquidas, preferentemente, en una solución acuosa, más preferentemente, en una solución acuosa estéril. Los componentes del kit también se pueden proporcionar como sólidos, los cuales se pueden convertir en líquidos mediante la adición de los disolventes adecuados, que preferentemente se proporcionan en otro recipiente distinto.

- 30 El recipiente de un kit terapéutico puede ser un frasco, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Usualmente, cuando hay más de un componente, el kit contendrá un segundo frasco u otro recipiente, para permitir la dosificación por separado. El kit también puede contener otro recipiente para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el kit terapéutico contendrá un aparato (por ejemplo, una o más agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.), el cual haga posible la administración de los agentes de la invención que sean componentes del presente kit.

- La presente formulación es una que es adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable, tal como oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferentemente, la administración es subcutánea (s.c.), y de una manera muy preferible la administración es intradérmica (i.d.). La administración puede ser mediante una bomba de infusión.

- 45 Debido a que los péptidos de la invención se aislaron a partir de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y leucemia linfocítica crónica (CLL), el medicamento de la invención se utiliza preferentemente para el tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y leucemia linfocítica crónica (CLL).

- 55 La presente divulgación se refiere además a un método para la producción de un producto farmacéutico personalizado para un paciente individual, el cual comprende elaborar una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido seleccionado de un depósito (warehouse) de péptidos asociados con tumores (TUMAP) previamente seleccionados, en donde el al menos un péptido utilizado en la composición farmacéutica se selecciona por su idoneidad para el paciente individual. En una realización, la composición farmacéutica es una vacuna. El método también se podría adaptar para producir clones de células T para las aplicaciones corriente abajo, tales como aislamientos de los receptores de células T o anticuerpos solubles y otras opciones de tratamiento.

- 65 Un "producto farmacéutico personalizado" significará específicamente terapias personalizadas para un paciente individual que solamente se utilizará para la terapia en ese paciente individual, incluyendo vacunas contra el cáncer activamente personalizadas y terapias celulares adoptivas utilizando tejido autólogo del paciente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "archivo" (*warehouse*) se referirá a un grupo o conjunto de péptidos que se han seleccionado previamente por su inmunogenicidad y/o sobre-presentación en un tipo de tumor particular. El término "archivo" (*warehouse*) no pretende implicar que los péptidos particulares incluidos en la vacuna se hayan elaborado previamente y se hayan almacenado en un lugar físico, aunque se contempla esa posibilidad. Se contempla expresamente que los péptidos se pueden elaborar *de novo* para cada vacuna individualizada producida, o se pueden elaborar previamente y almacenar. El depósito (*warehouse*) (por ejemplo, en la forma de una base de datos) está compuesto por péptidos asociados con tumores que se sobre-expresan altamente en el tejido tumoral de los pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL), con diversos alelos de HLA-A, HLA-B y HLA-C. Puede contener péptidos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y de clase II, o péptidos alargados de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. En adición a los péptidos asociados con tumores recolectados a partir de varios tejidos tumorales, el depósito (*warehouse*) puede contener los péptidos marcadores HLA-A*02 y HLA-A*24. Estos péptidos permiten hacer la comparación de la magnitud de la inmunidad de células T inducida por los péptidos asociados con tumores (TUMAP) de una manera cuantitativa y, por consiguiente, permiten extraer importantes conclusiones sobre la capacidad de la vacuna para provocar respuestas anti-tumorales. En segundo lugar, funcionan como importantes péptidos de control positivo derivados a partir de un antígeno exógeno en el supuesto de que no se observe ninguna respuesta de células T inducida por la vacuna contra los péptidos asociados con tumores (TUMAP) derivados a partir de los auto-antígenos del paciente. Y en tercer lugar, pueden permitir extraer conclusiones con respecto al estado de inmunocompetencia del paciente.

Los péptidos asociados con tumores (TUMAP) para la presente divulgación y el depósito (*warehouse*) se identifican utilizando una estrategia que combina la genómica funcional integrada con el análisis de la expresión genética, la espectrometría de masas, y la inmunología de células T (XPresident®). La estrategia asegura que se seleccionen solamente los péptidos asociados con tumores (TUMAP) realmente presentes en un alto porcentaje de los tumores, pero que no se expresen o que se expresen sólo mínimamente en el tejido normal, para su análisis adicional. Para la selección inicial de los péptidos, se analizaron las muestras procedentes de los pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL), y de la sangre de los donantes sanos, en un planteamiento por etapas:

1. Se utilizó el análisis de expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de todo el genoma para identificar los genes expresados en muy bajos niveles en los tejidos normales importantes (no cancerosos). Se evaluó si estos genes se sobre-expresan en el tejido maligno (carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), UEC), comparándose con una gama de órganos y tejidos normales.
2. Se identificaron los ligandos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) a partir del material maligno (carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), leucemia linfocítica crónica (CLL)), mediante espectrometría de masas.
3. Los ligandos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) identificados se compararon con los datos de expresión genética. Los péptidos sobre-presentados o selectivamente presentados en el tejido tumoral, preferentemente codificados por los genes selectivamente expresados o sobre-expresados detectados en la etapa 2, se consideraron como candidatos a péptidos asociados con tumores (TUMAP) adecuados para una vacuna de múltiples péptidos.
4. Se llevó a cabo una investigación en la bibliografía con el objeto de identificar evidencia adicional que avalara la relevancia de los péptidos identificados como péptidos asociados con tumores (TUMAP).
5. La relevancia de la sobre-expresión al nivel del ARNm se confirmó volviendo a detectar en el tejido tumoral los péptidos asociados con tumores (TUMAP) seleccionados del paso 3 en el tejido tumoral y la falta de detección (o la detección infrecuente) en los tejidos sanos.
6. Con el objeto de evaluar si podía ser factible una inducción de respuestas de células T *in vivo* mediante los péptidos seleccionados, se llevaron a cabo ensayos de inmunogenicidad *in vitro* utilizando células T humanas a

partir de donantes sanos así como a partir de los pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL).

En un aspecto, los péptidos se seleccionan previamente por su inmunogenicidad antes de que se incluyan en el depósito (warehouse). A manera de ejemplo, y no de limitación, la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en el depósito (warehouse) se determina mediante un método que comprende la estimulación *in vitro* de las células T a través de estimulaciones repetidas de las células T CD8+ a partir de donantes sanos con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con los complejos de péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28.

Este método es preferido para cánceres raros y pacientes con un perfil de expresión inusual. En contraste con los cócteles mipeptídicos de composición fija que se están desarrollando actualmente, el depósito (warehouse) permite tener una concordancia significativamente más alta de la expresión real de antígenos en el tumor con la vacuna. Se utilizará un solo péptido seleccionado o combinaciones de varios péptidos "del mostrador" para cada paciente en una estrategia de múltiples dianas. En teoría, una estrategia basada en la selección de, por ejemplo, 5 péptidos antigénicos distintos a partir de una biblioteca de 50 generarían aproximadamente 17 millones de posibles composiciones de productos de fármaco (DP).

En un aspecto, los péptidos se seleccionan para incluirse en la vacuna en función de su idoneidad para el paciente individual basándose en el método como se describe en el presente documento, o como se describe más adelante.

Se recopilan los datos del fenotipo del antígeno de leucocitos humano (HLA), transcriptómicos y peptidómicos del material tumoral y de muestras de sangre del paciente para identificar los péptidos más adecuados que contengan péptidos asociados con tumores (TUMAP) contenidos en el depósito (warehouse) y exclusivos del paciente (es decir, mutados). Se seleccionarán los péptidos que se expresen selectivamente o que se sobre-expresen en los tumores de los pacientes y, cuando sea posible, que muestren una fuerte inmunogenicidad *in vitro* si se prueban con las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) individuales de los pacientes.

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante un método que comprende: (a) identificar los péptidos asociados con tumores (TUMAP) presentados por una muestra de tumor a partir del paciente individual; (b) comparar los péptidos identificados en (a) con un depósito (warehouse) (base de datos) de péptidos, como se describe anteriormente; y (c) seleccionar al menos un péptido a partir del depósito (warehouse) (base de datos) que se correlacione con un péptido asociado con tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los péptidos asociados con tumores (TUMAP) presentados por la muestra de tumor se identifican mediante: (a1) comparar los datos de expresión a partir de la muestra del tumor con los datos de expresión a partir de una muestra del tejido normal correspondiente al tipo de tejido de la muestra del tumor para identificar las proteínas que sean sobreexpresadas o aberrantemente expresadas en la muestra del tumor; y (a2) correlacionar los datos de expresión con las secuencias de los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) enlazados a las moléculas de MHC clase I y/o clase II en la muestra de tumor, con el fin de identificar los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) derivados a partir de las proteínas sobre-expresadas o aberrantemente expresadas por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se identifican eluyendo los péptidos enlazados a partir de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) aisladas de la muestra del tumor, y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra de tumor y el tejido normal se obtienen a partir del mismo paciente.

En adición a, o como una alternativa para, seleccionar los péptidos utilizando un modelo de depósito (warehouse) (base de datos), los péptidos asociados con tumores (TUMAP) se pueden identificar en el paciente *de novo*, y luego se pueden incluir en la vacuna. Como un ejemplo, los péptidos asociados con tumores (TUMAP) candidatos se pueden identificar en el paciente mediante: (a1) comparar los datos de expresión a partir de la muestra del tumor con los datos de expresión a partir de una muestra del tejido normal correspondiente al tipo de tejido de la muestra del tumor, con el fin de identificar las proteínas que sean sobre-expresadas o aberrantemente expresadas en la muestra del tumor; y (a2) correlacionar los datos de expresión con las secuencias de los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) enlazados a las moléculas de MHC clase I y/o clase II en la muestra de tumor, con el fin de identificar los ligandos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) derivados a partir de las proteínas sobre-expresadas o aberrantemente expresadas por el tumor. Como otro ejemplo, se pueden identificar proteínas que contengan mutaciones que sean únicas para la muestra del tumor en relación con el tejido normal correspondiente a partir del paciente individual, y se pueden identificar los péptidos asociados con tumores (TUMAP) que se dirijan específicamente hacia la mutación. Por ejemplo, el genoma del tumor y del tejido normal correspondiente se puede secuenciar mediante la secuenciación del genoma entero. Para el descubrimiento de las mutaciones que no sean sinónimas en las regiones codificantes de proteínas de los genes, se extraen el ADN y el ARN genómicos de los tejidos tumorales y el ADN genómico de la línea germinal normal y no mutado de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicada queda limitada a la re-

secuenciación de las regiones codificantes de proteínas (re-secuenciación del exoma). Para este propósito, se captura el ADN exónico a partir de las muestras humanas utilizando kits de enriquecimiento dirigido suministrados por el proveedor, y se procede a la secuenciación con, por ejemplo, un secuenciador HiSeq2000 (Illumina). Adicionalmente, se secuencia el ARNm del tumor para determinar la cuantificación directa de la expresión genética y validación de que los genes mutados se expresen en los tumores de los pacientes. Los millones de lecturas de secuencia resultantes se procesan a través de algoritmos de software. La lista de resultados contiene mutaciones y la expresión genética. Las mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan mediante una comparación con las variaciones de la línea germinal derivadas de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* entonces se pueden analizar para determinar su inmunogenicidad como se describe anteriormente para el depósito (warehouse), y se seleccionan los péptidos asociados con tumores (TUMAP) candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada para incluirse en la vacuna.

En una realización de ejemplo, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificar los péptidos asociados con tumores (TUMAP) presentados por una muestra de tumor a partir del paciente individual mediante el método como se describe anteriormente; (b) comparar los péptidos identificados en a) con un depósito (warehouse) de péptidos que se hayan seleccionado previamente por su inmunogenicidad y sobre-presentación en los tumores, comparándose con el tejido normal correspondiente; (c) seleccionar al menos un péptido a partir del depósito (warehouse) que se correlacione con un péptido asociado con tumor identificado en el paciente; y (d) opcionalmente, seleccionar al menos un péptido identificado *de novo* en (a) con el fin de confirmar su inmunogenicidad.

En una realización de ejemplo, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante: (a) identificar los péptidos asociados con tumores (TUMAP) presentados por una muestra de tumor a partir del paciente individual; y (b) seleccionar al menos un péptido identificado *de novo* en (a) y confirmar su inmunogenicidad.

Una vez que se seleccionan los péptidos para una vacuna basada en péptidos personalizados, se produce la vacuna. La vacuna preferentemente es una formulación líquida que consiste en los péptidos individuales disueltos en el 20 al 40 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO), preferentemente en aproximadamente el 30 al 35 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO), tal como en aproximadamente el 33 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

Cada péptido que se vaya a incluir en un producto, se disuelve en sulfóxido de dimetilo (DMSO). La concentración de cada solución de péptido se tiene que seleccionar dependiendo del número de péptidos que se vayan a incluir en el producto. Cada solución de péptido y sulfóxido de dimetilo (DMSO) se mezcla en partes iguales para lograr una solución que contenga todos los péptidos que se vayan a incluir en el producto, con una concentración de aproximadamente 2,5 mg/ml por péptido. La solución mixta entonces se diluye a 1:3 con agua para inyecciones con el fin de alcanzar una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en un 33 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO). La solución diluida se filtra a través de un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución final a granel.

La solución final a granel se envasa en frascos y se almacena a -20 °C hasta su uso. Un frasco contiene 700 µl de solución, que contiene 0,578 mg de cada péptido. De esto, 500 µl (aproximadamente 400 µg por péptido) se aplicarán mediante la inyección intradérmica.

Además de ser útiles para el tratamiento de cáncer, el péptido de la presente invención también es útil en el diagnóstico. Debido a que los péptidos se generaron a partir de las células de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y leucemia linfocítica crónica (CLL), y debido a que se determinó que estos péptidos no están presentes o lo están en niveles más bajos en los tejidos normales, tales péptidos se pueden utilizar para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en las biopsias de tejido, las muestras de sangre pueden ayudar al patólogo en el diagnóstico del cáncer. La detección de ciertos péptidos por medio de anticuerpos, espectrometría de masas, u otros métodos conocidos en la técnica, puede advertir al patólogo de que la muestra de tejido es maligna o está inflamada o enferma en general, o se puede utilizar como un biomarcador de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH)/cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), carcinoma de células de Merkel (MCC), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloblástica aguda (AML), cáncer de vesícula biliar (GBC), colangiocarcinoma (CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), o leucemia linfocítica crónica (CLL). La presencia de los grupos de péptidos puede permitir que se haga la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

La detección de los péptidos en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir acerca del beneficio de las terapias que involucren al sistema inmunológico, en especial si se sabe o se prevé que estén implicados los linfocitos

T en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es un mecanismo conocido mediante el cual las células infectadas o malignas logran eludir la vigilancia del sistema inmunológico. Por consiguiente, la presencia de los péptidos muestra que este mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

El péptido de la presente invención se podrían utilizar para analizar las respuestas de los linfocitos contra esos péptidos, tales como las respuestas de células T o las respuestas de los anticuerpos contra el péptido o contra el péptido formando complejo con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Estas respuestas de los linfocitos se pueden utilizar como marcadores de pronóstico para decidir los pasos posteriores de la terapia. Estas respuestas también se pueden utilizar como marcadores de respuesta subrogados en las estrategias de inmunoterapia que tienen como objetivo inducir respuestas de linfocitos a través de diferentes medios, por ejemplo, vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia adoptiva de linfocitos. En el contexto de la terapia genética, se pueden considerar las respuestas de los linfocitos contra los péptidos en la evaluación de los efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también podría ser una herramienta valiosa para para los exámenes de seguimiento en terapias de trasplantes, por ejemplo, para la detección de enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

A continuación se describirá la presente invención en los siguientes ejemplos que describen las realizaciones preferidas de la misma, y con referencia a las figuras acompañantes, aunque no obstante, sin limitarse a las mismas.

Figuras

Las Figuras 1A a 1J muestran la sobre-presentación de diversos péptidos en diferentes tejidos de cáncer comparándose con los tejidos normales. Los análisis incluyeron datos a partir de más de 170 muestras de tejido normal, y 376 muestras de cáncer. Se ilustran solamente las muestras en donde se encontró que está presente el péptido. Figura 1A - Gen: CENPE, Péptido: KLQEKIQEL (SEQ ID NO: 1), tejidos de izquierda a derecha: 4 líneas celulares de cáncer leucocitario, 1 línea celular de cáncer pancreático, 1 línea celular de melanoma, 2 muestras de tejido normal (1 glándula suprarrenal, 1 bazo), 31 muestras de tejido de cáncer primario (1 cáncer de cerebro, 4 cánceres de colon, 1 cáncer esofágico, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de hígado, 1 6 cánceres de pulmón, 4 cánceres de ovarios, 1 cáncer rectal, 1 cáncer gástrico). Figura 1B - Gen: KIF15, Péptido: QLIEKNWLL (SEQ ID NO: 10), tejidos de izquierda a derecha: 5 líneas celulares de cáncer leucocitario, 1 línea celular de cáncer pancreático, 1 línea celular de leucemia mieloide, 1 muestra de tejido normal (1 glándula suprarrenal), 29 muestras de tejido de cáncer (4 cánceres de colon, 2 cánceres esofágicos, 1 cáncer leucocitario, 1 cáncer de hígado, 10 cánceres de pulmón, 11 cánceres de ovarios). Figura 1C - Gen: HAVCR1, Péptido: LLDPKTIFL (SEQ ID NO: 11), tejidos de izquierda a derecha: 1 línea celular de cáncer de riñón, 13 muestras de tejido de cáncer (8 cánceres de riñón, 1 cáncer de hígado, 2 cánceres de pulmón, 2 cánceres rectales). Figura 1D - Gen: RPGRIP1L, Péptido: RLHDENILL (SEQ ID NO: 13), tejidos de izquierda a derecha: 1 líneas celulares de cáncer de riñón, 1 línea celular de cáncer de próstata, 1 línea celular de melanoma, 50 muestras de tejido de cáncer (4 cánceres de cerebro, 1 cáncer de colon, 2 cánceres esofágicos, 3 cánceres de riñones, 2 cánceres de hígado, 23 cánceres de pulmón, 7 cánceres de ovarios, 2 cánceres pancreáticos, 2 cánceres de próstata, 3 cánceres rectales, 1 cáncer gástrico). Figuras 1E a 1J - muestran la sobre-presentación de diversos péptidos en diferentes tejidos de cáncer comparándose con tejidos normales. Los análisis incluyeron datos a partir de más de 320 muestras de tejido normal, y 462 muestras de cánceres. Se ilustran solamente las muestras en donde se encontró que está presente el péptido. Figura 1E - Gen: ADNH14, Péptido: SVLEKEIYSI (SEQ ID NO: 2), tejidos de izquierda a derecha: 4 líneas celulares (3 células sanguíneas, 1 pancreático), 2 tejidos normales (1 ganglio linfático, 1 tráquea), 52 tejidos de cáncer (2 cánceres de conducto biliar, 1 cáncer de células mieloides, 3 cánceres de leucemia leucocitaria, 5 cánceres de mama, 1 cáncer esofágico, 1 cáncer de esófago y estómago, 1 cáncer de vesícula biliar, 4 cánceres de colon, 7 cánceres de pulmón, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 7 cánceres de ovarios, 4 cánceres de próstata, 4 cánceres de piel, 2 cánceres de vejiga urinaria, 4 cánceres de útero). Figura 1F - Gen: MAGEA3, MAGEA6, Péptido: KIWEELSVLEV (SEQ ID NO: 40), tejidos de izquierda a derecha: 8 tejidos de cáncer (1 cáncer de hígado, 3 cánceres de pulmón, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria). Figura 1G - Gen: HMX1, Péptido: FLIENLLAA (SEQ ID NO: 67), tejidos de izquierda a derecha: 7 tejidos de cáncer (4 cánceres de cerebro, 2 cánceres de pulmón, 1 cáncer de útero). Figura 1H - Gen: CCDC138, Péptido: FLLEREQLL (SEQ ID NO: 84), tejidos de izquierda a derecha: 3 líneas celulares (2 células sanguíneas, 1 piel), 24 tejidos de cáncer (1 cáncer de células mieloides, 3 cánceres de leucemia leucocitaria, 1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de colon, 3 cánceres rectales, 1 cáncer de pulmón, 7 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero). Figura 1I - Gen: CLSPN, Péptido: SLLNQPKAV (SEQ ID NO: 235), tejidos de izquierda a derecha: 13 líneas celulares (3 células sanguíneas, 2 riñón, 8 páncreas), 30 tejidos de cáncer (1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de leucemia leucocitaria, 2 cánceres de cerebro, 2 cánceres de mama, 2 cánceres esofágicos, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer rectal, 2 cánceres de hígado, 4 cánceres de pulmón, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres de ovarios, 2 cánceres de piel, 4 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero). Figura 1J - Gen: SPC25, Péptido: GLAEFQENV (SEQ ID NO: 243), tejidos de izquierda a derecha: 3 líneas celulares (1 células sanguíneas, 1 riñón, 1 páncreas), 67 tejidos de cáncer (1 cáncer del conducto biliar, 4 cánceres de leucemia leucocitaria, 1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de cerebro, 3 cánceres de mama, 4 cánceres esofágicos, 2 cánceres de vesícula biliar, 2 cánceres de colon, 1 cáncer rectal, 2 cánceres de hígado, 15 cánceres de pulmón, 8 cánceres de ganglios linfáticos, 9 cánceres de ovarios, 3 cánceres de piel, 4

cánceres de vejiga urinaria, 6 cánceres de útero).

Las Figuras 2A a 2H muestran ejemplos de los perfiles de expresión (expresión relativa comparándose con riñón normal) de los genes de origen desvelados en el presente documento que se sobreexpresan altamente o se expresan exclusivamente en diferentes cánceres comparándose con un panel de tejidos normales. Figura 2A - PRIM2 - Tejidos de izquierda a derecha: glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (completo), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa un grupo de diferentes donantes), 22 muestras individuales de cáncer de próstata. Figura 2B - CHEK1 - Tejidos de izquierda a derecha: glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (completo), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa un grupo de diferentes donantes), 10 muestras de cánceres colorrectales individuales. Figura 2C - TTC30A - Tejidos de izquierda a derecha: glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (completo), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa un grupo de diferentes donantes), 30 muestras de cánceres de cerebro individuales. Figura 2D - TRIP13 - Tejidos de izquierda a derecha: glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (completo), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa un grupo de diferentes donantes), 1 muestra de pulmón normal individual, 38 muestra de cánceres de pulmón individuales. Figura 2E - MXRA5 - Tejidos de izquierda a derecha: glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro (completo), mama, colon, esófago, corazón, riñón (triplicado), leucocitos, hígado, pulmón, ganglio linfático, ovario, páncreas, placenta, próstata, glándula salival, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos, timo, glándula tiroides, vejiga urinaria, cuello uterino, útero, vena (cada muestra normal representa un grupo de diferentes donantes), 9 muestras individuales de cáncer pancreático. Las Figuras 2F a 2H muestran los ejemplos de los perfiles de expresión de los genes de origen de la presente divulgación, que se sobre-expresan altamente o se expresan exclusivamente en el cáncer en un panel de tejidos normales (barras blancas), y diferentes muestras de cáncer (barras negras). Figura 2F - MMP11, MMP13 (SEQ ID NO: 24) - Tejidos de izquierda a derecha: 80 muestras de tejido normal (6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 glándulas pituitarias, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículos, 1 timo, 1 útero), 50 muestras de cáncer (10 cánceres de mama, 4 cánceres de conducto biliar, 6 cánceres de vesícula biliar, 11 cánceres de esófago, 10 cánceres de vejiga urinaria, 10 cánceres de útero). Figura 2G - HORMAD1 (SEQ ID NO: 168) - Tejidos de izquierda a derecha: 80 muestras de tejido normal (6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 glándulas pituitarias, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículos, 1 timo, 1 útero), 41 muestras de cáncer (10 cánceres de mama, 10 cánceres de piel, 11 cánceres pulmonares no microcíticos, 10 cánceres pulmonares microcíticos). Figura 2H - IGF2BP1, IGF2BP3 (SEQ ID NO: 274) - Tejidos de izquierda a derecha: 80 muestras de tejido normal (6 arterias, 2 células sanguíneas, 2 cerebros, 1 corazón, 2 hígados, 3 pulmones, 2 venas, 1 tejido adiposo, 1 glándula suprarrenal, 5 médulas óseas, 1 cartílago, 1 colon, 1 esófago, 2 ojos, 2 vesículas biliares, 1 riñón, 6 ganglios linfáticos, 4 páncreas, 2 nervios periféricos, 2 glándulas pituitarias, 1 recto, 2 glándulas salivales, 2 músculos esqueléticos, 1 piel, 1 intestino delgado, 1 bazo, 1 estómago, 1 glándula tiroides, 7 tráqueas, 1 vejiga urinaria, 1 mama, 5 ovarios, 5 placentas, 1 próstata, 1 testículos, 1 timo, 1 útero), 53 muestras de cáncer (4 cánceres de conducto biliar, 6 cánceres de vesícula biliar, 10 cánceres de ganglios linfáticos, 12 cánceres de ovario, 11 cánceres de esófago, 10 cánceres de pulmón).

Las Figuras 3A y 3B muestran ejemplos de los datos de inmunogenicidad: Resultados de la citometría de flujo después del tinte del multímero específico del péptido.

Las Figuras 4A a 4R muestran, en la parte superior: Las intensidades medias de las señales EM a partir de las mediciones técnicas replicadas están graficadas como puntos para las muestras individuales normales positivas para HLA-A*02, así como para las muestras tumorales en los que se detectó el péptido. Las muestras tumorales y normales están agrupadas de acuerdo con el órgano de origen, y los diagramas de distribución de datos (box-and-whisker) representan la media, el 25º y el 75º percentil (box [caja]), y la mínima y máxima (whiskers [bigotes]) de las intensidades de señal normalizadas sobre múltiples muestras. Los órganos normales están ordenados de acuerdo con las categorías de riesgo (células sanguíneas, sistema cardiovascular, cerebro, hígado, pulmón: riesgo alto; órganos reproductores, mama, próstata: riesgo bajo; todos los otros órganos: riesgo medio). Parte inferior: La

frecuencia relativa de detección de péptidos en cada órgano se muestra como una gráfica de espinas (spine plot). Los números debajo del panel indican los números de muestras en los que se detectó el péptido del número total de muestras analizadas para cada órgano (N = 298 para las muestras normales, N = 461 para las muestras tumorales). Si el péptido se ha detectado en una muestra pero no se pudo cuantificar por razones técnicas, la muestra se incluye en esta representación de frecuencia de detección, pero no se muestra en la parte superior de la figura. Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; cel.sang.: células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartílago; colorect: colon y recto; duod.: duodeno; esóf.: esófago; ojo; v.bil.: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc.: páncreas; paratir.: glándula paratiroides; perit.: peritoneo; pituit.: pituitaria; pleura; gland.sal.: glándula salival; mus.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras tumorales: AML: leucemia mieloide aguda; PCA: cáncer de próstata; BRCA: cáncer de mama; CLL: leucemia linfocítica crónica; CRC: cáncer colorrectal; GALB: cáncer de vesícula biliar; HCC: carcinoma hepatocelular; MEL: melanoma; NHL: linfoma no de Hodgkin; OC: cáncer de ovario; OSCAR: cáncer esofágico; OSC_GC: cáncer esofágico/gástrico; PC: cáncer pancreático; GB: glioblastoma; GC: cáncer gástrico; NSCLC: cáncer de pulmón no microcítico; RCC: carcinoma de células renales; SCLC: cáncer de pulmón microcítico; UBC: carcinoma de vejiga urinaria; UEC: cáncer uterino y endometrial.

Las Figuras 5A a 5R muestran los ejemplos de perfiles de expresión de los genes de origen desvelados en el presente documento que se sobre-expresan en diferentes muestras de cáncer. Las muestras de tumor (ilustradas por puntos) y las muestras normales (ilustradas por puntos) están agrupadas de acuerdo con los órganos de origen, y los diagramas de distribución de datos (box-and-whisker) representan los valores de RPKM de la media, el 25º y el 75º percentil (box [caja]), y la mínima y máxima (whiskers [bigotes]). Los órganos normales están ordenados de acuerdo con las categorías de riesgo. RPKM = lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas. Muestras normales: arteria; cel.sang.: células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl.supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartílago; colorect: colon y recto; esóf.: esófago; ojo; v.bil.: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc.: páncreas; pituit.: pituitaria; gland.sal.: glándula salival; mus.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras tumorales: AML: leucemia mieloide aguda; PCA: cáncer de próstata; BRCA: cáncer de mama; CLL: leucemia linfocítica crónica; CRC: cáncer colorrectal; GALB: cáncer de vesícula biliar; HCC: carcinoma hepatocelular; MEL: melanoma; NHL: linfoma no de Hodgkin; OC: cáncer de ovario; OSCAR: cáncer esofágico; PC: cáncer pancreático; GB: glioblastoma; GC: cáncer gástrico; NSCLC: cáncer de pulmón no microcítico; RCC: carcinoma de células renales; SCLC: cáncer de pulmón microcítico; UBC: carcinoma de vejiga urinaria; UEC: cáncer uterino y endometrial.

Las Figuras 6A a 6M muestran los resultados de ejemplo de las respuestas de células T CD8+ específicas del péptido *in vitro* de un donante de HLA-A*02+ sano. Las células T CD8+ se prepararon utilizando células presentadoras de antígeno (APC) artificiales recubiertas con mAb anti-CD28 y HLA-A*02, en complejo con, por ejemplo, el péptido de la SEQ ID NO: 11 (Figura 6A, panel de la izquierda) o el péptido de la SEQ ID NO: 14 (Figura 6B, panel de la izquierda), respectivamente (SEQ ID NO: 157 (Figura 6C), 233 (Figura 6D), 85 (Figura 6E), 89 (Figura 6F), 155 (Figura 6G), 153 (Figura 6H), 264 (Figura 6I), 117 (Figura 6J), 253 (Figura 6K), 39 (Figura 6L), y 203 (Figura 6M)). Después de tres ciclos de estimulación, se llevó a cabo la detección de las células reactivas al péptido mediante teñido de multímero 2D con el multímero relevante, por ejemplo, A*02/SEQ ID NO: 11 (Figura 6A) o A*02/SEQ ID NO: 14 (Figura 6B). Los paneles de la derecha (por ejemplo, Figura 6A y Figura 6B) muestran el teñido de control de las células estimuladas con los complejos de A*02/péptido irrelevantes. Las células individuales viables se canalizaron para los linfocitos CD8+. Las compuertas Booleanas ayudaron a excluir los eventos positivos-falsos detectados con los multímeros específicos para diferentes péptidos. Se indican las frecuencias de las células positivas para los multímeros específicos entre los linfocitos CD8+.

Las Figuras 7A a 7C muestran la sobre-presentación de diversos péptidos en diferentes tejidos de cáncer comparándose con los tejidos normales. Los análisis incluyeron los datos a partir de más de 320 muestras de tejido normal, y 462 muestras de cáncer. Se ilustran solamente las muestras en donde se encontró que está presente el péptido. Figura 7A - Gen: CCR8, Péptido: LLIPFTIFM (SEQ ID NO: 43), tejidos de izquierda a derecha: 1 6 tejidos de cáncer (1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 7 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de ovarios, 1 cáncer de piel); Figura 7B - Gen: CXCR5, Péptido: ILVTSIFFL (SEQ ID NO: 152), tejidos de izquierda a derecha: 6 tejidos normales (1 ganglio linfático, 5 bazos), 1 6 tejidos de cáncer (8 cánceres de leucemia leucocitaria, 8 cánceres de ganglios linfáticos); Figura 7C - Gen: CYSLTR1, Péptido: VILTSSPFL (SEQ ID NO: 156), tejidos de izquierda a derecha: 3 tejidos normales (1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 bazo), 11 tejidos de cáncer (2 cánceres de mama, 5 cánceres de leucemia leucocitaria, 3 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides).

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación y cuantificación de los péptidos asociados con tumores presentes sobre la superficie celular

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de los pacientes se obtuvieron en Asterand (Detroit, EUA y Royston, Herts, Reino Unido (UK)); Val d'Hebron University Hospital (Barcelona); BioServe (Beltsville, MD, EUA); Center for cancer immune therapy (CCIT), Herlev Hospital (Herlev); Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA); University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; University Hospital of Munich; Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM); Osaka City University (OCU); Inc. ProteoGenex, (Culver City, CA, EUA); University Hospital of Tübingen. Los tejidos normales se obtuvieron en Bio-Options Inc., CA, EUA; BioServe, Beltsville, MD, EUA; Capital BioScience Inc., Rockville, MD, EUA; Geneticist Inc., Glendale, CA, EUA; University Hospital of Geneva; University Hospital of Heidelberg; University Hospital Munich; ProteoGenex Inc., Culver City, CA, EUA; University Hospital of Tübingen. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica o de la autopsia. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y se almacenaron hasta el aislamiento de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) a -70 °C o menos.

Aislamiento de péptidos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) a partir de las muestras de tejido

Las mezclas de péptidos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron mediante la inmunoprecipitación de los tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk et al., 1991: 290-296; Seeger et al., 1999) usando el anticuerpo específico de HLA-A*02, BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, -B y -C, W6/32, Sepharose activada con CNBr, tratamiento con ácido, y ultrafiltración.

Análisis de espectrometría de masas

Las mezclas de péptidos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) se separaron en función de su hidrofobicidad mediante cromatografía en fase inversa (sistema de UPLC nanoAcquity, Waters), y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbridos de fusión LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente de ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundida (75 micras de diámetro interno x 250 milímetros) empacada con material de fase inversa C18 de 1,7 micras (Waters), aplicando una velocidad de flujo de 400 nl por minuto. Posteriormente, los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos pasos del 10 % al 33 % de B, a una velocidad de flujo de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por el disolvente A (ácido fórmico al 0,1 % en agua) y el disolvente B (ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente de nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto con oro (PicoTip, New Objective). Los espectrómetros de masas LTQ-Orbitrap se hicieron funcionar en el modo dependiente de datos mediante la estrategia TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el Orbitrap (R = 30000), al que siguieron barridos de EM/EM también en el Orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones previamente seleccionados. Los espectros de masas en fila se interpretaron con SEQUEST y el control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación del péptido natural generado con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia.

La cuantificación relativa de la CL-EM sin marcador se efectuó mediante un recuento iónico, es decir, mediante la extracción y el análisis de las características de CL-EM (Mueller et al., 2007). El método supone que las áreas de señal de CL-EM del péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron además mediante la desconvolución del estado de carga y el alineamiento del tiempo de retención (Mueller et al., 2008; Sturm et al., 2008). Por último, todas las características de CL-EM se cotejaron con los resultados de la identificación de secuencias para combinar los datos cuantitativos de las diferentes muestras y tejidos con los perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en una proporción de dos tercios de acuerdo con la tendencia central para tomar en cuenta la variación entre las réplicas técnicas y biológicas. De ese modo, cada péptido identificado se puede asociar con los datos cuantitativos que permiten la cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Asimismo, todos los datos cuantitativos adquiridos de los candidatos peptídicos se revisaron manualmente para comprobar la coherencia de los datos y verificar la exactitud del análisis automático. Los perfiles yuxtaponen las muestras de cáncer en una línea base de las muestras de tejido normal. Los perfiles de presentación de los ejemplos de los péptidos sobrepresentados se muestran en la Figura 1. En la Tabla 4 se muestra un panorama de la presentación de péptidos a través de las entidades para los péptidos seleccionados.

Tabla 4: Imagen global de presentación de los péptidos seleccionados a través de las entidades. Un péptido se consideró interesante en una entidad si se sobrepresentó en las muestras de cáncer de esta entidad comparándose con los tejidos normales. MEL = melanoma, BRCA = cáncer de mama, OSCAR = carcinoma esofágico. BPH incluye hiperplasia de próstata benigna así como cáncer pancreático.

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular
1	KLQEKIQL	GB, GC, NSCLC, HCC, OC, RCC, CRC, PC, OSCAR
2	SVLEKEIYSI	NSCLC, HCC, BPH, OC, CRC, PC
3	RVIDDSLVLGV	NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular
4	VLFGELPAL	GB, NSCLC, BRCA, RCC, PC, OC, PC
5	GLVDIMVHL	NSCLC, RCC, OC
7	ALLQALMEL	GC, NSCLC, RCC, CRC, PC
8	ALSSSQAIEV	GB, NSCLC, OC, CRC, PC
9	SLITGQDLLSV	NSCLC, BPH, OC, MEL, PC, OSCAR
10	QLIEKNWLL	NSCLC, OC, CRC, PC, HCC, CLL, OSCAR
11	LLDPKTIFL	NSCLC, HCC, RCC, CRC
12	RLLDPKTIFL	NSCLC, RCC
13	RLHDENILL	GB, GC, NSCLC, HCC, BPH, OC, RCC, CRC, PC, OSCAR
14	YTFSGDVQL	GC, NSCLC, CRC, PC, OSCAR
15	GLPSATTTV	GC, NSCLC, OC, PC
16	SLADLSLLL	NSCLC, HCC, PC
17	GLLPSAESIKL	NSCLC, BPH, OC, OSCAR
18	KTASINQNV	NSCLC, CRC, PC, OSCAR, OC
19	KVFELDLVTL	GC, NSCLC, CRC, OSCAR
21	YLMDDFSSL	PC, NSCLC
22	LMYPYIYHV	GB, NSCLC, OC, OSCAR
23	ALLSPLSLA	PC
24	KVWSDVTPL	PC, NSCLC
25	LLWGHPRVALA	CRC, PC, NSCLC
26	VLDGKVAVV	HCC, MEL, OC, GB, GC, NSCLC
27	GLLGKVTSTV	NSCLC, BRCA
29	KMISAIPTL	NSCLC, OC
34	TLNTLDINL	OC, PC
35	VIIKGLEEI	GC, NSCLC, OSCAR
36	TVLQELINV	NSCLC, PC, OSCAR
37	QIVELIEKI	GC, NSCLC, OSCAR
39	YLEDGFAYV	GB, NSCLC, HCC, PC
40	KIWEELSVLEV	GC, NSCLC, HCC, MEL
43	LLIPFTIFM	NSCLC, MEL, CRC, OC
44	AVFNLVHV	GC, NSCLC, PC
46	ISLDEVAVSL	GB, NSCLC, HCC, OC
47	GLNGFNVLL	PC, OSCAR
48	KISDFGLATV	GB, NSCLC, PC, OSCAR
49	KLIGNIHGNEV	GB, NSCLC, OC
50	ILLSVLHQL	NSCLC, CRC
51	LDSEALLTL	GB, NSCLC, HCC
52	TIGIPFPNV	NSCLC, PC, OC
53	AQHLSTLLL	GC, NSCLC
54	YLVPGLVAA	NSCLC, OC
55	HLFDKIIKI	GC, CRC
56	VLQENSDDYQSNL	NSCLC, HCC
57	TLYPGRFDYV	NSCLC, PC
58	HLLGEGAFAQV	NSCLC, PC

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular
59	ALADGIKSFLL	NSCLC, PC
60	YLFSQGLQGL	NSCLC, PC
61	ALYPKEITL	NSCLC, CRC
63	KLLPMVIQL	NSCLC, PC
65	SLSEKSPEV	NSCLC, OC, OSCAR, MEL
66	AMFPDTIPRV	NSCLC, OC
67	FLIENLLAA	GB, NSCLC
68	QLMNLIRSV	HCC, PC
69	LKVLKADVVL	GC, NSCLC
70	GLTEKTVLV	NSCLC, PC
71	HMSGKLTNV	NSCLC, PC
73	SVPKTLGV	GB, RCC
74	GLAFLPASV	GC, CRC
76	FTAEFLEKV	NSCLC, PC, GB, OSCAR
77	ALYGNVQQV	NSCLC, OC
82	ILAEPIYIRV	NSCLC, PC, OSCAR, OC
83	GLLENSPHL	NSCLC, OC
84	FLLEREQLL	NSCLC, MEL, RCC, CRC, PC
85	KLLDKPEQFL	NSCLC, OC, MEL, CRC
86	SLFSNIESV	NSCLC, BPH, CRC
88	LLLPLELSLA	GB, NSCLC, PC
89	SLAETIFIV	GC, NSCLC, OC
92	RLFEEVLGV	NSCLC, HCC, OC, OC
93	RLYGYFHDA	NSCLC, PC
94	YLDEVAFML	NSCLC, HCC, OC
95	KLIDEDPLFL	NSCLC, OC
96	ALDTTRHEL	NSCLC, PC
97	KLFESTGL	NSCLC, CRC
98	FVQEKIPEL	GC, CRC
100	ALQSFEFRV	OC, RCC
101	SLLEVNEASSV	GC, CLL
102	GLYPVTLVGV	BPH, OC
114	LLFPSDVQTL	PC, OSCAR
116	ALLSSVAEA	NSCLC, OSCAR, OC
117	TLLEGISRA	NSCLC, OC
134	SLYKSFLQL	NSCLC, OSCAR, OC
137	KLIYKDLVSV	NSCLC, OC, PC
146	VVAAGLAGA	NSCLC, OSCAR, OC
158	YLDPLWHQL	PC, OC
165	SLLDYEYSI	NSCLC, OSCAR, OC
166	LLGDSSFFL	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, PC
170	FIAAVVEKV	NSCLC, OC
175	SLLDLVQSL	PC, OC
176	VQSGLRILL	NSCLC, OSCAR

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular
184	ALDSTIAHL	NSCLC, OC
191	AAIEIFEKV	NSCLC, OSCAR, OC
203	FLFVDPVL	NSCLC, GC, OC
229	YLYELEHAL	NSCLC, OC
233	SLFESLEYL	NSCLC, OSCAR, OC
234	VLLNEILEQV	GC, NSCLC, HCC, OC, MEL, RCC, CRC, PC, OSCAR
235	SLLNQPKAV	GB, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR
236	KMSELQTYV	GB, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC
237	ALLEQTGDMSL	NSCLC, OC, MEL, CRC
239	VIKGLEEITV	GC, NSCLC, HCC, OC, MEL, CRC, PC
241	KQFEGTVEI	NSCLC, MCC, OC, CRC, PC, OSCAR
242	KLQEEIPVL	GB, NSCLC, CRC
243	GLAEFQENV	GB, NSCLC, HCC, OC, CRC, PC, OSCAR
244	NVAEIVIH	GC, NSCLC
246	ALAGIVTNV	NSCLC, HCC, OC, MEL, RCC
247	NLLIDDKGTIKL	NSCLC, HCC, MEL, CRC, PC
248	VLMQDSRLYL	NSCLC, CRC, PC
251	LLWGNLPEI	NSCLC, MEL, CRC, PC, OC
252	SLMEKNQSL	NSCLC, OC, CRC, OSCAR, RCC
253	KLLAVIHEL	NSCLC, RCC, CRC, PC, OSCAR, OC
254	ALGDKFLLRV	NSCLC, HCC, MEL, OC
255	FLMKNSDLYGA	NSCLC, HCC, MEL, PC, OSCAR
256	FLNDIFERI	NSCLC, HCC, CLL, OC
257	KLIDHQGLYL	NSCLC, OC, CRC, OSCAR
258	QLVQRVASV	NSCLC, OC
259	GPGIFPPPPQP	NSCLC, BPH, OSCAR, OC
260	ALNESLVEC	NSCLC, MEL, OSCAR, OC
261	GLAALAVHL	NSCLC, OC, MEL, CRC, PC, OSCAR
262	LLLEAVWHL	NSCLC, CRC
263	SIIEYLPTL	NSCLC, MEL, PC
264	TLHDQVHLL	NSCLC, BPH, OC
265	FLLDKPQDLSI	NSCLC, OC, RCC
266	FLLDKPQDL	RCC, OC
267	YLLDMPLWYL	NSCLC, RCC, CRC, OC, MEL
269	GLLDCPIFL	NSCLC, CRC, OSCAR, OC
270	TLLTFFHEL	GB, PC
271	VLIEYNFSI	NSCLC, OC
272	FVMEGEPPKL	NSCLC, OC
273	SLNKQIETV	NSCLC, OC
274	TLYNPERTITV	NSCLC, PC, HCC
277	KLQEELNKV	HCC, OC
281	LLLESDPKVYSL	PC, OC
284	KLMDPGSLPPL	NSCLC, OC
287	KIQEILTQV	GB, GC, NSCLC, HCC, CLL, OC, MEL, RCC, CRC, PC, OSCAR

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular
288	SLYKGLLSV	GB, NSCLC, HCC, BPH, OC, RCC, CRC, PC, OSCAR

5 Tabla 4B: Imagen global de presentación de los péptidos seleccionados a través de las entidades GB = glioblastoma, BRCA = cáncer de mama, CRC = cáncer colorrectal, RCC = carcinoma de células renales, CLL = leucemia linfocítica crónica, HCC = carcinoma hepatocelular, NSCLC = cáncer de pulmón no microcítico, SCLC = cáncer de pulmón microcítico, NHL = linfoma no de Hodgkin, AML = leucemia mieloide aguda, OC = cáncer de ovario, PC = cáncer pancreático, BPH = cáncer de próstata e hiperplasia de próstata benigna, OSCAR = cáncer esofágico, incluyendo cáncer de la unión gástrica-esofágica, GBC_CCC = adenocarcinoma y colangiocarcinoma de vesícula biliar, MEL = melanoma, GC = cáncer gástrico, UBC = cáncer de vejiga urinaria, UTC = cáncer uterino.

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular adicionales
1	KLQEKIQEL	MEL, AML, NHL
2	SVLEKEIYSI	GC, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
3	RVIDDSLTVGV	UBC
4	VLFGELPAL	SCLC, UBC, UTC
5	GLVDIMVHL	SCLC, UBC, BRCA, MEL, PC
6	FLNAIETAL	RCC
7	ALLQALMEL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
8	ALSSSQAEV	BPH, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
9	SLITGQDLLSV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC
10	QLIEKNWLL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
11	LLDPKTIPL	GBC_CCC
13	RLHDENILL	SCLC, UBC, UTC, BRCA, MEL, AML, NHL
14	YTFSGDVQL	SCLC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL
15	GLPSATTTV	UBC, UTC, MEL
16	SLADLSLLL	GB, GC, BPH, CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, RCC, CRC, AML, NHL
17	GLLPSAESIKL	UBC
18	KTASINQNV	SCLC, UBC, UTC, MEL
19	KVFELDLVTL	AML, NHL
21	YLMDDFSSL	OSCAR, OC, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
22	LMYPYIYHV	HCC, CLL, SCLC, UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, CRC, NHL
24	KVWSDVTPL	BRCA
26	VLDGKVAVV	CLL, UTC, NHL
27	GLLGKVTSTV	SCLC, UBC
28	IKVTDPQLLEL	NSCLC, MEL
29	KMISAIPTL	UTC
30	IITEVITRL	OC, UTC
31	GLLETTGLLAT	OC
33	TLDRNSLYV	OC, UTC
34	TLNTLDINL	UTC
35	VIKGLEEI	OC
36	TVLQELINV	UBC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
38	VLQQESNFL	AML
39	YLEDGFAYV	CLL, UBC, UTC, MEL, NHL
40	KIWEELSVLEV	SCLC, UBC
41	IVTEIIEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular adicionales
43	LLIPFTIFM	SCLC, GBC_CCC, NHL
46	ISLDEVAVSL	BRCA
47	GLNGFNVLL	SCLC, UTC, GBC_CCC, MEL, CRC, AML, NHL
48	KISDFGLATV	OC, MEL
51	LDSEALLTL	BRCA
52	TIGIPFPNV	MEL, NHL
53	AQHLSTLLL	SCLC, GBC_CCC
56	VLQENSSDYQSNL	UTC
57	TLYPGRFDYV	OSCAR, UBC
59	ALADGIKSFLL	BRCA, MEL
64	SLYAGSNNQV	NSCLC
65	SLSEKSPEV	HCC, SCLC, UBC, UTC, BRCA, NHL
67	FLIENLLAA	UTC
68	QLMNLIRSV	UBC, AML
70	GLTEKTVLV	CRC, AML, NHL
75	ALLDGALQL	GC, CRC
76	FTAEFLEKV	UBC, MEL, AML, NHL
77	ALYGNVQQV	BRCA, NHL
78	LFQSRIAGV	BPH
80	VLTGQVHEL	GB
83	GLLENSPHL	BRCA, MEL, AML, NHL
84	FLLEREQLL	CLL, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
85	KLLDKPEQFL	NHL
86	SLFSNIESV	SCLC, BRCA, GBC_CCC
87	KLLSLLEEA	NSCLC, BPH
89	SLAETIFIV	SCLC, GBC_CCC, RCC, NHL
90	AILNVDEKNQV	OC
91	LLPSIFLMV	OC
92	RLFEEVLGV	OSCAR, SCLC, UBC, BRCA, AML
94	YLDEVAFML	UBC, BRCA, GBC_CCC
95	KLIDEDPLFL	SCLC, UTC, GBC_CCC
96	ALDTRHEL	OSCAR, UBC, UTC
98	FVQEKIPEL	GBC_CCC
99	TLFGIQLTEA	GC, GBC_CCC
101	SLLEVNEASSV	NHL
102	GLYPVTLVGV	SCLC, BRCA, AML
103	YLADTVQKL	NSCLC
104	DLPTQEPALGTT	BPH
106	VLLGSVVIFA	BPH
108	FIANLPPELKA	BPH
109	ILGSFELQL	BPH
110	QIQGQVSEV	BPH
112	ILAQDVAQL	MEL, AML, NHL
113	FLFLKEVKV	CRC

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular adicionales
116	ALLSSVAEA	SCLC, BRCA, CRC
117	TLLEGISRA	BRCA
118	IAYNPNGNAL	NSCLC, CLL, AML
119	SLIEESEEL	OC, UTC
121	ALYVQAPTV	NSCLC, UTC, NHL
122	SIIDTELKV	AML
124	ALLLRLFTI	NSCLC
128	SILTNISEV	NSCLC
129	KMASKVTQV	HCC
130	QLYGSAIL	HCC
132	ALLNNVIEV	HCC, BRCA
133	FLDGRPLTL	UTC, MEL
135	HLDTVKIEV	GB
136	LLWDAPAKC	CRC
139	IILENIQSL	UBC, BRCA, AML
140	FLDSQITTV	MEL
142	LLDAAHASI	NSCLC
143	MLWESIMRV	NSCLC, UTC
144	FLISQTPLL	NSCLC, SCLC, UBC
145	ALEEKLENV	NSCLC
146	VVAHLAGA	GC, MEL
147	GLLSALENV	CLL, NHL
148	YLILSSHQL	CLL, NHL
150	VLLDMVHSL	HCC, UTC
151	DISKRIQSL	NSCLC
152	ILVTSIFFL	CLL, NHL
153	KLVELEHTL	GC, NSCLC, OSCAR
154	AIKEIQTV	GB, NSCLC, HCC, UBC, MEL
155	TLDSYLKAV	OC, BRCA
156	VILTSSPFL	CLL, BRCA, AML, NHL
157	ILQDQGFLV	HCC, UBC
158	YLDPLWHQL	CLL, MEL, NHL
159	QLGPPVPTI	UBC, RCC, NHL
160	TLQEWLTV	NSCLC, GBC_CCC
161	NLLDENVCL	CRC
162	GLLGNLLTSL	NSCLC
163	GLEERLYTA	NSCLC, CLL, AML, NHL
164	MLIIRVPSV	NSCLC
165	SLLDYEVS	GBC_CCC
166	LLGDSSFFL	CLL, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML
167	LVDDEGSLVSV	OC, SCLC
168	VIFEGEPMYL	NSCLC, BRCA, NHL
169	ALADLSVAV	NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, GBC_CCC, MEL, AML
170	FIAAVVEKV	SCLC, NHL

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular adicionales
171	LLLLDVPTA	NSCLC, UTC, BRCA, CRC, NHL
172	SLYLQMNSLRTE	NSCLC
173	RLIDIYKNV	OC
174	ALYSGDLHAA	HCC
175	SLLDLVQSL	BRCA, AML, NHL
177	ALINVLNAL	AML
179	TLGEIIKGV	NSCLC
180	RLYEEEIRI	NSCLC
181	LLWAPTAQA	GB, NSCLC, RCC, CRC
182	GLQDGFQITV	GC
183	ALSYILPYL	NSCLC, SCLC, UTC, BRCA, CRC, AML, NHL
184	ALDSTIAHL	UTC, MEL
185	TLYQGLPAEV	GC, NSCLC, HCC, OSCAR, OC, UBC, UTC, BRCA, RCC, CRC
186	SLLSLESRL	GC
187	SILKEDPFL	NSCLC
188	VLGEEQEGV	NSCLC
189	MAVSDLLIL	GB
190	SLSTELFKV	HCC
192	TLLPSSGLVTL	BRCA
193	ALFHMNILL	NSCLC
194	KLLEEVQLL	NSCLC
195	VIIQNLPAL	CRC
196	TLHQWIYYL	CRC
198	ILTNKVVS	OC
199	SVADLAHVL	GC
200	IMPTFDLTKV	HCC
201	LLFSLCEA	BPH
203	FLFVDPVL	CRC, AML, NHL
204	SEWGSPPHAAV	PC
205	LAFGYDDEL	HCC
206	GLDAFRIFL	CRC
207	KLFETVEEL	GB
208	HLNNDRNPL	BPH
210	GLAGDNIYL	RCC
211	LLTTVLINA	RCC
212	MTLSEIHAV	CRC
213	ILAVDGVLSV	NSCLC, BRCA, MEL
214	ALFETLIQL	HCC
215	QIADIVTSV	HCC
216	ALSTVTPRI	HCC
217	LLWPSSVPA	GB, MEL, AML
220	ALSELERVL	BPH, UTC
221	IMLNSVEEI	BPH, NHL
222	LLTGVFAQL	CLL, UTC, BRCA, CRC, NHL

ES 2 983 924 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular adicionales
223	ALHPVQFYL	OC, CRC
224	LLFDWSGTGRADA	GBC_CCC
225	FLPQPVPLSV	CLL, MEL, NHL
226	SLAGNLQEL	GB
227	SEMEELPSV	HCC
228	SLLELDGINLRL	NSCLC
230	KLLNMIFSI	BPH
231	LLDDIFIRL	MEL
233	SLFESLEYL	UTC, RCC
234	VLLNEILEQV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, AML, NHL
235	SLLNQPKAV	SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
236	KMSELQTYV	GC, BPH, CLL, OSCAR, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, RCC, AML, NHL
237	ALLEQTGDMSL	SCLC, UBC, BRCA, AML, NHL
238	HLQEKQLSL	HCC
239	VIKGLEEITV	CLL, SCLC, UBC, UTC, AML, NHL
240	SVQENIQQK	RCC, NHL
241	KQFEGTVEI	CLL, NHL
242	KLQEEIPVL	BRCA, MEL, NHL
243	GLAEFQENV	CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
244	NVAEIVIH	GB
245	ALLEEEEGV	NSCLC, UBC, GBC_CCC
246	ALAGIVTNV	GB, CLL, SCLC, BRCA, GBC_CCC, AML
248	VLMQDSRLYL	CLL, UBC, UTC, AML, NHL
251	LLWGNLPEI	CLL, SCLC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
252	SLMEKNQSL	AML
253	KLLAVIH	UBC, BRCA, GBC_CCC, MEL, AML, NHL
254	ALGDKFLLRV	NHL
255	FLMKNSDLYGA	UBC, UTC, GBC_CCC, AML, NHL
256	FLNDIFERI	UTC, MEL, AML, NHL
258	QLVQRVASV	UBC, NHL
260	ALNESLVEC	SCLC, UBC, UTC, CRC, AML, NHL
261	GLAALAVHL	GC, CLL, SCLC, UBC, UTC, BRCA, GBC_CCC, AML, NHL
262	LLLEAVWHL	BRCA, NHL
263	SIIEYLPTL	CLL, OSCAR, OC, SCLC, UBC, GBC_CCC, AML, NHL
264	TLHDQVHLL	UTC, BRCA, GBC_CCC, MEL
265	FLLDKPQDLSI	GBC_CCC
267	YLLDMPLWYL	AML, NHL
269	GLLDCPIFL	CLL, UTC, AML, NHL
270	TLLTFFHEL	UTC, GBC_CCC, AML, NHL
271	VLIEYNFSI	CLL, SCLC, MEL, AML, NHL
272	FVMEGEPPKL	CLL, UTC
273	SLNKQIETV	AML
275	AVPPPPSSV	NSCLC, HCC
276	RMPTVLQCV	BPH

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Entidades de interés particular adicionales
277	KLQEELNKV	NSCLC, OSCAR, UBC, BRCA, NHL
279	VLMDEGAVLTL	CLL, CRC, NHL
280	HLWGHALFL	HCC
281	LLLESDPKVYSL	OSCAR, SCLC
282	SLYALHVKA	OC, SCLC
283	ALSELLQQV	NSCLC, HCC, OC, SCLC, UTC, MEL, CRC, AML, NHL
285	MLLDTVQKV	NSCLC
286	FLTEMVHFI	NSCLC, CLL, SCLC, UBC, NHL

EJEMPLO 2

Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos de la presente divulgación

5 La sobre-presentación o la presentación específica de un péptido 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 tumores aunque la proteína de la que procedan esté presente también en los tejidos normales. Además, la obtención de los
10 perfiles de expresión del ARNm 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, tales como los receptores de células T (TCR) madurados por afinidad, el péptido DIANA ideal será todo aquél derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y que no se encuentre en los tejidos normales. Para esta invención, la expresión del tejido normal de todos los genes de origen demostró ser mínima basándose en la base de datos anteriormente descrita de los datos de expresión del ARN que cubrían aproximadamente las 3000 muestras de tejido normal. Además
15 se agregaron análisis de ARN de tejidos normales y tumorales en el caso de algunas entidades de cáncer (HCC, CRC, GB, GC, NSCLC, PC, RCC, BPH/PCA) con el fin de estimar el cubrimiento objetivo en la población de los pacientes que tenían el cáncer respectivo.

Fuentes de ARN y preparación

20 Las muestras de tejido extirpado quirúrgicamente fueron facilitadas por diversas instituciones como se indicó anteriormente (véase el Ejemplo 1), después de haber obtenido el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes. Las muestras de tejido tumoral se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la cirugía, y posteriormente se homogeneizaron a mano en un mortero y pistilo bajo nitrógeno líquido. El
25 ARN total se preparó a partir de estas muestras utilizando el reactivo TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Alemania), y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

30 El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por los canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, California, EUA). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. La calidad y la cantidad de todas las muestras de ARN se evaluaron en un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) utilizando el kit RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

35 El ARN total a partir de los tejidos humanos sanos para los experimentos de RNASeq se obtuvo en: Asterand (Detroit, MI, EUA & Royston, Herts, Reino Unido (UK)), BioCat GmbH (Heidelberg, Alemania), BioServe (Beltsville, MD, EUA), Capital BioScience Inc. (Rockville, MD, EUA), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), Istituto Nazionale Tumori "Pascale" (Nápoles, Italia), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA), University Hospital Heidelberg (Heidelberg, Alemania).

40 El ARN total a partir de los tejidos tumorales para los experimentos de RNASeq se obtuvo en: Asterand (Detroit, MI, EUA & Royston, Herts, Reino Unido (UK)), Bio-Options Inc. (Brea, CA, EUA), BioServe (Beltsville, MD, EUA), Geneticist Inc. (Glendale, CA, EUA), ProteoGenex Inc. (Culver City, CA, EUA), Tissue Solutions Ltd (Glasgow, Reino Unido (UK)), University Hospital Bonn (Bonn, Alemania), University Hospital Heidelberg (Heidelberg, Alemania), University Hospital Tübingen (Tübingen, Alemania).

Experimentos con micromatrices

45 El cubrimiento se estimó mediante un análisis de perfiles de expresión de ARN (micromatrices Affymetrix) de 30 GB, 16 CRC, 56 RCC, 12 HCC, 38 NSCLC, 11 PC, 34 GC, y 20 muestras de cáncer de próstata.

50 El análisis de la expresión genética de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa

Clara, California, EUA). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5 a 8 µg del ARN total se sintetizó el ADNc de doble cadena utilizando el SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador de oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania), siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE.UU.) en el caso de las matrices U133A, y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el caso de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes previamente programados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 1 00 genes de mantenimiento suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de las proporciones logarítmicas de señales dadas por el software, y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0. Los ejemplos de los perfiles de expresión de los genes de origen que se sobre-expresan altamente o se expresan exclusivamente en HCC, CRC, GB, GC, NSCLC, PC, RCC, o BPH/PCA, se muestran en Figura 2. Se muestra un panorama del cubrimiento para los genes seleccionados en la Tabla.

Tabla 5A: Cubrimiento objetivo para los genes de origen de los péptidos seleccionados. La sobre-expresión se definió como más de 1,5 veces la expresión más alta en un tumor comparándose con el tejido normal relevante que mostró la mayor expresión del gen. <19 % de sobre-expresión = I, del 20 al 49 % = II, del 50 al 69 % = III, >70 % = IV. Si un péptido se podía derivar a partir de varios genes de origen, fue decisivo el gen con un cubrimiento mínimo.

SEQ ID NO:	Secuencia	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	ID del Gen	Símbolo del gen oficial
116	ALLSSVAEA	I	II	I	I	II	I	I	I	9048	ARTN
263	SIIEYLPTL	I	II	I	I	I	I	I	I	79915	ATAD5
93	RLYGYFHDA	II	III	I	II	II	II	I	III	6790	AURKA
27	GLLGKVTSTV	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
28	IKVTDLPQLLEL	I	I	I	I	II	I	I	I	51297	BPIFA1
62	SLVENIHVL	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
241	KQFEGTVEI	II	III	II	I	III	III	I	III	675	BRCA2
52	TIGIPFPNV	III	I	I	II	II	I	I	II	83990	BRIP1
58	HLLGEGAFQV	III	III	I	I	III	II	I	III	699	BUB1
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	II	II	I	I	26256	CABYR
94	YLDEVAFML	I	I	I	I	I	II	I	I	1238	CCBP2
103	YLADTVQKL	II	I	I	I	I	I	I	I	100526761, 54937	CCDC169-SOHLH2, SOHLH2
79	TVLEEIGNRV	II	IV	I	I	II	I	I	II	9133	CCNB2
247	NLLIDDKGTIKL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
248	VLMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
249	YLYQILQGI	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
250	LMQDSRLYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	983	CDK1
1	KLQEKIQEL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
242	KLQEEIPVL	III	II	I	I	II	I	I	II	1062	CENPE
19	KVFELDLVTL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
20	ALVEKGEFAL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
236	KMSELQTYV	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
237	ALLEQTGDMSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
238	HLQEKLQSL	IV	III	I	I	I	I	I	I	1063	CENPF
60	YLFSQGLQGL	III	IV	I	III	III	II	I	III	2491	CENPI
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	I	II	55165	CEP55

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	ID del Gen	Símbolo del gen oficial
48	KISDFGLATV	IV	IV	II	II	IV	II	I	IV	1111	CHEK1
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	II	I	I	8532	CPZ
284	KLMDPGSLPPL	I	IV	I	I	II	I	I	II	2118	ETV4
261	GLAALAVHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
262	LLLEAVWHL	I	III	I	II	II	I	I	I	2175	FANCA
270	TLLTFFHEL	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
271	VLIEYNFSI	II	III	I	I	II	I	I	II	55215	FANCI
11	LLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
12	RLLDPKTIFL	I	I	II	I	I	I	I	I	26762	HAVCR1
111	AQLEGKLVSI	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
277	KLQEELNKV	I	III	I	I	II	I	I	III	3161	HMMR
67	FLIENLLAA	I	I	I	II	I	I	I	I	3166	HMX1
56	VLQENSSDYQSNL	II	III	I	I	I	I	I	I	3188	HNRNPH2
89	SLAETIFIV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
90	AILNVDEKNQV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
91	LLPSIFLMV	I	I	I	I	II	I	I	I	3359	HTR3A
287	KIQEILTQV	IV	II	II	III	IV	IV	I	II	10643	IGF2BP3
97	KLFEKSTGL	IV	IV	II	II	I	II	III	II	23421	ITGB3BP
35	VIIKGLEEI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
36	TVLQELINV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
37	QIVELIEKI	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
239	VIIKGLEEITV	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
240	SVQENIQQK	I	II	I	I	I	I	I	I	3832	KIF11
10	QLIEKNWLL	IV	IV	I	II	III	II	I	IV	56992	KIF15
112	ILAQDVAQL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24137	KIF4A
70	GLTEKTVLV	III	IV	I	I	II	II	I	III	24, 137, 285, 643	KIF4A, KIF4B
252	SLMEKNQSL	III	IV	I	I	II	II	I	III	24, 137, 285, 643	KIF4A, KIF4B
104	DLPTQEPALGTT	I	I	I	I	I	I	IV	I	354	KLK3
118	IAYNPNGNAL	I	I	I	I	I	II	I	I	3824	KLRD1
113	FLFLKEVKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
279	VLMDEGAVLTL	I	II	I	I	I	I	I	I	54596	L1TD1
119	SLIEESEEL	I	II	I	I	I	I	I	I	28421 7	LAMA1
105	AMLASQTEA	II	I	I	II	I	IV	I	I	4295	MLN
106	VLLGSVVIFA	I	I	I	I	I	I	IV	II	4477	MSMB
29	KMISAIPTL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
30	IITEVITRL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
31	GLLETTGLLAT	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	GB (%)	CRC (%)	RCC (%)	HCC (%)	NSCLC (%)	PC (%)	BPH/PCA (%)	GC (%)	ID del Gen	Símbolo del gen oficial
32	VVMVLVLM	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
33	TLDRNSLYV	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
34	TLNTLDINL	I	I	I	I	III	II	II	I	94025	MUC16
41	IVTEIIEI	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
42	KQMSISTGL	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
234	VLLNEILEQV	III	IV	I	I	III	I	I	III	64151	NCAPG
285	MLLDTVQKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54892	NCAPG2
114	LLFPSDVQTL	II	III	I	I	III	I	I	III	23397	NCAPH
107	RVLPGQAVTGV	I	III	I	I	I	I	I	I	55247	NEIL3
81	ILAEPIYI	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
82	ILAEPIYIRV	I	I	I	I	II	II	II	II	55655	NLRP2
115	ILHGEVNKV	I	II	I	I	I	I	I	I	54830	NUP62CL
39	YLEDGFAYV	II	IV	I	I	III	II	IV	IV	5558	PRIM2
83	GLLENSPHL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
253	KLLAVIHEL	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
288	SLYKGLLSV	III	II	II	II	I	III	I	II	25788	RAD54B
108	FIANLPPELKA	I	II	I	I	I	I	IV	I	6013	RLN1
13	RLHDENILL	III	II	II	I	I	I	I	I	23322	RPGRIP1L
120	LQLJPLKGLSL	II	IV	I	II	III	II	I	III	6241	RRM2
76	FTAEFLEKV	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
255	FLMKNSDLYGA	III	I	I	I	I	II	I	I	79801	SHCBP1
74	GLAFLPASV	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
75	ALLDGALQL	I	II	I	I	I	I	I	I	6570	SLC18A1
243	GLAEFQENV	II	I	I	I	II	II	I	II	57405	SPC25
281	LLLESDPKVYSL	I	III	I	I	I	I	I	I	6491	STIL
109	ILGSFELQL	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
110	QIQGQVSEV	I	I	I	I	I	I	IV	I	7047	TGM4
267	YLLDMPLWYL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
268	SLDKDIAL	IV	IV	II	II	IV	III	I	IV	7153	TOP2A
121	ALYVQAPTV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
122	SIIDTELKV	IV	IV	II	II	IV	IV	I	IV	9319	TRIP13
123	QTAPEEAFIKL	IV	II	III	III	III	II	IV	III	15, 073, 792, 1 04	TTC30B, TTC30A
124	ALLRLFTI	III	IV	II	II	IV	IV	I	IV	11169	WDHD1
125	AALEVLAEV	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT
126	QLREAFEQL	I	III	I	I	I	I	I	I	11130	ZWINT

Experimentos de RNASeq

5 El análisis de expresión genética de las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se llevó a cabo mediante la secuenciación de última generación (RNASeq) mediante CeGaT (Tübingen, Alemania). Dicho de una manera breve,

las bibliotecas de secuenciación se preparan utilizando el kit de reactivo Illumina HiSeq v4 de acuerdo con el protocolo del proveedor (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), que incluye la fragmentación del ARN, la conversión del ADNc, y la adición de los adaptadores de secuenciación. Las bibliotecas derivadas a partir de múltiples muestras se mezclan equimolarmente y se secuencian con el secuenciador Illumina HiSeq 2500 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, generando lecturas de cada extremo de 50 pares de bases. Las lecturas procesadas se mapean al genoma humano (GRCh38), utilizando el software STAR. Los datos de expresión se proporcionan al nivel de la transcripción como RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas, generadas mediante el software Cufflinks), y al nivel del exón (lecturas totales, generadas mediante el software Bedtools), basándose en las anotaciones de la base de datos de secuencias Ensembl (Ensembl77). Las lecturas de los exones se normalizan para la longitud del exón y el tamaño de alineamiento para obtener los valores de RPKM.

Los ejemplos de los perfiles de expresión de los genes de origen que se sobre-expresan altamente o se expresan exclusivamente en NHL, BRCA, GBC, CCC, MEL, OC, OSCAR, SCLC, UBC, UEC, se muestran en las Figuras 2F a 2H. Las puntuaciones de expresión para los ejemplos de genes adicionales se muestran en la Tabla 5B.

Tabla 5B: Cubrimiento diana para los genes de origen de los péptidos seleccionados. La sobre-expresión se definió como más de 1,5 veces la expresión más alta en un tumor comparándose con el tejido normal relevante que mostró la mayor expresión del gen. <19 % de sobre-expresión = I, del 20 al 49 % = II, del 50 al 69 % = III, >70 % = IV. Si un péptido se podía derivar a partir de varios genes de origen, era decisivo el gen con un cubrimiento mínimo. El valor inicial incluye los siguientes tejidos normales relevantes: tejido adiposo, glándula suprarrenal, arteria, médula ósea, cerebro, cartilago, colon, esófago, vesícula biliar, corazón, riñón, hígado, pulmón, nódulo linfático, páncreas, pituitaria, recto, músculo esquelético, piel, intestino delgado, bazo, estómago, timo, glándula tiroides, tráquea, vejiga urinaria y vena. En el caso de que estuvieran disponibles los datos de expresión para varias muestras del mismo tipo de tejido, se utilizó la media aritmética de todas las muestras respectivas para el cálculo. AML = leucemia mieloide aguda, NHL = linfoma no de Hodgkin, BRCA = cáncer de mama, CLL = leucemia linfocítica crónica, GBC_CCC = adenocarcinoma y colangiocarcinoma de vesícula biliar, MEL = melanoma, OC = cáncer de ovario, OSCAR = cáncer esofágico, incluyendo cáncer de unión gástrica-esofágica, SCLC = cáncer de pulmón microcítico, UBC = cáncer de vejiga urinaria, UTC = cáncer uterino.

SEQ ID NO:	Secuencia	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
1	KLQEKIQEL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
2	SVLEKEIYSI	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
3	RVIDDSL VGV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
4	VLFGELPAL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
5	GLVDIMVHL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
7	ALLQALMEL	I	II	II	I	II	III	II	II	I	II	I
8	ALSSSQAEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
9	SLITGQDLLSV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
10	QLIEKNWLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
11	LLDPKTIFL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I
13	RLHDENILL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
14	YTFSGDVQL	I	I	I	I	I	II	I	IV	I	III	I
17	GLLPSAESIKL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
18	KTASINQNV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
21	YLMDDFSSL	I	I	II	I	I	I	I	I	II	I	I
22	LMYPYIYHV	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I
24	KVWSDVTPL	I	I	IV	I	IV	II	II	IV	II	IV	IV
39	YLEDGFAYV	I	II	II	I	II	II	III	I	III	I	I
40	KIWEELSVLEV	I	I	II	I	III	IV	I	III	IV	III	II
41	IVTEIISEI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
43	LLIPFTIFM	I	II	II	I	II	II	I	IV	I	II	I
46	ISLDEVAVSL	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
47	GLNGFNVLL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	II
49	KLIGNIHGNEV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
50	ILLSVLHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
67	FLIENLLAA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
76	FTAEFLEKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
83	GLLENSPHL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
84	FLLEREQLL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	II
85	KLLDKPEQFL	I	I	I	I	I	IV	I	I	I	I	I
86	SLFSNIESV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
88	LLLPLELSLA	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
89	SLAETIFIV	I	III	I	I	I	I	II	I	II	I	I
92	RLFEEVLGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
95	KLIDEDEPLFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
96	ALDTTRHEL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
102	GLYPVTLVGV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
116	ALLSSVAEA	I	I	II	I	I	I	I	IV	I	II	I
117	TLLEGISRA	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I	I
147	GLLSALENV	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
148	YLILSSHQL	I	III	I	IV	I	I	I	I	I	I	I
152	ILVTSIFFL	I	II	I	II	I	I	I	I	I	I	I
153	KLVELEHTL	I	I	II	I	II	II	I	II	I	II	I
155	TLDSYLKAV	I	I	III	I	I	I	I	I	I	I	I
156	VILTSSPFL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
157	ILQDGQFLV	I	I	I	II	I	III	I	I	II	I	I
158	YLDPLWHQL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
166	LLGDSSFFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
169	ALADLSVAV	I	I	I	I	I	I	I	II	I	III	I
170	FIAAVVEKV	I	I	I	I	I	II	II	I	I	I	I
181	LLWAPTAQA	I	I	I	I	II	I	I	I	II	I	I
185	TLYQGLPAEV	I	I	II	I	I	I	III	IV	I	II	IV
203	FLFVDPELV	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
220	ALSELERVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
222	LLTGVFAQL	I	I	I	I	II	I	I	I	I	II	I
233	SLFESLEYL	I	I	II	I	II	II	II	II	I	I	I
234	VLLNEILEQV	I	I	I	I	I	I	I	I	III	I	I
235	SLLNQPKAV	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
236	KMSELQTYV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
237	ALLEQTGDMSL	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	AML (%)	NHL (%)	BRCA (%)	CLL (%)	GBC_CCC (%)	MEL (%)	OC (%)	OSCAR (%)	SCLC (%)	UBC (%)	UTC (%)
241	KQFEGTVEI	I	II	II	I	I	I	I	I	II	I	I
242	KLQEEIPVL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
243	GLAEFQENV	I	II	I	I	I	I	I	I	II	I	I
245	ALLEEEEGV	I	I	I	I	I	II	I	II	II	II	I
246	ALAGIVTNV	I	I	II	I	II	I	III	I	I	II	I
248	VLMQDSRLYL	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
251	LLWGNLPEI	I	II	I	I	I	I	I	I	I	I	I
252	SLMEKNQSL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
253	KLLAVIHEL	I	II	II	I	I	II	II	I	III	I	III
255	FLMKNSDLYGA	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
257	KLIDHQGLYL	I	I	I	I	I	I	II	I	II	I	I
260	ALNESLVEC	I	III	I	I	II	I	II	IV	II	II	II
261	GLAALAVHL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
263	SIIEYLPTL	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
264	TLHDQVHLL	I	I	IV	I	I	I	IV	I	I	I	IV
265	FLLDKPQDLSI	I	I	I	I	II	I	II	I	I	I	I
267	YLLDMPLWYL	I	II	I	I	I	I	I	I	III	I	I
269	GLLDCPIFL	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
270	TLTTFHEL	I	I	I	I	I	II	I	II	II	I	I
271	VLIEYNFSI	I	I	I	I	I	II	I	III	II	I	I
274	TLYNPERTITV	II	IV	II	III	IV	IV	IV	IV	IV	II	II
277	KLQEELNKV	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
279	VLMDEGAVLTL	I	I	I	II	I	I	I	I	I	I	I
283	ALSELLQQV	I	I	I	I	I	I	I	I	II	I	I
286	FLTEMVHFI	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II	I

EJEMPLO 3

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I

5 Con el objeto de obtener información con respecto a la inmunogenicidad de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) de la presente invención, los inventores llevaron a cabo estudios con un ensayo de sensibilización *in vitro* de células T basado en estimulaciones reiteradas de células T CD8+ con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejos de péptido/MHC y anticuerpo anti-CD28. De este modo, los inventores han podido demostrar hasta el momento la inmunogenicidad de 47 péptidos asociados con tumores (TUMAP) restringidos a HLA-A*0201, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de células T contra los cuales existen células T precursoras CD8+ en los seres humanos (Tablas 8A y 8B).

15 Sensibilización *in vitro* de células T CD8+

20 Para realizar las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígenos artificiales cargadas con el complejo de péptido-MHC (pMHC) y el anticuerpo anti-CD28, los inventores aislaron primero las células T CD8+ de los productos de leucoféresis frescos HLA-A*02 mediante la selección positiva utilizando microperlas con CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) procedentes de donantes sanos, que se obtuvieron en la Clínica Universitaria de Mannheim, Alemania, después de obtener el consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los linfocitos CD8+ aislados se incubaron hasta su utilización, en un medio para células T (TCM)

consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano inactivado por calor al 10 % (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomicina (Cambrex, Cologne, Alemania), piruvato de sodio 1 mM (CC Pro, Oberdorf, Alemania), y 20 µg/ml de gentamicina (Cambrex). En este paso también se agregaron al medio para células T (TCM), 2,5 ng/ml de IL-7 (PromoCell, Heidelberg, Alemania), y 10 U/ml de IL-2 (Novartis Pharma, Nürnberg, Alemania). La elaboración de las microperlas recubiertas con pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de las células T y la lectura, se llevaron a cabo en un sistema *in vitro* altamente definido utilizando cuatro moléculas de pMHC distintas por cada condición de estimulación y 8 moléculas de pMHC distintas por cada condición de lectura.

El anticuerpo co-estimulante purificado Ab 9.3 de IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung et al., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimido-biotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistieron en partículas de poliestireno de 5,6 µm de diámetro recubiertas con estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EUA).

Los pMHC usados en las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 289) de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5, SEQ ID NO: 290), respectivamente.

Las placas de 96 pozos se recubrieron con 800.000 perlas/200 µl en la presencia de 4 x 12,5 ng de diferentes pMHC biotinilados, se lavaron y después se les añadieron 600 ng de anti-CD28 biotinilado en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pozos en las que se incubaron simultáneamente 1 x 10⁶ células T CD8+ con 2 x 10⁵ perlas recubiertas lavadas en 200 µl del medio para células T (TCM) complementado con 5 ng/ml de IL-12 (PromoCell) durante 3 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó entonces con el medio para células T (TCM) fresco complementado con 80 U/ml de IL-2, y se continuó la incubación otros 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó un total de tres veces. Para la lectura de los multímeros de pMHC con 8 moléculas de pMHC distintas por condición, se empleó una estrategia de codificación combinatoria bidimensional como se describió previamente (Andersen et al., 2012), con pequeñas modificaciones que comprendieron el acoplamiento con 5 fluorocromos distintos. Por último, los análisis de los multímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante casi infrarrojo (IR) Live/dead® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con el clon SK1 de anticuerpo anti-CD8-FITC (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros de pMHC fluorescentes. Para el análisis se equipó un citómetro BD LSR II SORP con los filtros y dispositivos de láser adecuados. Las células específicas de los péptidos se calcularon como un porcentaje con respecto al total de células T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EUA). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multímero+ específicos se detectó comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si se encontraba que al menos un pozo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de células T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (es decir, este pozo contenía al menos el 1 % de células multímero+ específicas entre las células T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas fue al menos 10x de la media de las estimulaciones del control negativo).

40 Inmunogenicidad de péptidos *in vitro*

Para los péptidos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) de clase I probados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar mediante la generación de líneas de células T específicas de dicho péptido. Los ejemplos de los resultados de citometría de flujo después del tinte del multímetro específico de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) para 15 péptidos se muestran en las Figuras 3 y 6, junto con los controles negativos correspondientes. Los resultados para dos péptidos se resumen en las Tablas 6A y B.

Tabla 6A: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) clase I desvelados en el presente documento. Resultados de ejemplo de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevado a cabo por la solicitante para los péptidos. <20 % = +; 21 % a 49 % = ++; 50 % a 69 % = +++; >= 70 % = ++++

SEQ ID NO:	Secuencia	Pozos	Donantes
288	SLYKGLLSV	++	++++
287	KIQEILTQV	+	+++

Tabla 6B: Inmunogenicidad *in vitro* del péptido de antígenos de leucocitos humanos (HLA) clase I de la invención y péptidos de HLA de clase I adicionales desvelados en el presente documento

Resultados de ejemplo de los experimentos de Inmunogenicidad *in vitro* llevado a cabo por la solicitante para el péptido restringido a HLA-A*02 de la invención y péptidos restringidos a HLA-A*02 adicionales desvelados en el presente documento. Se indican los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro*. El porcentaje de los pozos positivos y donantes (entre los evaluables) se resume como se indica: <20 % = +; 20 % a 49 % = ++; 50 % a 69 % = +++; >= 70 % = ++++

ES 2 983 924 T3

SEQ ID NO:	Secuencia	Pozos positivos [%]
4	VLFGELPAL	+
7	ALLQALMEL	++
9	SLITGQDLLSV	+
11	LLDPKTIFL	++
14	YTFSGDVQL	+
17	GLLPSAESIKL	+
18	KTASINQNV	+++
27	GLLGKVTSV	+
29	KMISAIPTL	+
34	TLNTLDINL	++++
35	VIIKGLEEI	+
39	YLEDGFAYV	++++
48	KISDFGLATV	++
50	ILLSVLHQL	+
66	AMFPDTIPRV	+
77	ALYGNVQQV	+
82	ILAEPIYIRV	+++
89	SLAETIFIV	+
92	RLFEEVLGV	++
97	KLFEKSTGL	+
101	SLLEVNEASSV	+
102	GLYPVTLVGV	+
117	TLLEGISRA	++
121	ALYVQAPTV	+
157	ILQDGGFLV	+
166	LLGDSSFFL	++
183	ALSYILPYL	+++
203	FLFVDPELV	+++
233	SLFESLEYL	+
234	VLLNEILEQV	++
236	KMSELQTYV	+
242	KLQEEIPVL	+
246	ALAGIVTNV	+
248	VLMQDSRLYL	++
251	LLWGNLPEI	++
253	KLLAVIHEL	++
254	ALGDKFLLRV	+
255	FLMKNSDLYGA	+
257	KLIDHQGLYL	+
260	ALNESLVEC	+
261	GLAALAVHL	++
263	SIIEYLPTL	+
264	TLHDQVHLL	+
267	YLLDMPLWYL	+
275	AVPPPPSSV	++

EJEMPLO 4

5 Síntesis de péptidos

Todos los péptidos se sintetizaron utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida estándar y bien establecida utilizando la estrategia de Fmoc.

10 La identidad y la pureza de cada péptido se determinaron mediante espectrometría de masas y RP-HPLC analítica. Se obtuvieron los péptidos en forma de liofilizados blancos a blancuzcos (sal de trifluoro-acetato) con una pureza superior al 50 %.

15 Todos los péptidos asociados con tumores (TUMAP) se administraron preferentemente como las sales de trifluoro-acetato o de acetato, aunque también es posible como otras formas de sales

EJEMPLO 5

Ensayos de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

20 Los péptidos candidatos para las terapia basadas en células T de acuerdo con la presente invención, se probaron adicionalmente para determinar su capacidad de unión (afinidad) al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los complejos de péptido-MHC individuales se produjeron mediante el intercambio del ligando con luz ultravioleta (UV), en donde se disocia un péptido sensible a la luz ultravioleta (UV) después de la irradiación con luz ultravioleta (UV), y se intercambió con el péptido de interés tal como se analizó. Solamente los péptidos candidatos que se pueden unir y estabilizar efectivamente las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) receptivas al péptido impiden la disociación de los complejos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Con el fin de determinar el rendimiento de la reacción de intercambio, se llevó a cabo un ELISA basándose en la detección de la cadena ligera (B2m) de los complejos de MHC estabilizados. El ensayo se llevó a cabo como se describe en términos generales en Rodenko et al. (Rodenko et al., 2006).

35 Las placas MAXISorp de 96 pozos (NUNC) se recubrieron durante la noche con 2 ug/ml de estreptavidina en suero regulado con fosfato (PBS) a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces, y se bloquearon durante 1 hora a 37 °C en albúmina de suero bovino (BSA) al 2 % que contenía regulador de bloqueo. Los monómeros de HLA-A*02:01/MLA-001 replegados sirvieron como estándares, cubriendo el intervalo de 15 a 500 ng/ml. Los monómeros de péptido-MHC de la reacción de intercambio con luz ultravioleta (UV) se diluyeron 100 veces en el regulador de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 ug/ml de anti-G2m conjugado con HRP durante 1 hora a 37 °C, se lavaron nuevamente, y se detectaron con una solución de TMB que se detuvo con NH₂SO₄. La absorción se midió a 450 nanómetros. Los péptidos candidatos que mostraron un alto rendimiento de intercambio (preferentemente mayor que el 50 %, más preferentemente mayor que el 75 %) son en términos generales preferidos para la generación y la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o receptores de células T o fragmentos de los mismos, debido a que muestran suficiente avidéz por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) e impiden la disociación de los complejos de MHC.

45 Tabla 7: Puntuaciones de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I
Se evaluó la unión de los péptidos restringidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I con el HLA-A*02:01 de acuerdo con el rendimiento del intercambio de péptidos: >10 % = +; >20 % = ++; >50 % = +++; > 75 % = ++++

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
1	KLQEKIQEL	++++
3	RVIDDSLTVGV	+++
4	VLFGELPAL	+++
5	GLVDIMVHL	+++
6	FLNAIETAL	++++
7	ALLQALMEL	+++
9	SLITGQDLLSV	+++
10	QLIEKNWLL	+++
11	LLDPKTIFL	+++
12	RLLDPKTIFL	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
13	RLHDENILL	+++
14	YTFSGDVQL	+++
16	SLADLSLLL	+++
17	GLLPSAESIKL	++++
18	KTASINQNV	++
19	KVFELDLVTL	++
20	ALVEKGEFAL	++
21	YLMDDFSSL	+++
22	LMYPYIYHV	+++
23	ALLSPLSLA	+++
24	KVWSDVTPL	+++
25	LLWGHPRVALA	+++
26	VLDGKVAVV	+++
27	GLLGKVTSV	+++
28	IKVTDQPQLEL	++
29	KMISAIPTL	++
30	IITEVITRL	+++
31	GLLETTGLLAT	+++
33	TLDRNSLYV	++
34	TLNTLDINL	+++
35	VIIKGLEEI	++
36	TVLQELINV	+++
37	QIVELIEKI	++
38	VLQQESNFL	++
39	YLEDGFAYV	+++
40	KIWEELSVLEV	+++
41	IVTEIIEI	+++
42	KQMSISTGL	++
44	AVFNLVHV	+++
45	FLPVSVVYV	+++
47	GLNGFNVLL	+++
48	KISDFGLATV	+++
49	KLIGNIHGNEV	++
50	ILLSVLHQL	+++
51	LDSEALLTL	++
52	TIGIPFPNV	++
53	AQHLSTLLL	+
54	YLVPGLVAA	+++
55	HLFDKIIKI	+++
57	TLYPGRFDYV	++
58	HLLGEGAFQV	+++
59	ALADGIKSFLL	+++
60	YLFSQGLQGL	+++
61	ALYPKEITL	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
62	SLVENIHVL	+++
63	KLLPMVIQL	+++
64	SLYAGSNNQV	++
65	SLSEKSPEV	++
66	AMFPDTIPRV	++
67	FLIENLLAA	+++
68	QLMNLIRSV	+++
69	LKVLKADVVL	++
70	GLTEKTVLV	++
71	HMSGKLTNV	++
72	VLSTRVTNV	++
74	GLAFLPASV	++
75	ALLDGALQL	+++
76	FTAEFLEKV	+++
77	ALYGNVQQV	+++
79	TVLEEIGNRV	++
80	VLTGQVHEL	+++
81	ILAEPIYI	++
82	ILAEPIYIRV	+++
83	GLLENSPHL	++
84	FLLEREQLL	++++
85	KLLDKPEQFL	++
86	SLFSNIESV	+++
87	KLLSLLEEA	+++
88	LLLPLELSLA	+++
89	SLAETIFIV	+++
90	AILNVDEKNQV	++
91	LLPSIFLMV	++
92	RLFEEVLGV	++++
93	RLYGYFHDA	++
94	YLDEVAFML	+++
95	KLIDEDEPLFL	+++
96	ALDTRHEL	++
97	KLFESTGL	+++
98	FVQEKIPEL	+++
99	TLFGIQLTEA	+++
100	ALQSFEFRV	+++
101	SLLEVNEASSV	+++
102	GLYPVTLVGV	+++
103	YLADTVQKL	++
105	AMLASQTEA	++
106	VLLGSVVIFA	++
107	RVLPQAVTGV	++
108	FIANLPPELKA	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
109	ILGSFELQL	+++
110	QIQGQVSEV	++
111	AQLEGKLVSI	+++
112	ILAQDVAQL	+++
113	FLFLKEVKV	++
114	LLFPSDVQTL	++
115	ILHGEVNVK	++
116	ALLSSVAEA	++
117	TLLEGISRA	++
119	SLIEESEEL	++
121	ALYVQAPTV	++
122	SIIDTELKV	+++
123	QTAPEEAFIKL	+
124	ALLRLFTI	++
125	AALEVLAEV	+++
126	QLREAFEQL	+++
128	SILTNISEV	++
129	KMASKVTQV	++
130	QLYGSAITL	+++
131	SLYPHFTLL	+++
132	ALLNNVIEV	+++
133	FLDGRPLTL	++
134	SLYKSFLQL	++
136	LLWDAPAKC	+++
137	KLIYKDLVSV	++
138	GIINKLVTV	++
139	IILENIQSL	+++
140	FLDSQITTV	+++
141	NIDINNNEL	++
142	LLDAAHASI	++
143	MLWESIMRV	+++
144	FLISQTPLL	+++
145	ALEEKLENV	+++
146	VVA AHLAGA	++
147	GLLSALENV	+++
148	YLILSSHQL	+++
149	NMADGQLHQV	++
150	VLLDMVHSL	+++
151	DISKRIQSL	++
153	KLVELEHTL	+++
154	AIKEIQTV	++
155	TLDSYLKAV	++
157	ILQDGQFLV	++
158	YLDPLWHQL	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
159	QLGPVPVTI	+++
160	TLQEWLTEV	+++
161	NLLDENVCL	++++
162	GLLGNLLTSL	+++
163	GLEERLYTA	++
164	MLIIRVPSV	+++
165	SLLDYEVS	+++
166	LLGDSSFFL	+++
167	LVVDEGSLVSV	+++
168	VIFEGEPMYL	+++
169	ALADLSVAV	+++
170	FIAAVVEKV	++
171	LLLLDVPTA	++
173	RLIDIYKNV	+++
174	ALYSGDLHAA	++
175	SLLDLVQSL	+++
176	VQSGLRILL	++
177	ALINVLNAL	+++
178	SLVSWQLLL	++++
179	TLGEIIGKV	+++
180	RLYEEEIRI	+++
181	LLWAPTAQA	+++
182	GLQDGFQITV	+++
183	ALSYILPYL	+++
184	ALDSTIAHL	++
185	TLYQGLPAEV	++
187	SILKEDPFL	++
188	VLGEEQEGV	++
190	SLSTELFKV	+++
191	AAIEIFEKV	+++
192	TLLPSSGLVTL	++
193	ALFHMNILL	+++
194	KLLEEVQLL	++
195	VIIQNLPAL	+++
198	ILTNKVVS	++
199	SVADLAHVL	++
200	IMPTFDLTKV	+++
203	FLFVDPELV	++
204	SEWGSPHAAVP	+++
206	GLDAFRIFL	++++
207	KLFETVEEL	+++
208	HLNNDNRNPL	++
210	GLAGDNIYL	+++
211	LLTTVLINA	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
212	MTLSEIHAV	++
213	ILAVDGVLSV	+++
214	ALFETLIQL	+++
215	QIADIVTSV	++
216	ALSTVTPRI	++
217	LLWPSSVPA	+++
218	SLTGANITV	+++
219	GVVPTIQKV	++
220	ALSELERVL	+++
221	IMLNSVEEI	++
222	LLTGVFAQL	++
223	ALHPVQFYL	+++
224	LLFDWSGTGRADA	+++
225	FLPQPVPPLSV	+++
226	SLAGNLQEL	+++
227	SEMEELPSV	+
228	SLLELDGINLRL	+++
229	YLYELEHAL	++
230	KLLNMIFSI	+++
231	LLDDIFIRL	+++
233	SLFESLEYL	+++
234	VLLNEILEQV	++++
235	SLLNQPKAV	++
236	KMSELQTYV	+++
237	ALLEQTGDMSL	+++
238	HLQEKLQSL	++
239	VIIKGLEEITV	+++
241	KQFEGTVEI	+++
242	KLQEEIPVL	+++
243	GLAEFQENV	++
244	NVAEIVIH	+++
245	ALLEEEGV	++
246	ALAGIVTNV	+++
247	NLLIDDKGTIKL	++
248	VLMQDSRLYL	+++
249	YLYQILQGI	+++
250	LMQDSRLYL	+++
251	LLWGNLPEI	+++
252	SLMEKNQSL	++
253	KLLAVIHEL	+++
254	ALGDKFLLRV	++
255	FLMKNSDLYGA	+++
256	FLNDIFERI	+++
257	KLIDHQGLYL	+++

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Intercambio de péptido
258	QLVQRVASV	++
259	GPGIFPPPPQP	+
260	ALNESLVEC	+++
261	GLAALAVHL	+++
262	LLLEAVWHL	+++
263	SIIEYLPTL	+++
264	TLHDQVHLL	++
265	FLLDKPQDLSI	+++
266	FLLDKPQDL	++
267	YLLDMPLWYL	+++
268	SLDKDIVAL	++
269	GLLDCPIFL	++++
270	TLLTFFHEL	+++
271	VLIEYNFSI	+++
272	FVMEGEPPKL	++
273	SLNKQIETV	++
274	TLYNPERTITV	+++
275	AVPPPPSSV	++
276	RMPTVLQCV	+++
277	KLQEELNKV	+++
278	VLEDKVLSV	+++
279	VLMDEGAVLTL	++
280	HLWGHALFL	+++
281	LLLESDPKVYSL	++
282	SLYALHVKA	++
283	ALSELLQQV	+++
284	KLMDPGSLPPL	++
285	MLLDTVQKV	+++
286	FLTEMVHFI	+++

EJEMPLO 6

Tabla 8: Péptidos preferidos de acuerdo con la presente invención y péptidos adicionales desvelados en el presente documento

5

SEQ ID NO:	Secuencia	Código del péptido
11	LLDPKTIFL	HAVCR1-001
14	YTFSGDVQL	MMP1-003
21	YLMDDFSSL	COL6A3-015
24	KVWSDVTPL	MMP-002
25	LLWGHPRVALA	MXRA5-003
40	KIWEELSVLEV	MAGEA3-003
85	KLLDKPEQFL	FMN1-001
89	SLAETIFIV	HTR3A-001
117	TLLEGISRA	CABY-001
153	KLVELEHTL	CT83-001
155	TLDSYLKAV	CYP4Z-001

(continuación)

SEQ ID NO:	Secuencia	Código del péptido
157	ILQDGQFLV	DCAF4L2-001
168	VIFEGEPMYL	HORMAD1-001
233	SLFESLEYL	ZFP42-001
245	ALLEEEEGV	MAGEA4-003
253	KLLAVIHEL	RAD54B-002
264	TLHDQVHLL	ESR1-001
274	TLYNPERTIV	IGF-004

Cuantificación absoluta de péptidos asociados con tumores presentados en la superficie celular

- 5 La generación de proteínas de unión, tales como los anticuerpos y/o receptores de células T (TCR), es un proceso laborioso, que se puede conducir solamente para un número de dianas seleccionadas. En el caso de los péptidos asociados con tumores y específicos de tumores, los criterios de selección incluyen, pero no se restringen exclusivamente a, la presentación y la densidad del péptido presentado sobre la superficie celular. En adición al aislamiento y a la cuantificación relativa de los péptidos como se describe en el presente documento, los inventores
- 10 analizaron las copias absolutas de péptidos por célula como se describe. La cuantificación de las copias de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) por célula en las muestras tumorales sólidas requiere de la cuantificación absoluta del péptido asociado con tumores (TUMAP) aislado, de la eficiencia de aislamiento del péptido asociado con tumores (TUMAP), y del recuento celular de la muestra de tejido analizada.

15 Cuantificación de péptidos mediante nanoCL-EM/EM

- Para una cuantificación precisa de los péptidos mediante espectrometría de masas, se generó una curva de calibración para cada péptido utilizando el método del patrón interno. El patrón interno es una variante marcada con dos isótopos de cada péptido, es decir, se incluyeron dos aminoácidos marcados con isótopo en la síntesis de los péptidos
- 20 asociados con tumores (TUMAP). Éste difiere del péptido asociado con tumor solamente en su masa, pero no muestra diferencias en otras propiedades físico-químicas (Anderson et al., 2012). El patrón interno se agregó a cada muestra de EM y todas las señales de EM se normalizaron para la señal de EM del patrón interno para nivelar las variaciones técnicas potenciales entre los experimentos de EM.
- 25 Las curvas de calibración se prepararon en al menos tres matrices diferentes, es decir, los péptidos de antígenos de leucocitos humanos (HLA) eluidos a partir de muestras naturales similares a las muestras de EM de rutina, y cada preparación se midió en procesos de EM duplicados. Para la evaluación, las señales de EM se normalizaron con la señal del patrón interno, y se calculó una curva de calibración mediante la regresión logística.
- 30 Para la cuantificación de los péptidos asociados con tumores a partir de las muestras de tejido, a las muestras respectivas también se les agregó el patrón interno; las señales de EM se normalizaron con el patrón interno y se cuantificaron utilizando la curva de calibración de péptidos.

Eficiencia de aislamiento del péptido/MHC

- 35 Como para cualquier proceso de purificación de proteínas, el aislamiento de las proteínas a partir de las muestras de tejido está asociado con una cierta pérdida de la proteína de interés. Para determinar la eficiencia de aislamiento de los péptidos asociados con tumores (TUMAP), se generaron complejos de péptido/MHC para todos los péptidos asociados con tumores (TUMAP) seleccionados para la cuantificación absoluta. Con el fin de poder discriminar los
- 40 complejos agregados de los complejos naturales de péptido/MHC, se utilizaron versiones de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) marcados con un solo isótopo, es decir, se incluyó un aminoácido marcado con isótopo en la síntesis de los péptidos asociados con tumores (TUMAP). Estos complejos se agregaron a los lisados de tejido recién preparados, es decir, en el punto más temprano posible del procedimiento de aislamiento de los péptidos asociados con tumores (TUMAP), y entonces se capturaron como los complejos naturales del péptido/MHC en la siguiente
- 45 purificación de afinidad. La medición de la recuperación de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) individualmente marcados, por consiguiente, permite sacar conclusiones con respecto a la eficiencia de aislamiento de los péptidos asociados con tumores (TUMAP) naturales individuales.

- La eficiencia de aislamiento se analizó en un bajo número de muestras y fue comparable entre estas muestras de
- 50 tejido. En contraste, la eficiencia del aislamiento difiere entre los péptidos individuales. Esto sugiere que la eficiencia del aislamiento, aunque se determinó en solamente un número limitado de muestras de tejido, se puede extrapolar hasta cualquier otra preparación de tejido. Sin embargo, es necesario analizar cada péptido asociado con el tumor (TUMAP) individualmente debido a que la eficiencia del aislamiento no se puede extrapolar desde un péptido hasta otros.

Determinación del recuento celular en tejido sólido congelado

Con el objeto de determinar el recuento celular de las muestras de tejido sometidas a la cuantificación absoluta de péptidos, los inventores aplicaron el análisis de contenido de ADN. Este método es aplicable a una amplia gama de muestras de diferente origen y, más importante, a las muestras congeladas (Alcoser et al., 2011; Forsey y Chaudhuri, 2009; Silva et al., 2013). Durante el protocolo de aislamiento del péptido, se procesa una muestra del tejido hasta un lisado homogéneo, a partir del cual, se toma una alícuota de lisado pequeña. La alícuota se divide en tres partes, a partir de las cuales se aísla el ADN (QiaAmp ADN Mini Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). El contenido del ADN total a partir de cada aislamiento de ADN se cuantifica utilizando un ensayo de cuantificación de ADN con base en la fluorescencia (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies, Darmstadt, Alemania) en al menos dos reproducciones.

Con el objeto de calcular el número celular, se generó una curva estándar de ADN a partir de las alícuotas de las células sanguíneas sanas individuales, con un intervalo de números definidos de células. La curva estándar se utiliza para calcular el contenido celular total a partir del contenido de ADN total de cada aislamiento de ADN. El recuento celular total medio de la muestra de tejido utilizada para el aislamiento del péptido se extrapola considerando el volumen conocido de las alícuotas de lisado y el volumen de lisado total.

Copias de péptidos por célula

Con los datos de los experimentos anteriormente mencionados, los inventores calcularon el número de copias de péptidos asociados con tumores (TUMAP) por célula, dividiendo la cantidad total de péptido entre el recuento total de células de la muestra, seguido por la división a través de la eficiencia de aislamiento. En la Tabla 9 se muestra el número de células copiadas para los péptidos seleccionados.

Tabla 9: Números de copias absolutas. La tabla enlista los resultados de la cuantificación del péptido absoluto en las muestras tumorales. El número medio de copias por célula se indican para cada péptido: <100 = +; >=100 = ++; > = 1,000 +++; > = 10,000 = +++. El número de muestras, en donde sea evaluable, se indican los datos de EM de alta calidad.

SEQ ID NO:	Código del péptido	Copias por célula (media)	Número de muestras
11	HAVCR1-001	+	22
14	MMP1-003	++	10
21	COL6A3-01 5	+	35
24	MMP-002	+	33
85	FMN1-001	+	18
89	HTR3A-001	+++	17
117	CABY-001	+	17
155	CYP4Z-001	++	18
157	DCAF4L2-001	++	16
245	MAGEA4-003	+	33
253	RAD54B-002	+++	6
264	ESR1-001	+	16
274	IGF-004	+	6

Lista de referencias

- Adelaide, J. et al., Cancer Res 67 (2007): 11565-11575
 Alcoser, S. Y. et al., BMC.Biotechnol. 11 (2011): 124
 Allison, J. P. et al., Science 270 (1995): 932-933
 American Cancer Society, (2015), www.cancer.org
 Ampie, L. et al., Front Oncol. 5 (2015): 12
 Andersen, R. S. et al., Nat.Protoc. 7 (2012): 891-902
 Anderson, N. L. et al., J Proteome.Res 11 (2012): 1868-1878
 Appay, V. et al., Eur.J Immunol. 36 (2006): 1805-1814
 Arafat, H. et al., Surgery 150 (2011): 306-315
 Aung, P. P. et al., Oncogene 25 (2006): 2546-2557
 Avigan, D. et al., Clin Cancer Res. 10 (2004): 4699-4708
 Baba, T. et al., Eur.J Cardiothorac.Surg. 43 (2013): 759-764
 Bahnassy, A. A. et al., World J Gastroenterol. 20 (2014): 18240-18248
 Banchereau, J. et al., Cell 106 (2001): 271-274

- Band, A. M. et al., *J Mammary. Gland. Biol Neoplasia*. 16 (2011): 109-115
- Bankovic, J. et al., *Lung Cancer* 67 (2010): 151-159
- Beatty, G. et al., *J Immunol* 166 (2001): 2276-2282
- Beatty, T. H. et al., *Hum.Genet.* 132 (2013): 771-781
- 5 Beggs, J. D., *Nature* 275 (1978): 104-109
- Bell, J. L. et al., *J Clin Oncol* 33 (2015): 1285-1293
- Bell, J. L. et al., *Cell Mol Life Sci.* 70 (2013): 2657-2675
- Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57 (1995): 289-300
- Berger, C. et al., *Curr.Mol.Med.* 13 (2013): 1229-1240
- 10 Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Colon Cancer Treatment (2015a)
- Berman, R. S. et al., National Cancer Institute: PDQ(R) Rectal Cancer Treatment (2015b)
- Bhan, S. et al., *Oncol Rep.* 28 (2012): 1498-1502
- Bode, P. K. et al., *Mod.Pathol.* 27 (2014): 899-905
- Bogush, T. A. et al., *Antibiot.Khimioter.* 54 (2009): 41-49
- 15 Bonventre, J. V., *Trans.Am.Clin Climatol.Assoc.* 125 (2014): 293-299
- Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16 (2003): 707-711
- Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
- Bray, F. et al., *Int J Cancer* 132 (2013): 1133-1145
- Brossart, P. et al., *Blood* 90 (1997): 1594-1599
- 20 Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004): 29-43
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 2817-2825
- Butterfield, L. H. et al., *Clin Cancer Res* 9 (2003): 5902-5908
- Caballero, O. L. et al., *PLoS.One.* 5 (2010)
- Carballido, E. et al., *Cancer Control* 19 (2012): 54-67
- 25 Card, K. F. et al., *Cancer Immunol Immunother.* 53 (2004): 345-357
- Chang, Y. S. et al., *Cancer Chemother.Pharmacol.* 59 (2007): 561-574
- Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004): 1211-1223
- Chapiro, J. et al., *Radiol.Med.* 119 (2014): 476-482
- Chen, H. S. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 11 (2003): 145-148
- 30 Chen, S. T. et al., *Cancer Sci.* 102 (2011b): 2191-2198
- Chen, Y. L. et al., *Int J Surg.* 11 (2013c): 85-91
- Chen, Y. T. et al., *Cancer Immun.* 5 (2005): 9
- Cierna, Z. et al., *BMC.Cancer* 14 (2014): 472
- Ciruelos Gil, E. M., *Cancer Treat.Rev* 40 (2014): 862-871
- 35 Cohen, C. J. et al., *J Mol Recognit.* 16 (2003a): 324-332
- Cohen, C. J. et al., *J Immunol* 170 (2003b): 4349-4361
- Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972): 2110-2114
- Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science* (1995)
- Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006): 2730-2738
- 40 Coosemans, A. et al., *Anticancer Res* 33 (2013): 5495-5500
- Coulie, P. G. et al., *Immunol.Rev* 188 (2002): 33-42
- Counter, C. M. et al., *Blood* 85 (1995): 2315-2320
- Cuadros, T. et al., *Cancer Res* 74 (2014): 1416-1428
- Cuadros, T. et al., *Eur.J Cancer* 49 (2013): 2034-2047
- 45 Dalerba, P. et al., *Int.J Cancer* 93 (2001): 85-90
- De, Plaen E. et al., *Immunogenetics* 40 (1994): 360-369
- Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006): 4163-4170
- Denkberg, G. et al., *J Immunol* 171 (2003): 2197-2207
- Downie, D. et al., *Clin Cancer Res.* 11 (2005): 7369-7375
- 50 Du, X. et al., *Clin Cancer Res* 20 (2014): 6324-6335
- Duan, Z. et al., *Clin Cancer Res* 9 (2003): 2778-2785
- Ek, S. et al., *Cancer Res* 62 (2002): 4398-4405
- Emens, L. A., *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 12 (2012): 1597-1611
- Enguita-German, M. et al., *World J Hepatol.* 6 (2014): 716-737
- 55 Estey, E. H., *Am.J Hematol.* 89 (2014): 1063-1081
- Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991): 290-296
- Ferlay et al., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.11 [Internet], (2013), <http://globocan.iarc.fr>
- 60 Findeis-Hosey, J. J. et al., *Biotech. Histochem.* 87 (2012): 24-29
- Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001): 8809-8814
- Forsey, R. W. et al., *Biotechnol.Lett.* 31 (2009): 819-823
- Frasor, J. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* 418 Pt 3 (2015): 235-239
- Fuge, O. et al., *Res Rep.Urol.* 7 (2015): 65-79
- 65 Fujiyama, T. et al., *J Dermatol.Sci.* 75 (2014): 43-48
- Fukuyama, T. et al., *Cancer Res.* 66 (2006): 4922-4928

- Fuqua, S. A. et al., *Breast Cancer Res Treat.* 144 (2014): 11-19
 Gabrilovich, D. I. et al., *Nat Med.* 2 (1996): 1096-1103
 Gandhi, A. V. et al., *Ann Surg.Oncol* 20 Suppl 3 (2013): S636-S643
 Gardina, P. J. et al., *BMC.Genomics* 7 (2006): 325
 5 Gattinoni, L. et al., *Nat Rev.Immunol* 6 (2006): 383-393
 Giannopoulos, K. et al., *Leukemia* 24 (2010): 798-805
 Giannopoulos, K. et al., *Int.J Oncol* 29 (2006): 95-103
 Gibbs, P. et al., *Melanoma Res* 10 (2000): 259-264
 Gnjjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003): 8862-8867
 10 Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997): 905-911
 Gong, Y. et al., *Adv.Anat.Pathol.* 21 (2014): 191-200
 Grah, J. J. et al., *Tumori* 100 (2014): 60-68
 Granziero, L. et al., *Blood* 97 (2001): 2777-2783
 Green, M. R. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 4th (2012)
 15 Greenfield, E. A., *Antibodies: A Laboratory Manual* 2nd (2014)
 Gu, X. et al., *Sci.Rep.* 4 (2014): 6625
 Gunawardana, C. et al., *Br.J Haematol.* 142 (2008): 606-609
 Hall, R. D. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 22-31
 Hamilton, K. E. et al., *Mol.Cancer Res* 13 (2015): 1478-1486
 20 Han, L. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014): 6734-6742
 Hanagiri, T. et al., *Anticancer Res.* 33 (2013): 2123-2128
 Harig, S. et al., *Blood* 98 (2001): 2999-3005
 Hasegawa, H. et al., *Arch.Pathol.Lab Med.* 122 (1998): 551-554
 Hayashi, S. I. et al., *Endocr.Relat Cancer* 10 (2003): 193-202
 25 Hennard, C. et al., *J Pathol.* 209 (2006): 430-435
 Herbert, N. et al., *J Immunol.* 185 (2010): 902-916
 Hinrichs, C. S. et al., *Nat.Biotechnol.* 31 (2013): 999-1008
 Hiramoto, T. et al., *Oncogene* 18 (1999): 3422-3426
 Hoffmann, N. E. et al., *Cancer* 112 (2008): 1471-1479
 30 Holtl, L. et al., *Clin.Cancer Res.* 8 (2002): 3369-3376
 Hsu, H. C. et al., *Biochem.Biophys.Res Commun.* 329 (2005): 1108-1117
 Hu, S. et al., *J Cancer Res Clin Oncol* 140 (2014): 883-893
 Huang, X. et al., *Cell Prolif.* 48 (2015b): 593-599
 Hui, L. et al., *Oncol Rep.* 34 (2015): 2627-2635
 35 Hussein, Y. M. et al., *Med.Oncol* 29 (2012): 3055-3062
 Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007): 5829-5838
 Ioannidis, P. et al., *Anticancer Res* 23 (2003): 2179-2183
 Jeng, Y. M. et al., *Br.J Surg.* 96 (2009): 66-73
 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987): 4611-4615
 40 Kalos, M. et al., *Sci.Transl.Med.* 3 (2011): 95ra73
 Kang, C. Y. et al., *J Gastrointest.Surg.* 18 (2014): 7-15
 Kibbe, A. H., *Handbook of Pharmaceutical Excipients* rd (2000)
 Kim, Y. D. et al., *Int.J Mol.Med.* 29 (2012): 656-662
 Kobayashi, H. et al., *Oncol Lett.* 10 (2015): 612-618
 45 Koido, S. et al., *World J Gastroenterol.* 19 (2013): 8531-8542
 Krackhardt, A. M. et al., *Blood* 100 (2002): 2123-2131
 Krieg, A. M., *Nat Rev.Drug Discov.* 5 (2006): 471-484
 Lederer, M. et al., *Semin.Cancer Biol* 29 (2014): 3-12
 Lee, M. Y. et al., *J Cell Physiol* 224 (2010): 17-27
 50 Lee, W. C. et al., *J Immunother.* 28 (2005): 496-504
 Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 030/099, (2014)
 Leivo, I. et al., *Cancer Genet.Cytogenet.* 156 (2005): 104-113
 Leonetti, M. D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 109 (2012): 19274-19279
 Li, H. et al., *Bull.Cancer* 99 (2012): E26-E33
 55 Li, M. et al., *Clin Cancer Res* 11 (2005): 1809-1814
 Li, W. M. et al., *J Surg.Oncol* (2016)
 Li, Y. et al., *Cancer Epidemiol.* 39 (2015): 8-13
 Liddy, N. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 980-987
 Lin, J. et al., *Clin Cancer Res* 10 (2004): 5708-5716
 60 Lin, L. et al., *Oncol Lett.* 6 (2013): 740-744
 Lisitskaia, K. V. et al., *Mol.Gen.Mikrobiol.Virusol.* (2010): 34-37
 Liu, X. et al., *Int.Immunopharmacol.* 25 (2015): 416-424
 Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med.* 162 (1985): 1745-1759
 Llovet, J. M. et al., *N.Engl.J Med.* 359 (2008): 378-390
 65 Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993): 276-291
 Lonsdale, J., *Nat.Genet.* 45 (2013): 580-585

- Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981): 2791-2795
 Lundblad, R. L., *Chemical Reagents for Protein Modification* 3rd (2004)
 Luo, C. et al., *Clin Cancer Res* 13 (2007): 1288-1297
 Mantia-Smaldone, G. M. et al., *Hum.Vaccin.Immunother.* 8 (2012): 1179-1191
 5 Marten, A. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 51 (2002): 637-644
 Mason, J. M. et al., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015): 3180-3196
 Massari, F. et al., *Cancer Treat.Rev.* 41 (2015): 114-121
 Matsueda, S. et al., *World J Gastroenterol.* 20 (2014): 1657-1666
 Maus, M. V. et al., *Blood* 123 (2014): 2625-2635
 10 Mayr, C. et al., *Exp.Hematol.* 34 (2006): 44-53
 Mayr, C. et al., *Blood* 105 (2005): 1566-1573
 Mehta, A. et al., *Breast* 23 (2014): 2-9
 Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997): 3230-3237
 Miyagi, Y. et al., *Clin Cancer Res* 7 (2001): 3950-3962
 15 Miyoshi, Y. et al., *Med.Mol.Morphol.* 43 (2010): 193-196
 Molina, J. R. et al., *Mayo Clin Proc.* 83 (2008): 584-594
 Mongan, N. P. et al., *Mol.Carcinog* 45 (2006): 887-900
 Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006): 126-129
 Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997): 1017-1027
 20 Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006): 3435-3443
 Moulton, H. M. et al., *Clin Cancer Res* 8 (2002): 2044-2051
 Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res* 7 (2008): 51-61
 Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007): 3470-3480
 Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999): 8633-8638
 25 Murray, G. I. et al., *Histopathology* 57 (2010): 202-211
 National Cancer Institute, (5-6-2015), www.cancer.gov
 Noubissi, F. K. et al., *J Invest Dermatol.* 134 (2014): 1718-1724
 Oehlrich, N. et al., *Int.J Cancer* 117 (2005): 256-264
 Okuno, K. et al., *Exp.Ther Med.* 2 (2011): 73-79
 30 Ottaviani, S. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 55 (2006): 867-872
 Otte, M. et al., *Cancer Res* 61 (2001): 6682-6687
 Ozeki, N. et al., *Int.J Mol.Sci.* 17 (2016)
 Pai, V. P. et al., *Breast Cancer Res* 11 (2009): R81
 Palmer, D. H. et al., *Hepatology* 49 (2009): 124-132
 35 Palomba, M. L., *Curr.Oncol Rep.* 14 (2012): 433-440
 Perez, C. A. et al., *Expert. Rev Anticancer Ther.* 11 (2011): 1599-1605
 Phan, G. Q. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 289-297
 Pineda, C. T. et al., *Cell* 160 (2015): 715-728
 Pinheiro, J. et al., *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* (<http://CRAN.R-project.org/package=nlme>) (2015)
 40 Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995): 1783-1787
 Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994): 949-955
 Porter, D. L. et al., *N.Engl.J Med.* 365 (2011): 725-733
 Prasad, M. L. et al., *Head Neck* 26 (2004): 1053-1057
 Qian, Z. et al., *Mol.Cancer Res* 12 (2014): 335-347
 45 Quinn, D. I. et al., *Urol.Oncol.* (2015)
 Raman, J. D. et al., *Carcinogenesis* 27 (2006): 499-507
 Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999): 213-219
 Reck, M., *Ann.Oncol* 23 Suppl 8 (2012): viii28-viii34
 RefSeq, The NCBI handbook [Internet], Chapter 18, (2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK210911>
 50 Reinisch, C. M. et al., *Int.J Exp.Pathol.* 92 (2011): 326-332
 Reinisch, W. et al., *J Immunother.* 25 (2002): 489-499
 Reinmuth, N. et al., *Dtsch.Med.Wochenschr.* 140 (2015): 329-333
 Ries, J. et al., *Int.J Oncol* 26 (2005): 817-824
 Rinaldi, A. et al., *Pathobiology* 77 (2010): 129-135
 55 Rini, B. I. et al., *Curr.Opin.Oncol.* 20 (2008): 300-306
 Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006): 67-74
 Risinger, J. I. et al., *Clin Cancer Res* 13 (2007): 1713-1719
 Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990): 918-921
 Rodenko, B. et al., *Nat Protoc.* 1 (2006): 1120-1132
 60 S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, 032-010OL, (2013)
 S3-Leitlinie Lungenkarzinom, 020/007, (2011)
 S3-Leitlinie maligne Ovarialtumore, 032-035OL, (2013)
 S3-Leitlinie Mammakarzinom, 032-045OL, (2012)
 S3-Leitlinie Melanom, 032-024OL, (2013)
 65 S3-Leitlinie Prostatakarzinom, 043/022OL, (2014)
 Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988): 487-491

- Salman, B. et al., *Oncoimmunology*. 2 (2013): e26662
 Sangro, B. et al., *J Clin Oncol* 22 (2004): 1389-1397
 Schmidt, S. M. et al., *Cancer Res* 64 (2004): 1164-1170
 Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999): 571-576
 5 Shahzad, M. M. et al., *Cancer Lett.* 330 (2013): 123-129
 Sherman, F. et al., *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics* (1986)
 Sherman-Baust, C. A. et al., *Cancer Cell* 3 (2003): 377-386
 Shi, M. et al., *World J Gastroenterol.* 10 (2004): 1146-1151
 Showel, M. M. et al., *F1000Prime.Rep.* 6 (2014): 96
 10 Siegel, S. et al., *Blood* 102 (2003): 4416-4423
 Silva, L. P. et al., *Anal.Chem.* 85 (2013): 9536-9542
 Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004): 187-195
 Skandalis, S. S. et al., *Matrix Biol* 35 (2014): 182-193
 Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006): 3089-3094
 15 Smith, M. J. et al., *Br.J Cancer* 100 (2009): 1452-1464
 Son, M. Y. et al., *Stem Cells* 31 (2013): 2374-2387
 Springelkamp, H. et al., *Genet.Epidemiol.* 39 (2015): 207-216
 Stahl, M. et al., *Ann.Oncol.* 24 Suppl 6 (2013): vi51-vi56
 Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* 9 (2008): 163
 20 Su, Z. et al., *Cancer Res.* 63 (2003): 2127-2133
 Sun, H. et al., *J BUON.* 20 (2015): 296-308
 Szajnik, M. et al., *Gynecol.Obstet.(Sunnyvale.) Suppl* 4 (2013): 3
 Szarvas, T. et al., *Int J Cancer* 135 (2014): 1596-1604
 Takayama, T. et al., *Cancer* 68 (1991): 2391-2396
 25 Takayama, T. et al., *Lancet* 356 (2000): 802-807
 Tanaka, F. et al., *Int.J Oncol* 10 (1997): 1113-1117
 Teufel, R. et al., *Cell Mol Life Sci.* 62 (2005): 1755-1762
 Thakkar, J. P. et al., *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 23 (2014): 1985-1996
 Thorsen, K. et al., *Mol Cell Proteomics.* 7 (2008): 1214-1224
 30 Tian, X. et al., *J Transl. Med.* 13 (2015): 337
 Toomey, P. G. et al., *Cancer Control* 20 (2013): 32-42
 Tradonsky, A. et al., *Am.J Clin Pathol.* 137 (2012): 918-930
 Tran, E. et al., *Science* 344 (2014): 641-645
 Urgard, E. et al., *Cancer Inform.* 10 (2011): 175-183
 35 van der Bruggen, P. et al., *Immunol.Rev* 188 (2002): 51-64
 van, Duin M. et al., *Haematologica* 96 (2011): 1662-1669
 Velinov, N. et al., *Khirurgiia (Sofia)* (2010): 44-49
 Walter, S. et al., *J Immunol* 171 (2003): 4974-4978
 Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012): 1254-1261
 40 Wang, G. H. et al., *Oncol Lett.* 5 (2013): 544-548
 Wang, Y. et al., *Anticancer Res* 33 (2013): 207-214
 Wilhelm, S. M. et al., *Cancer Res* 64 (2004): 7099-7109
 Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999): 2418-2423
 Wittig, B. et al., *Hum.Gene Ther.* 12 (2001): 267-278
 45 Wlodarski, M. W. et al., *J Leukoc.Biol* 83 (2008): 589-601
 World Cancer Report, (2014)
 Wu, Z. Y. et al., *Scand.J Immunol.* 74 (2011): 561-567
 Xie, X. et al., *Oncol Lett.* 7 (2014): 1537-1543
 Xiong, D. et al., *Carcinogenesis* 33 (2012): 1797-1805
 50 Xu, J. et al., *J Mol.Biol* 377 (2008): 28-46
 Xu, L. et al., *Zhongguo Fei.Ai.Za Zhi.* 14 (2011): 727-732
 Xu, X. et al., *Exp.Mol.Pathol.* 97 (2014): 579-584
 Xu, Y. et al., *Sci.Rep.* 5 (2015): 12104
 Yakimchuk, K. et al., *Mol.Cell Endocrinol.* 375 (2013): 121-129
 55 Yamada, R. et al., *Tissue Antigens* 81 (2013): 428-434
 Yang, S. et al., *Biochim.Biophys.Acta* 1772 (2007): 1033-1040
 Yao, J. et al., *Cancer Immunol.Res.* 2 (2014): 371-379
 Yin, B. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 7 (2014a): 2934-2941
 Yu, J. et al., *Gut* 64 (2015): 636-645
 60 Yu, W. et al., *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 264 (2012): 73-83
 Yuan, R. H. et al., *Ann Surg.Oncol* 16 (2009): 1711-1719
 Zamuner, F. T. et al., *Mol.Cancer Ther.* 14 (2015): 828-834
 Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997): 4570-4577
 Zhan, W. et al., *Clin Res Hepatol. Gastroenterol.* (2015)
 65 Zhang, H. et al., *Carcinogenesis* 35 (2014): 1863-1871
 Zhang, J. et al., *Oncotarget.* 6 (2015): 42040-42052

- Zhang, S. et al., *Int.J Clin Exp.Pathol.* 8 (2015): 541-550
 Zhang, X. et al., *Int.J Oncol* (2016)
 Zhao, H. et al., *Zhonghua Gan Zang.Bing.Za Zhi.* 10 (2002): 100-102
 Zou, T. T. et al., *Oncogene* 21 (2002): 4855-4862
 5 Follenzi A,et al. *Nat Genet.* 2000 Jun;25(2):217-22.
 Zufferey R, et al. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2886-92.
 Scholten KB, et al. *Clin Immunol.* 2006 May; 119(2):135-45.
 Gustafsson C, et al. *Trends Biotechnol.* 2004 Jul;22(7):346-53. Review.
 Kuball, J., et al. (2007). *Blood* 109, 2331-2338.
 10 Schmitt, T. M., et al. (2009). *Hum. Gene Ther.* 20, 1240-1248

REIVINDICACIONES

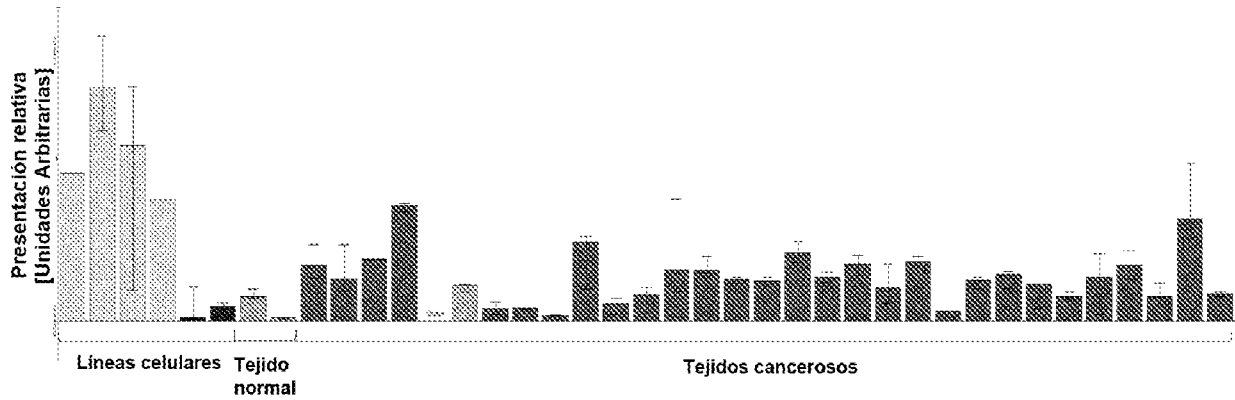
1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 14; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido incluye enlaces no peptídicos y en donde dichos enlaces no peptídicos se seleccionan del grupo que consiste en enlaces peptídicos inversos, $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_2\text{SO}-$.
- 10 3. Un receptor de células T, preferentemente un receptor de células T recombinante, soluble o unido a membrana que es reactivo con un ligando de HLA en complejo con HLA-A*02, en donde dicho ligando consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.
- 15 4. Un anticuerpo, en particular un anticuerpo soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, preferentemente el péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2 cuando se une a una molécula de MHC.
- 20 5. Un ácido nucleico, que codifica un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 o un TCR de acuerdo con la reivindicación 3, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, opcionalmente enlazado a una secuencia promotora heteróloga, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.
- 25 6. Una célula hospedadora recombinante que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha célula hospedadora preferentemente es una célula presentadora de antígeno tal como una célula dendrítica, o en donde dicha célula hospedadora preferentemente es una célula T o una célula NK.
- 30 7. Un método para producir el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o para producir el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 3, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6 que presenta el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 a 2, o que expresa el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, y aislar el péptido o el TCR o el anticuerpo a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
- 35 8. Un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo el método poner en contacto, *in vitro*, las células T con las moléculas del MHC clase I humanas cargadas con antígeno expresadas sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o una construcción artificial que imite a una célula presentadora de antígeno durante un período de tiempo suficiente para activar dichas células T de una manera específica del antígeno, en donde dicho antígeno es un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 40 9. Un linfocito T activado, producido mediante el método de acuerdo con la reivindicación 8 que reconoce selectivamente una célula que presenta un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos dada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 interactuando a través de su receptor de células T con el péptido en complejo con HLA-A*02.
- 45 10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un principio activo seleccionado del grupo que consiste en el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes farmacéuticamente aceptables adicionales.
- 50 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 9 y que comprende además uno o más adyuvantes.
- 55 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el uno o más adyuvantes se seleccionan de interleucina e inmunoadyuvante.
- 60 13. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en medicina, preferentemente para su uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer, o para su uso en la fabricación de un medicamento contra el cáncer.
- 65 14. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el diagnóstico y/o el tratamiento de cáncer, o para su uso en la elaboración de un

medicamento contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 13 en donde dicho cáncer se selecciona del grupo de carcinoma hepatocelular (HCC), carcinoma colorrectal (CRC), glioblastoma (GB), cáncer gástrico (GC), cáncer esofágico, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer pancreático (PC), carcinoma de células renales (RCC), hiperplasia de próstata benigna (BPH), cáncer de próstata (PCA), cáncer de ovario (OC), melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica (CLL), carcinoma de células de Merkel (MCC), cáncer de pulmón microcítico (SCLC), linfoma no de Hodgkin (NHL), leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de vesícula biliar y colangiocarcinoma (GBC, CCC), cáncer de vejiga urinaria (UBC), cáncer uterino (UEC), y otros tumores que muestran una sobre-presentación de un péptido que consiste en SEQ ID NO: 14.

10 15. Un kit que comprende:

- 15 a) un recipiente que comprende una composición farmacéutica que contiene el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, el receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 3, el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5, la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o el linfocito T activado de acuerdo con la reivindicación 9, en solución o en forma liofilizada;
- b) opcionalmente, un segundo recipiente que contiene un diluyente o una solución reconstituyente para la formulación liofilizada;
- 20 c) opcionalmente, al menos un péptido más seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 13 y 15 a 288, y
- d) opcionalmente, instrucciones para: (i) el uso de la solución o (ii) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada, y
- e) opcionalmente comprende además uno o más de (iii) un regulador del pH, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja, o (vii) una jeringa.

Figura 1A – Péptido: KLQEKIQEL (A*02:01)



Péptido detectado en

4 líneas celulares de cáncer leucocítico, 1 línea celular de cáncer pancreático, 1 línea celular de melanoma, 2 tejidos normales (1 glándula suprarrenal, 1 bazo), 31 tejidos cancerosos (1 cáncer de cerebro, 4 cánceres de colon, 1 cáncer esofágico, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de hígado, 16 cánceres de pulmón, 4 cánceres ováricos, 1 cáncer de recto, 1 cáncer gástrico) (de izquierda a derecha)

Figura 1B – Péptido: QLEKNWLL (A*02:01)

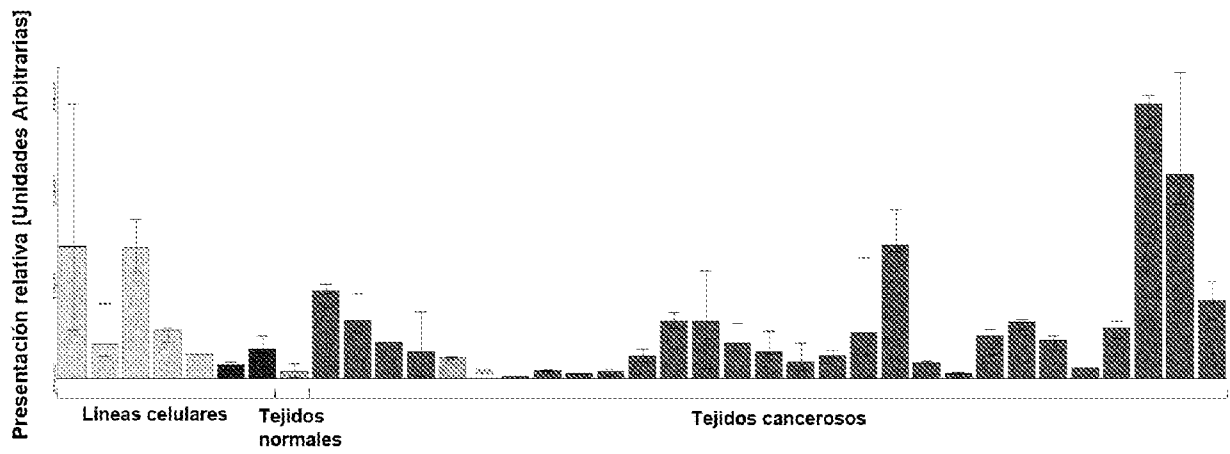
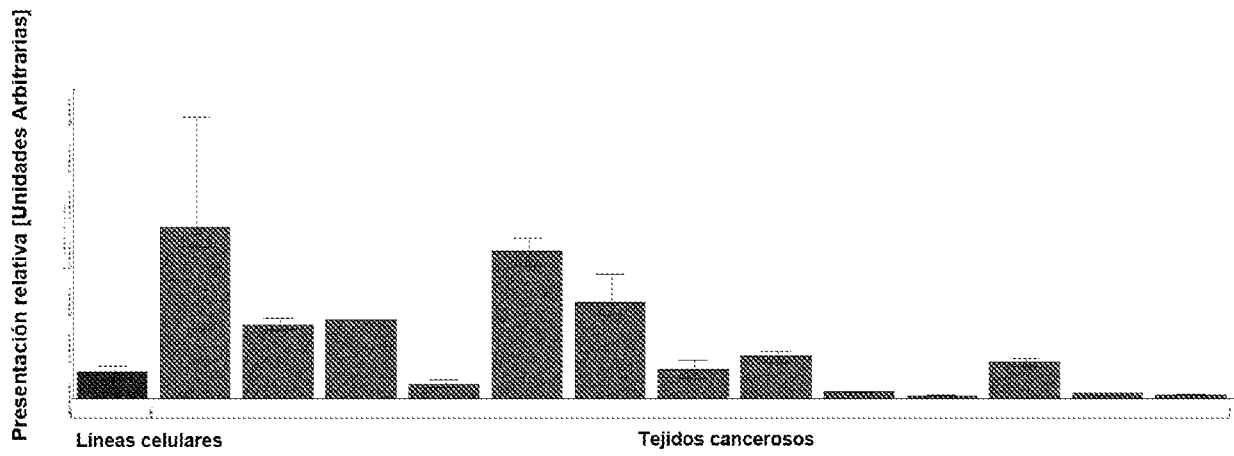


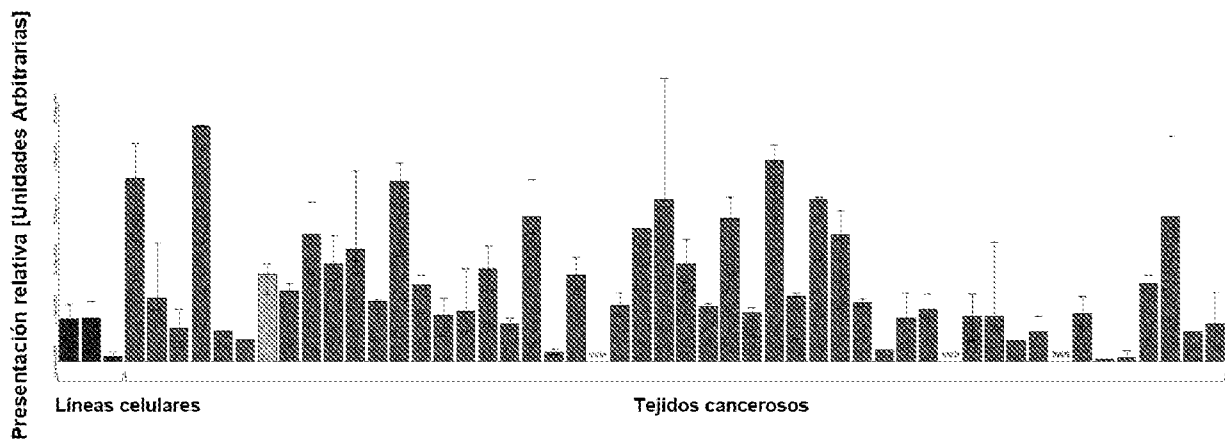
Figura 1C – Péptido:LLDPKTHFL (A*02:01)



Péptido detectado en

1 línea celular de cáncer de riñón, 0 tejidos normales, 13 tejidos cancerosos (8 cánceres de riñón, 1 cáncer de hígado, 2 cánceres de pulmón, 2 cánceres rectales) (de izquierda a derecha)

Figura 1D – Péptido: RLHDENILL (A*02:01)



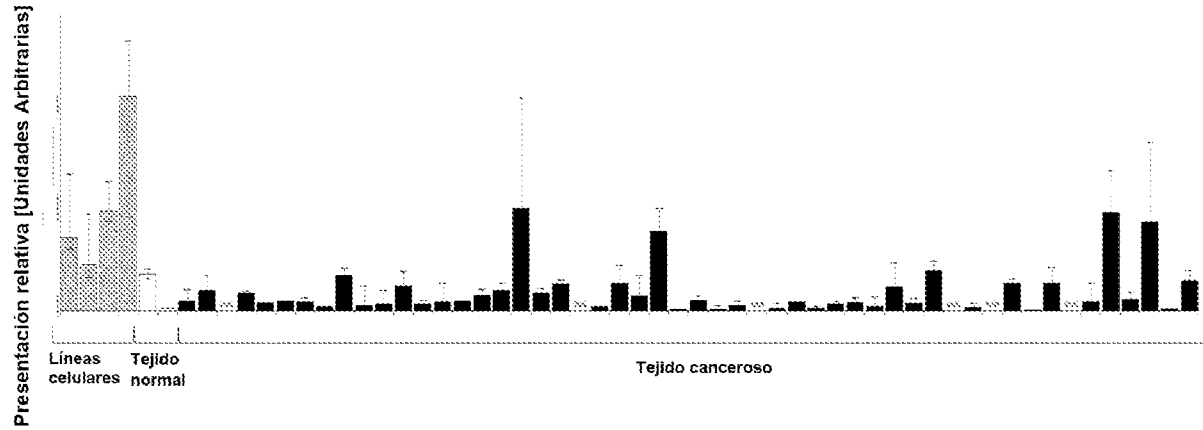
Péptido detectado en

1 línea celular de cáncer de riñón, 1 línea celular de cáncer de próstata, 1 línea celular de melanoma, 0 tejidos normales, 50 tejidos cancerosos (4 cánceres de cerebro, 1 cáncer de colon, 2 cánceres esofágicos, 3 cánceres de riñón, 2 cánceres de hígado, 23 cánceres de pulmón, 7 cánceres ováricos, 2 cánceres pancreáticos, 2 cánceres de próstata, 3 cánceres de recto, 1 cáncer gástrico) (de izquierda a derecha)

Figura 1E

Péptido: SVLEKEIYSI (A*02:01)

SEQ ID: 2



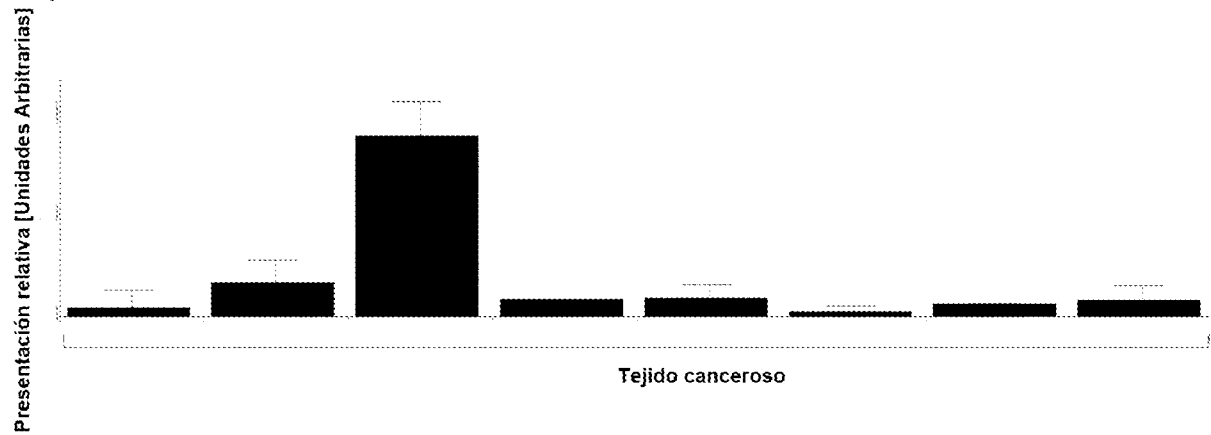
Péptido detectado en

4 líneas celulares (3 células sanguíneas, 1 pancreática), 2 tejidos normales (1 ganglio linfático, 1 tráquea), 52 tejidos cancerosos (2 cánceres del conducto biliar, 1 cáncer de células mieloides, 3 cánceres de leucemia leucocítica, 5 cánceres de mama, 1 cáncer esofágico, 1 cáncer de esófago y estómago, 1 cáncer de vesícula biliar, 4 cánceres de colon, 7 cánceres de pulmón, 6 cánceres de ganglios linfáticos, 7 cánceres ováricos, 4 cánceres de próstata, 4 cánceres de piel, 2 cánceres de vejiga urinaria, 4 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1F

Péptido: KIWEELSVLEV (A*02:01)

SEQ ID: 40



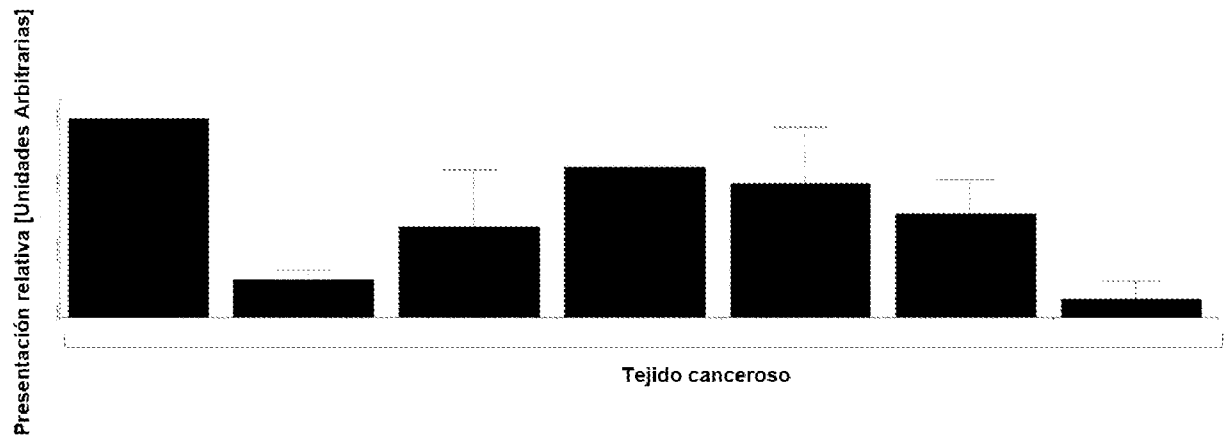
Péptido detectado en

8 tejidos cancerosos (1 cáncer de hígado, 3 cánceres de pulmón, 2 cánceres de piel, 1 cáncer de estómago, 1 cáncer de vejiga urinaria) (de izquierda a derecha)

Figura 1G

Péptido: FLIENLLAA (A*02:01)

SEQ ID: 67



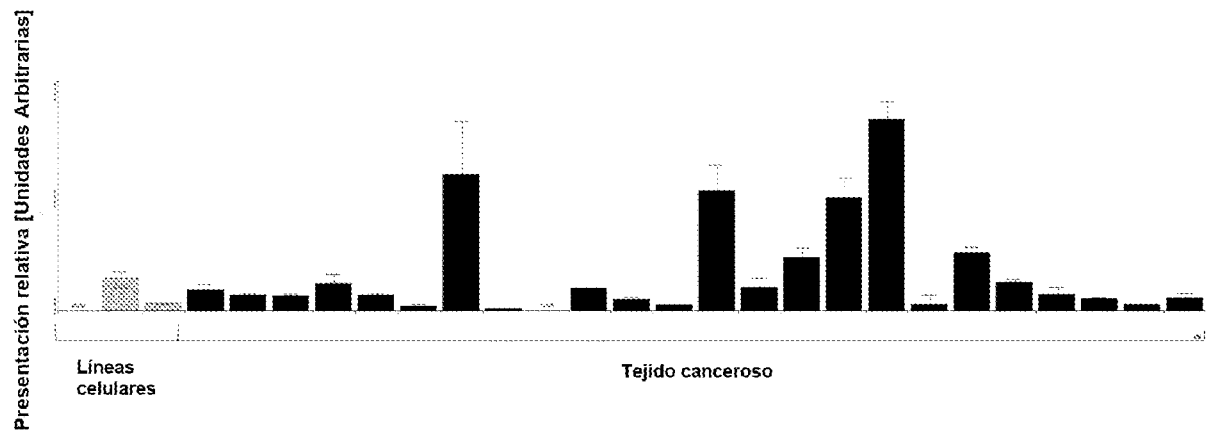
Péptido detectado en

7 tejidos cancerosos (4 cánceres de cerebro, 2 cánceres de pulmón, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1H

Péptido: FLLEREQLL (A*02:01)

SEQ ID: 84



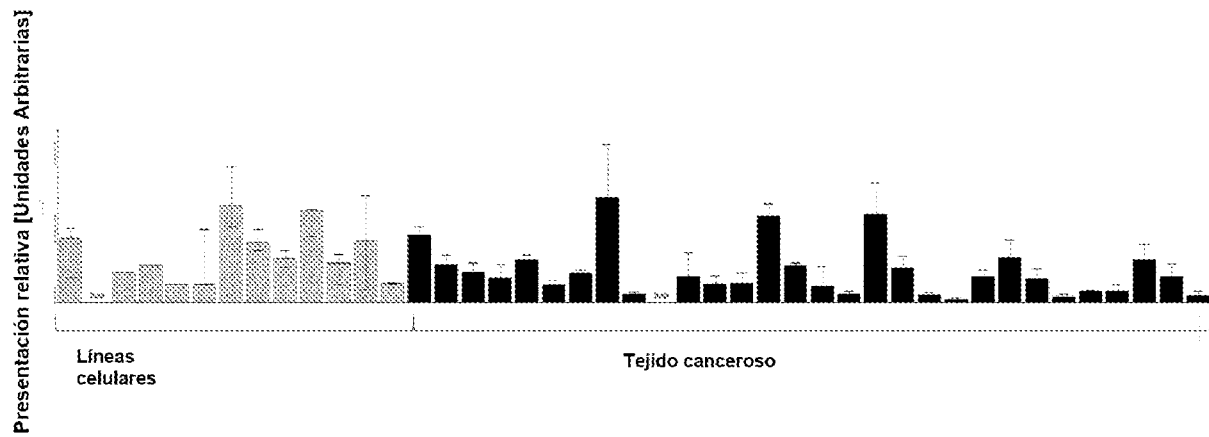
Péptido detectado en

3 líneas celulares (2 de células sanguíneas, 1 de piel), 24 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 3 cánceres de leucemia leucocítica, 1 cáncer de médula ósea, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de riñón, 2 cánceres de colon, 3 cánceres de recto, 1 cáncer de pulmón, 7 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 11

Péptido: SLLNQPKAV (A*02:01)

SEQ ID: 235



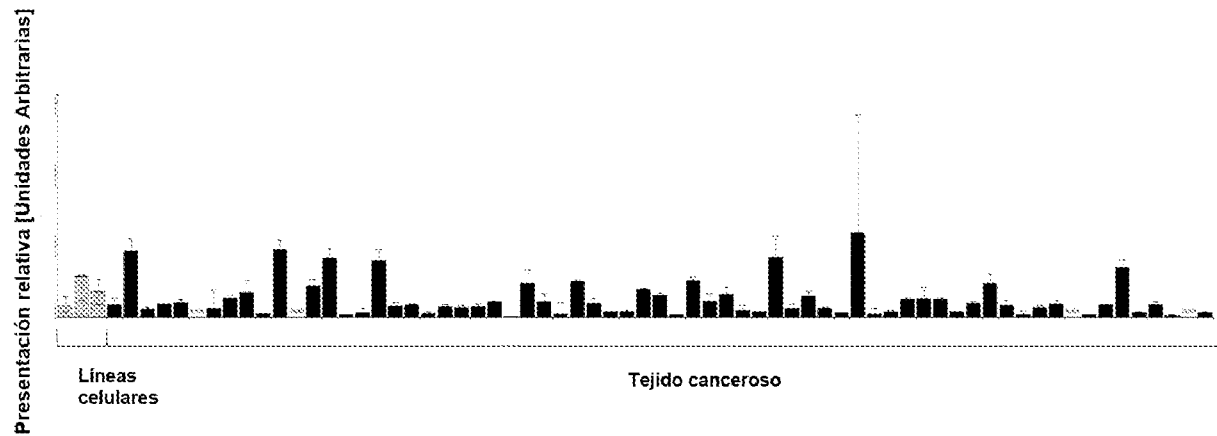
Péptido detectado en

13 líneas celulares (3 de células sanguíneas, 2 de riñón, 1 de páncreas), 30 tejidos cancerosos (1 cáncer de células mieloides, 1 cáncer de leucemia leucocítica, 2 cánceres de cerebro, 2 cánceres de mama, 2 cánceres esofágicos, 1 cáncer de vesícula biliar, 1 cáncer de recto, 2 cánceres de hígado, 4 cánceres de pulmón, 5 cánceres de ganglios linfáticos, 2 cánceres ováricos, 2 cánceres de piel, 4 cánceres de vejiga urinaria, 1 cáncer de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 1J

Péptido: GLAEFQENV (A*02:01)

SEQ ID: 243



Péptido detectado en

3 líneas celulares (1 de células sanguíneas, 1 de riñón, 1 de páncreas), 67 tejidos cancerosos (1 cáncer del conducto biliar, 4 cánceres de leucemia leucocítica, 1 cáncer de células mieloides, 2 cánceres de cerebro, 3 cánceres de mama, 4 cánceres esofágicos, 2 cánceres de vesícula biliar, 2 cánceres de colon, 1 cáncer de recto, 2 cánceres de hígado, 15 cánceres de pulmón, 8 cánceres de ganglios linfáticos, 9 cánceres ováricos, 3 cánceres de piel, 4 cánceres de vejiga urinaria, 6 cánceres de útero) (de izquierda a derecha)

Figura 2H

Gen o genes: IGF2BP1, IGF2BP3

Péptido: TLYNPERTITV

SEQ ID: 274

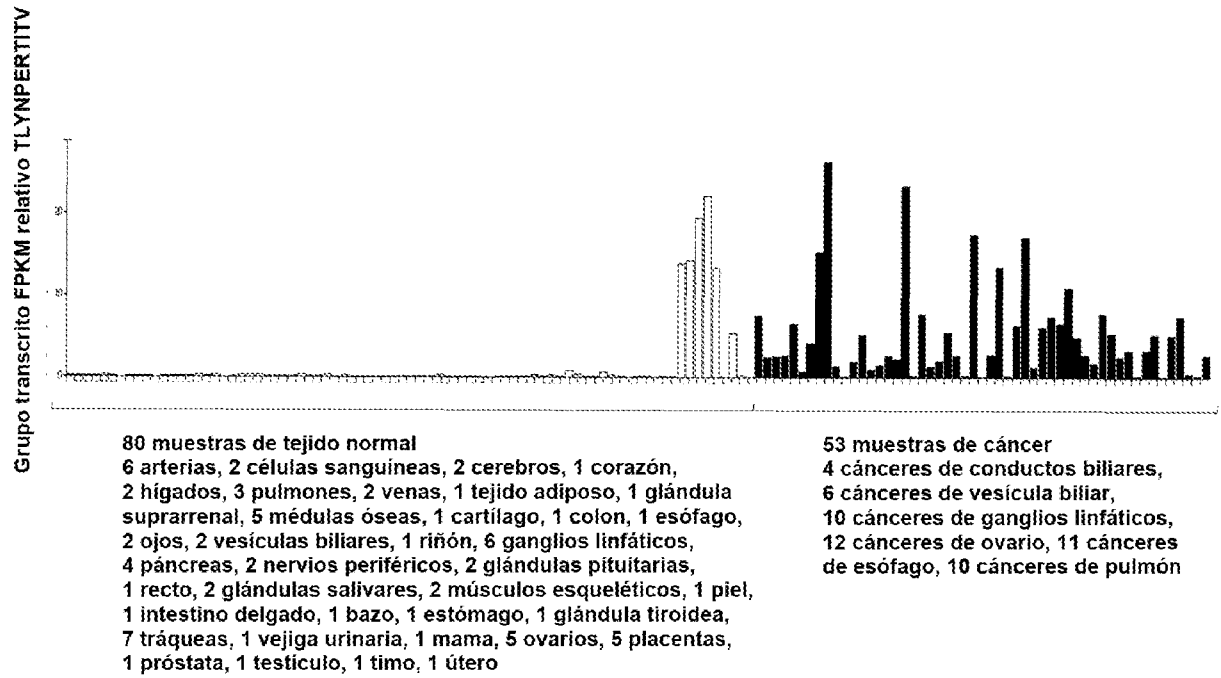


Figura 2A Gen: PRIM2

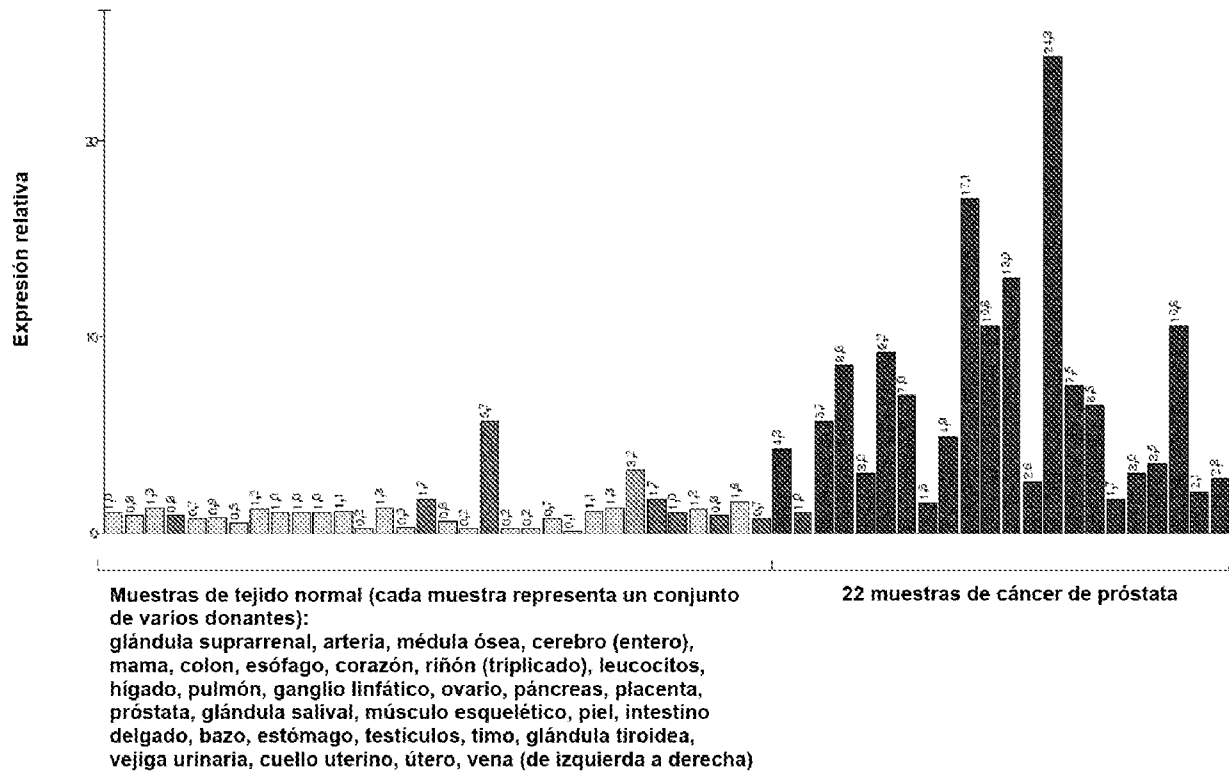


Figura 2B Gen: CHEK1

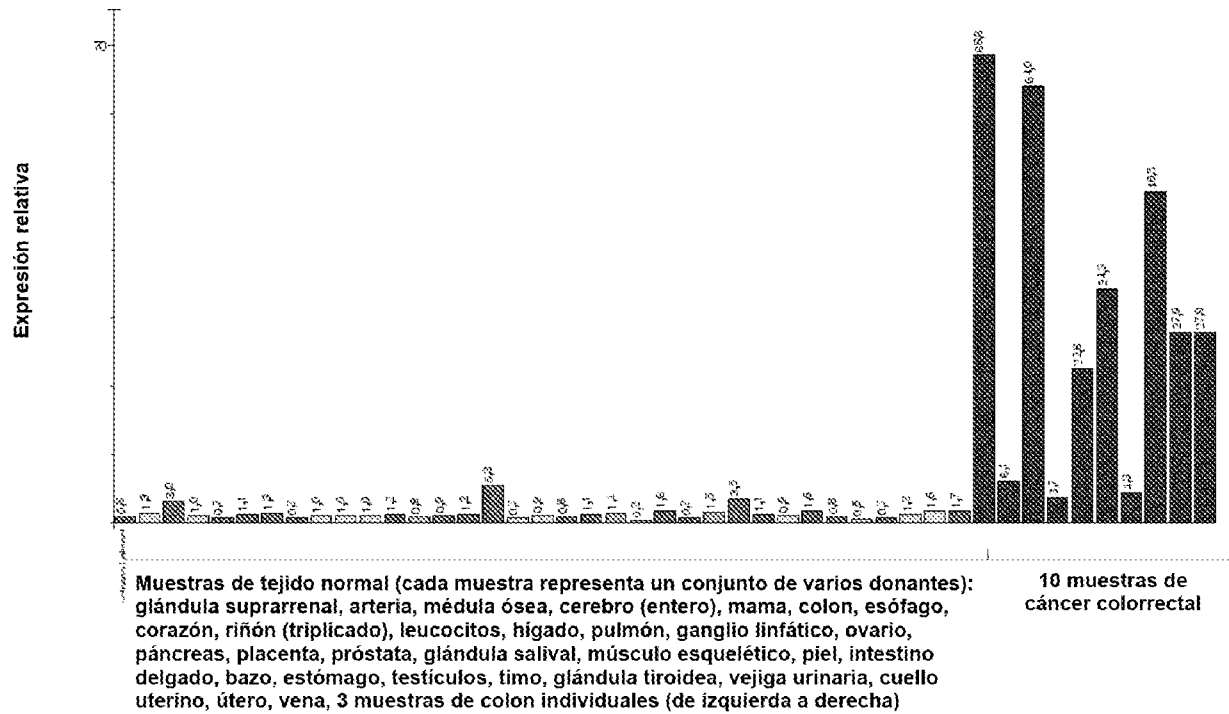


Figura 2C Gen: TTC30A

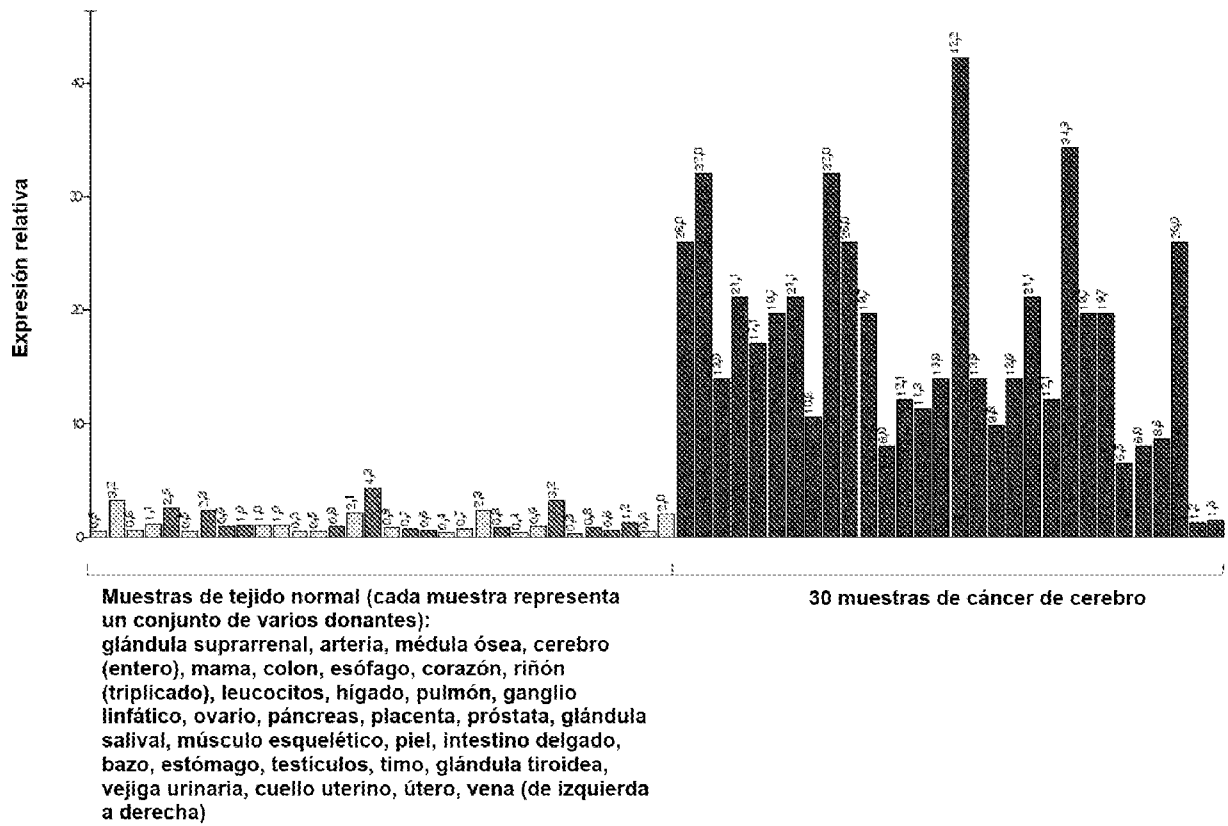


Figura 2D Gea: TRIP13

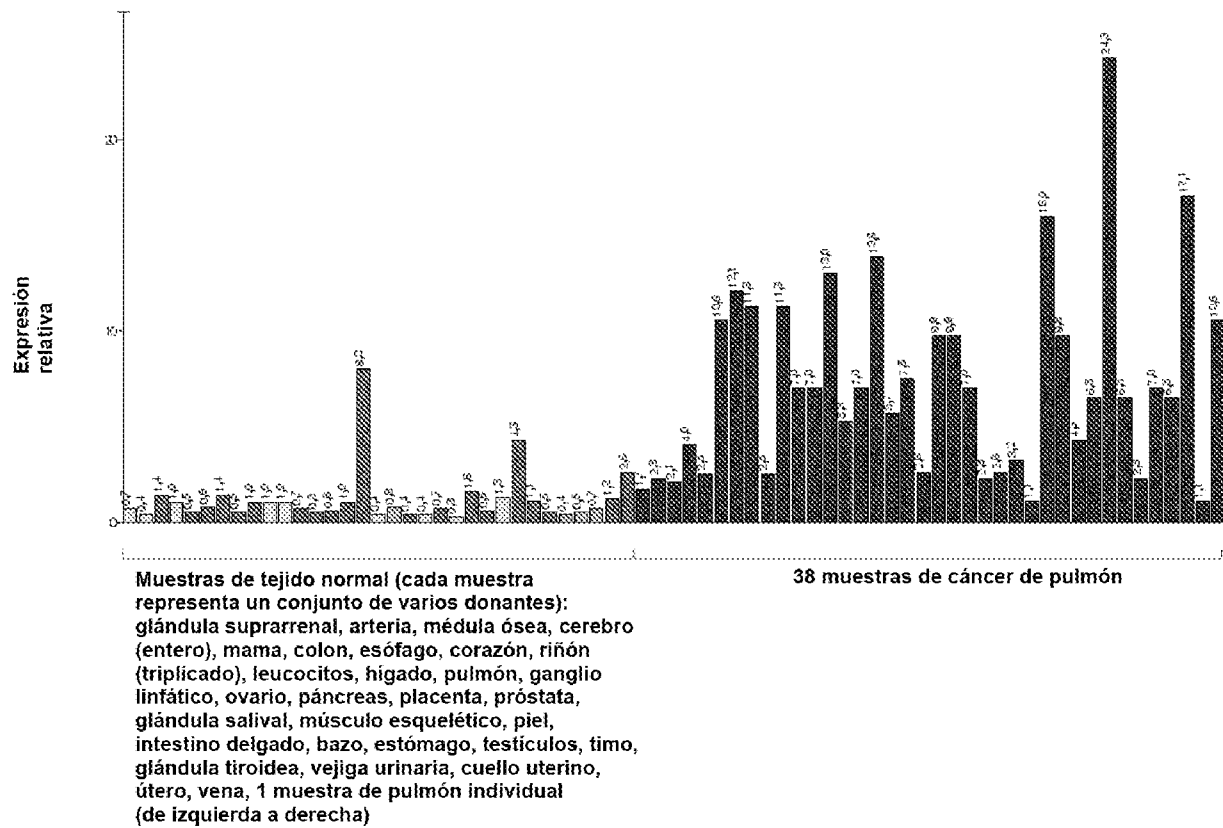


Figura 2E Gen: MXRA5

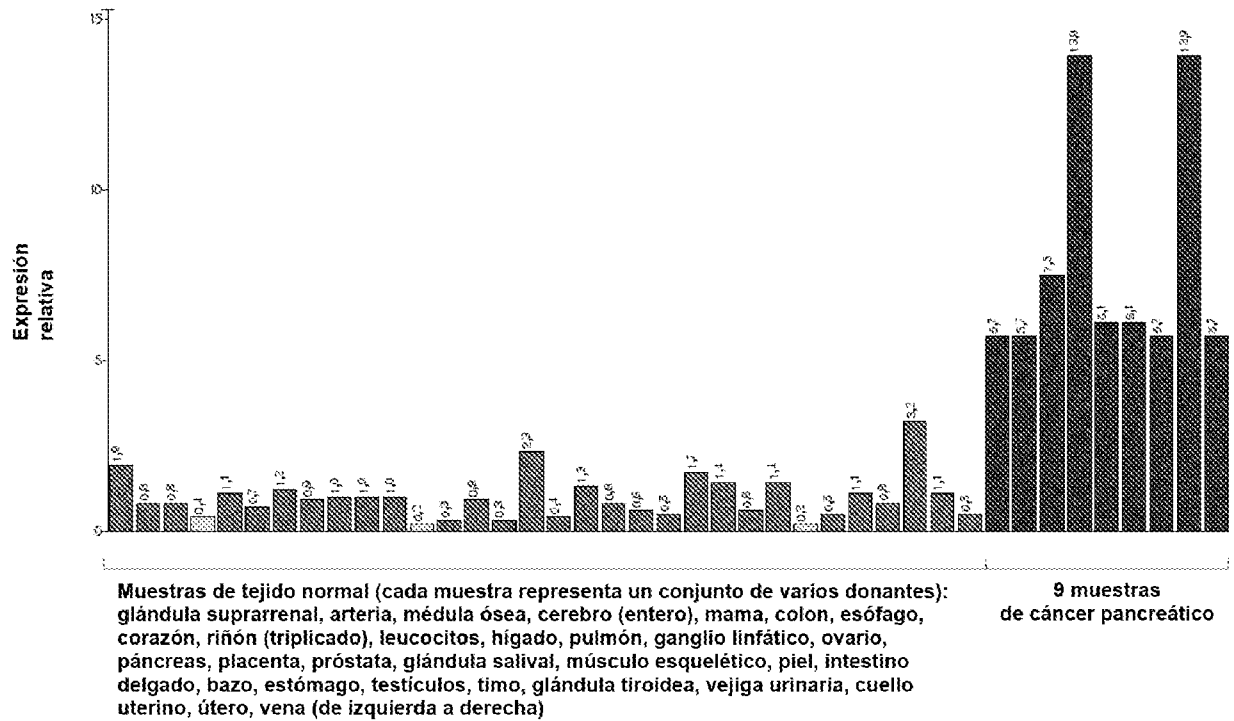


Figura 2F

Gen o genes: MMP11, MMP13

Péptido: KVVSDVTPL

SEQ ID: 24

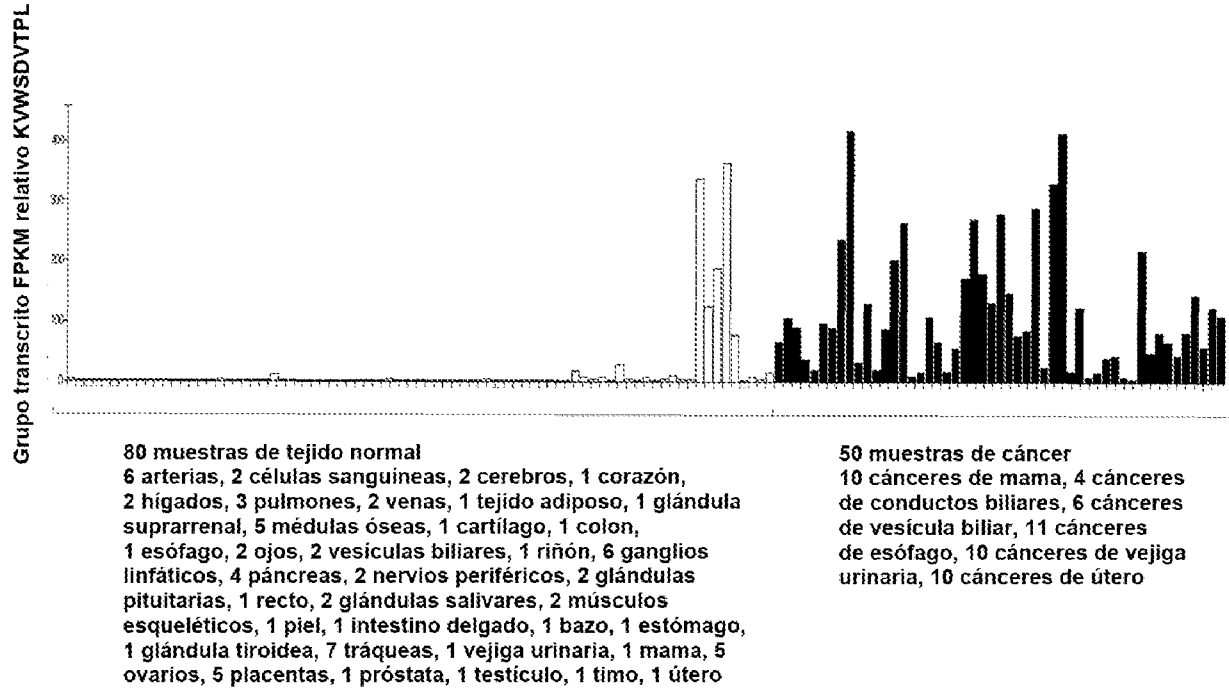


Figura 2G

Gen: HORMAD1

Péptido: VIFEGEPMYL

SEQ ID: 168

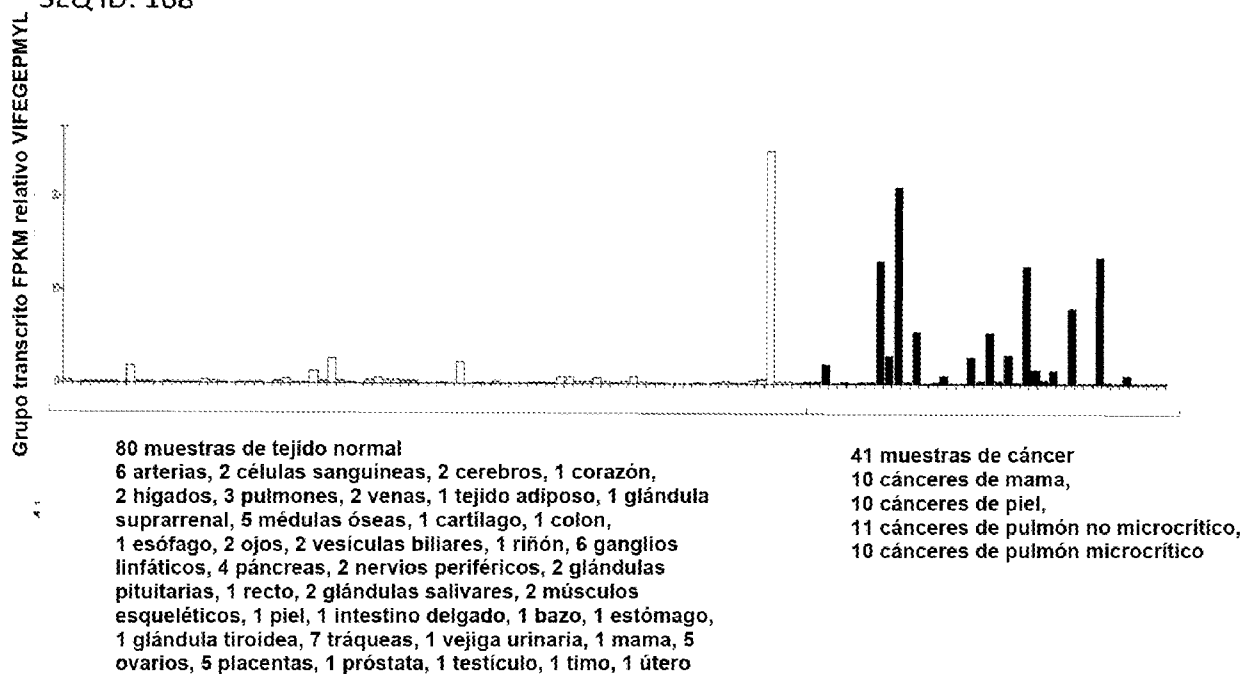


Figura 2H

Gen o genes: IGF2BP1, IGF2BP3

Péptido: TLYNPERTITV

SEQ ID: 274

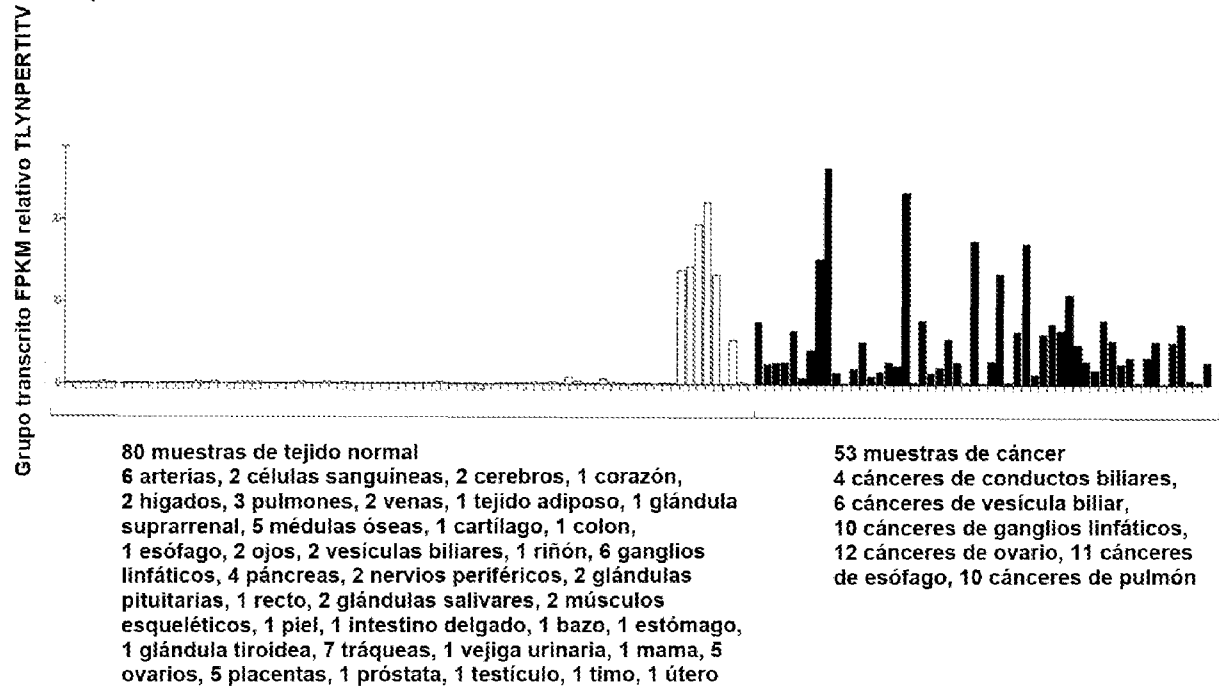
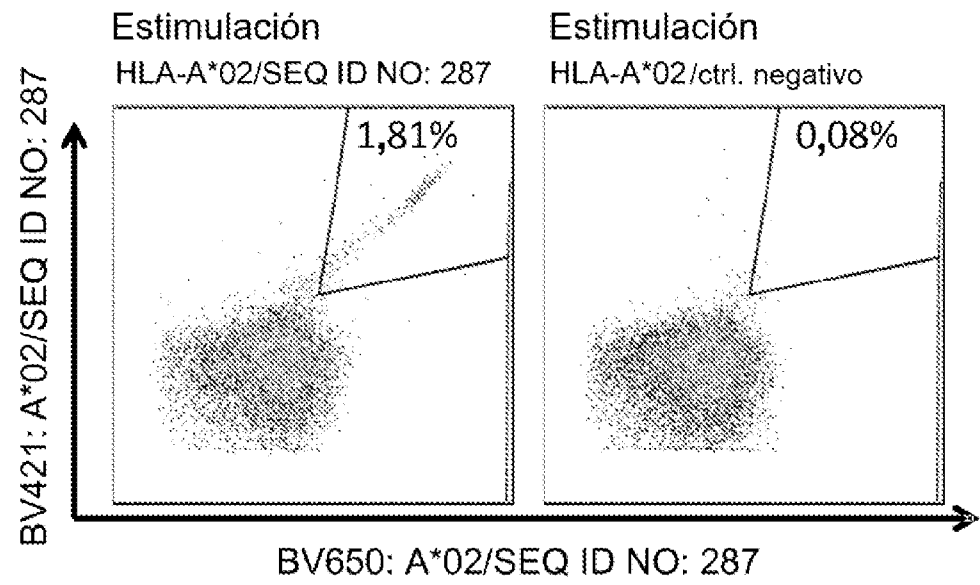


Figura 3

A



B

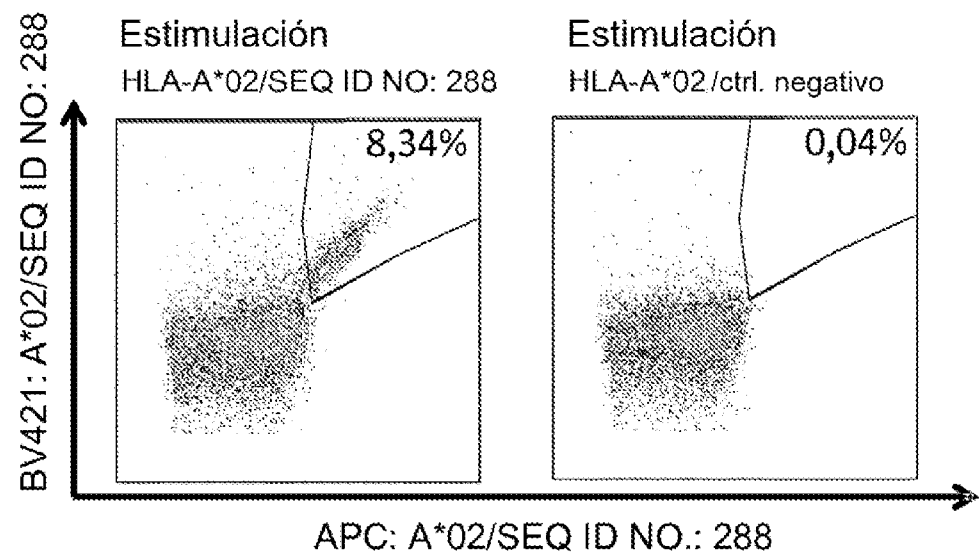
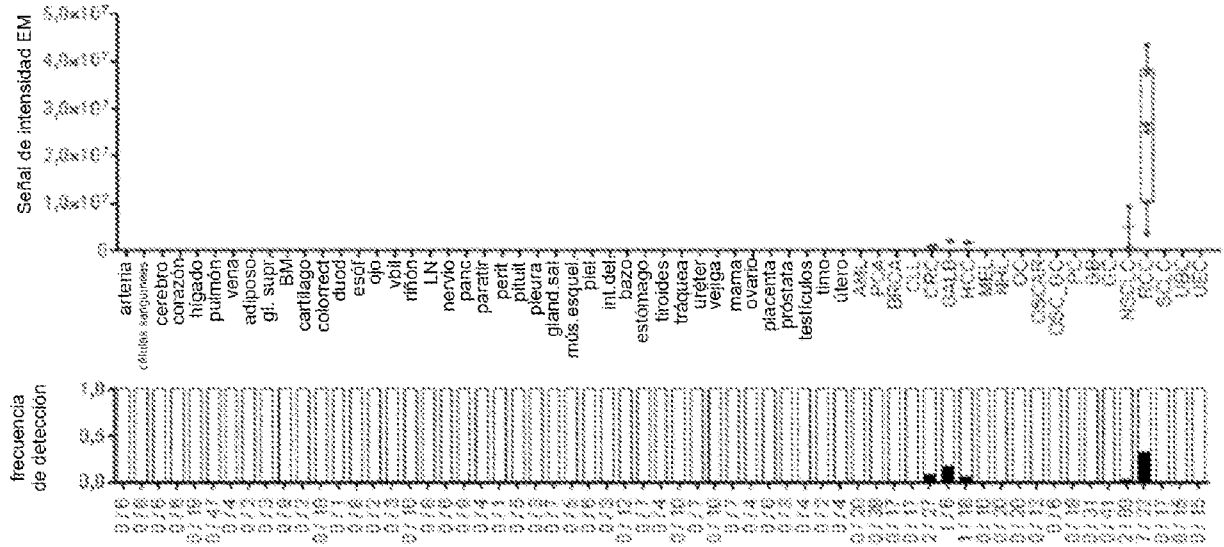


Figura 4A

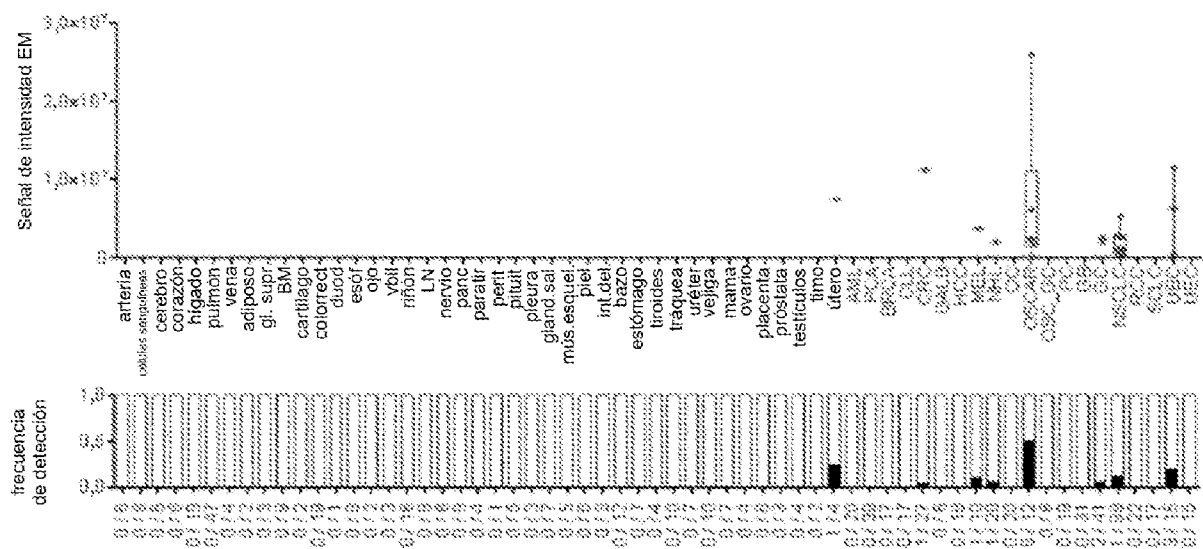
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4B

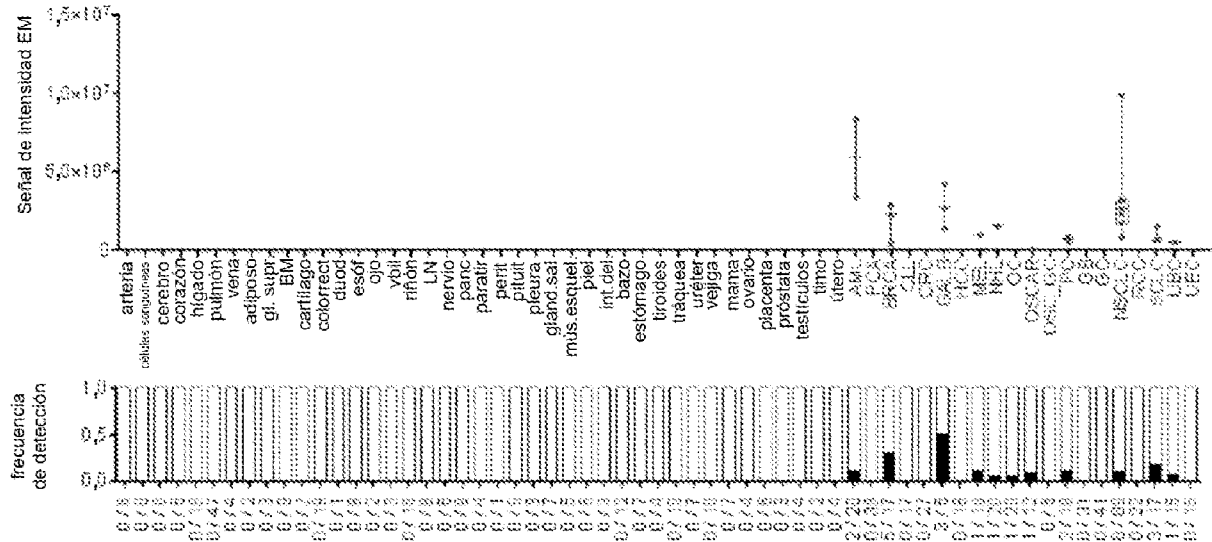
SEQ ID NO: 14: MMP1-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4C

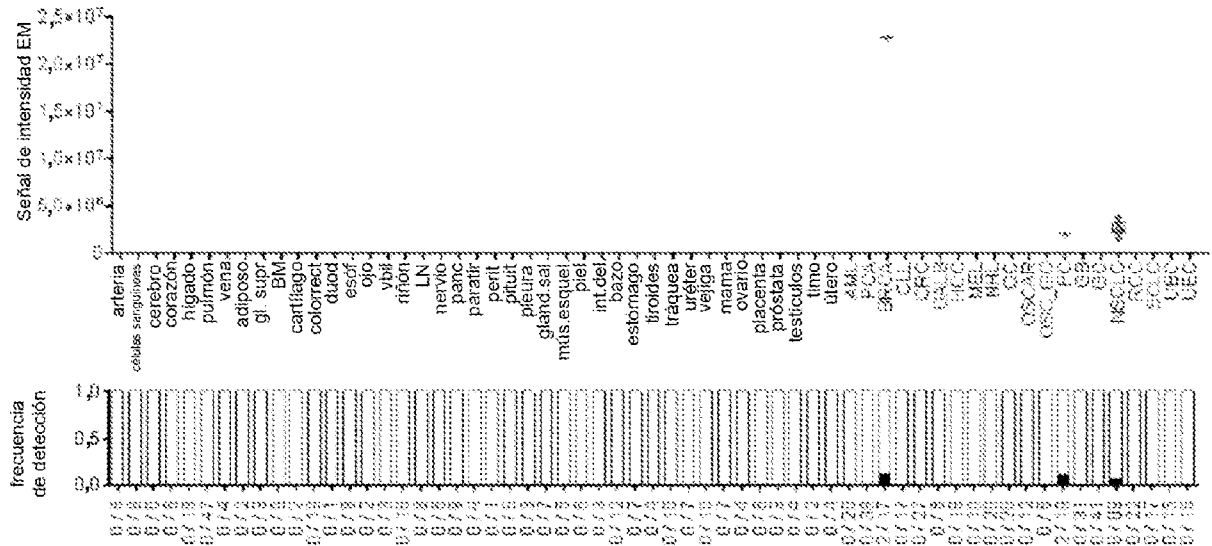
SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4D

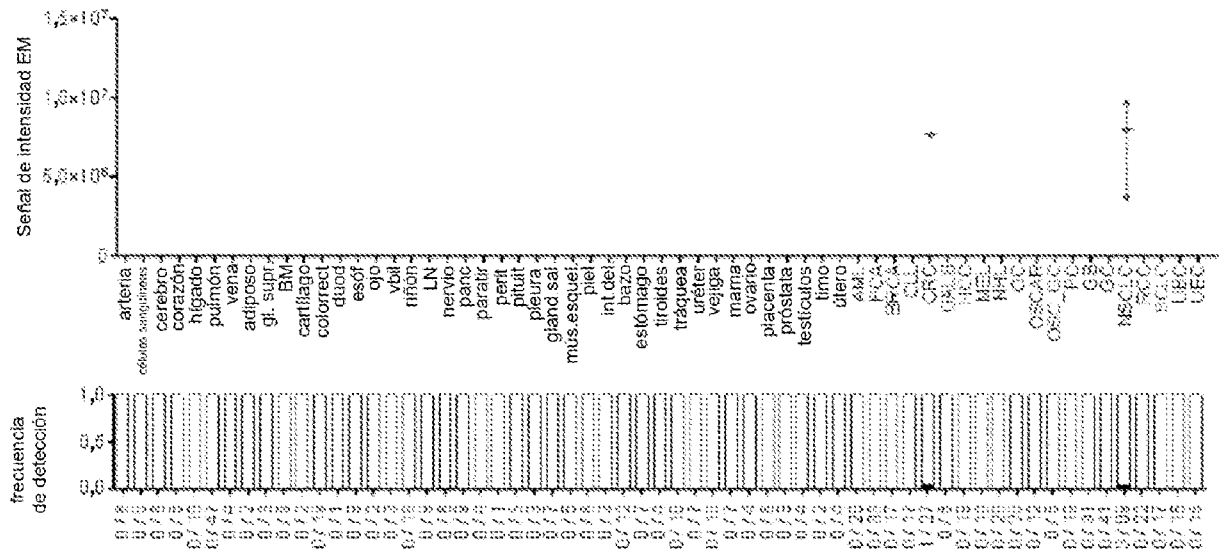
SEQ ID NO: 24: MMP-002



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4E

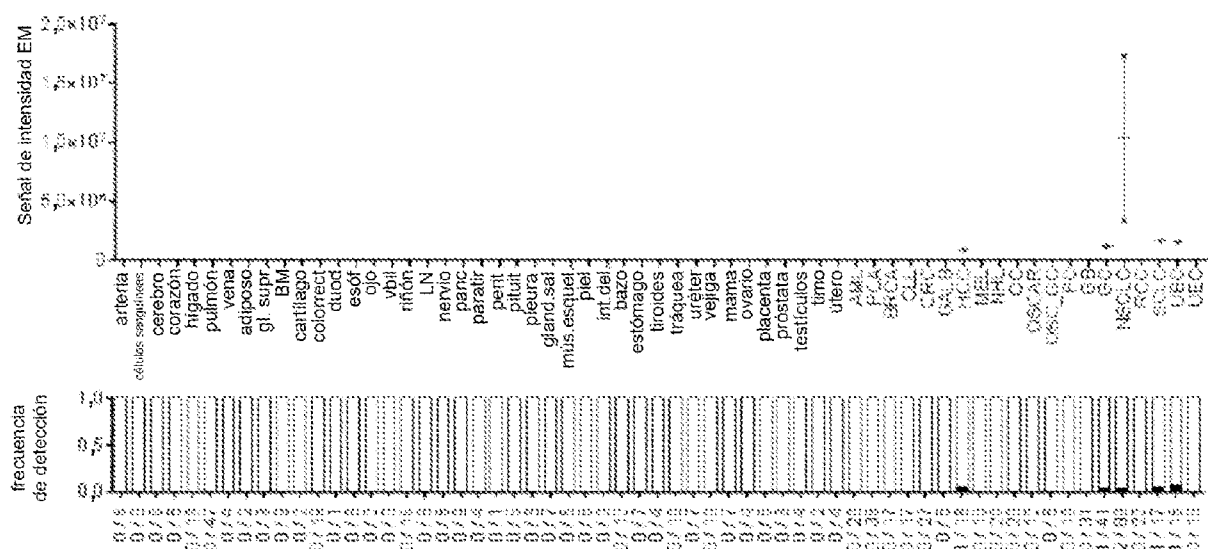
SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colon recto; duod.: duodeno; esóf.: esófago; vbil.: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4F

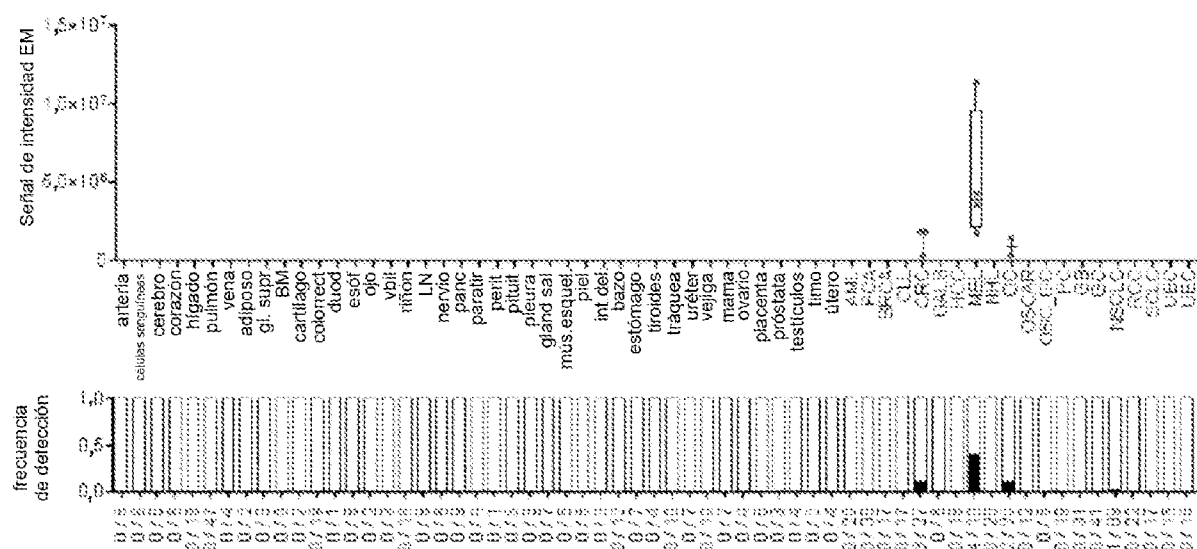
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4G

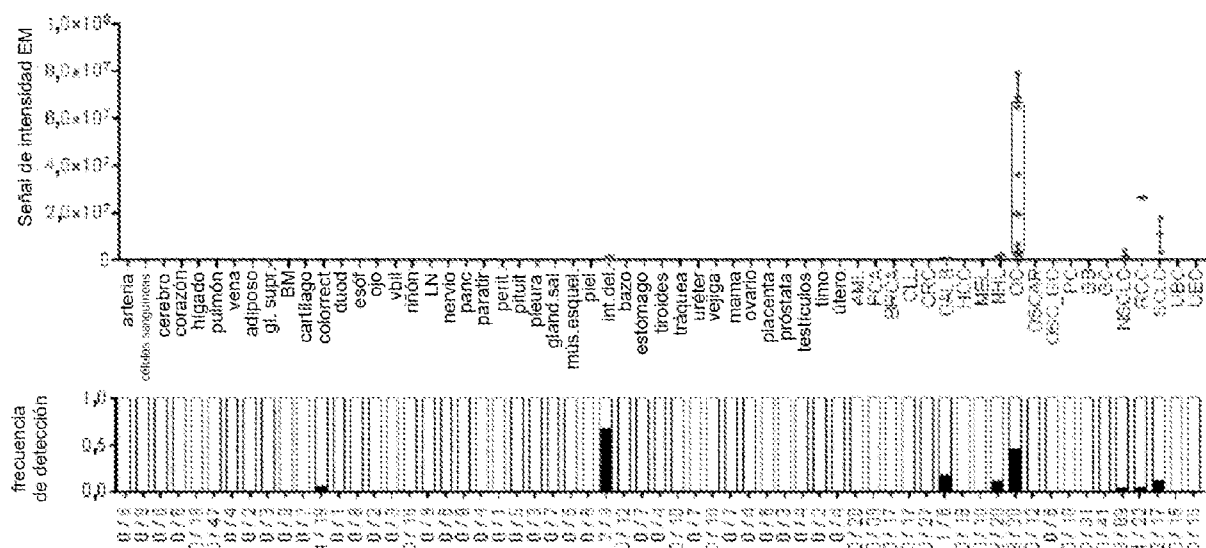
SEQ ID NO: 85: FMN1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4H

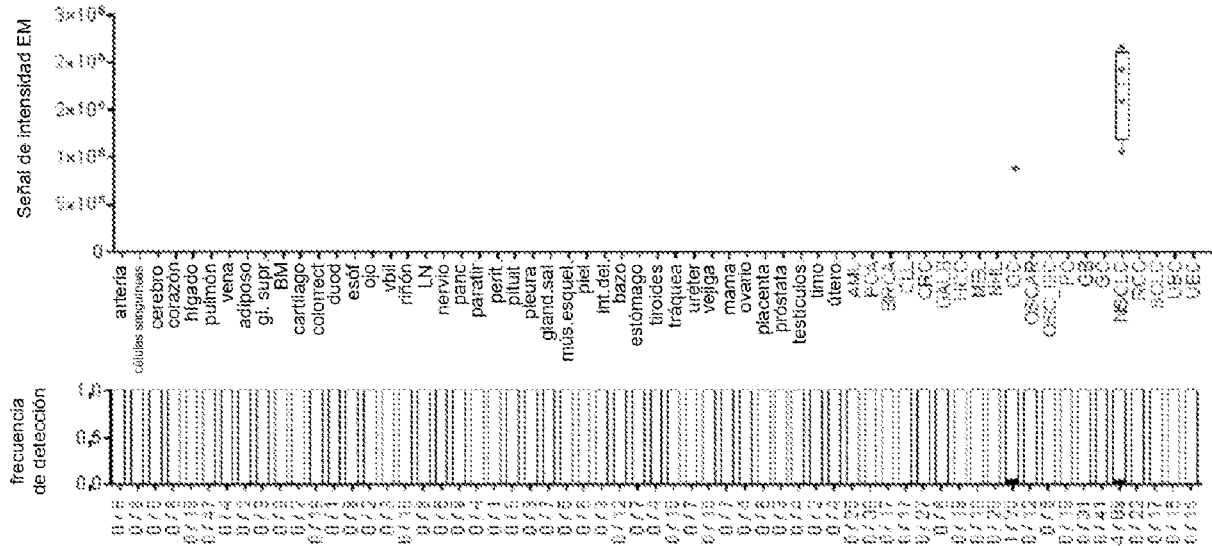
SEQ ID NO: 89: HTR3A-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4I

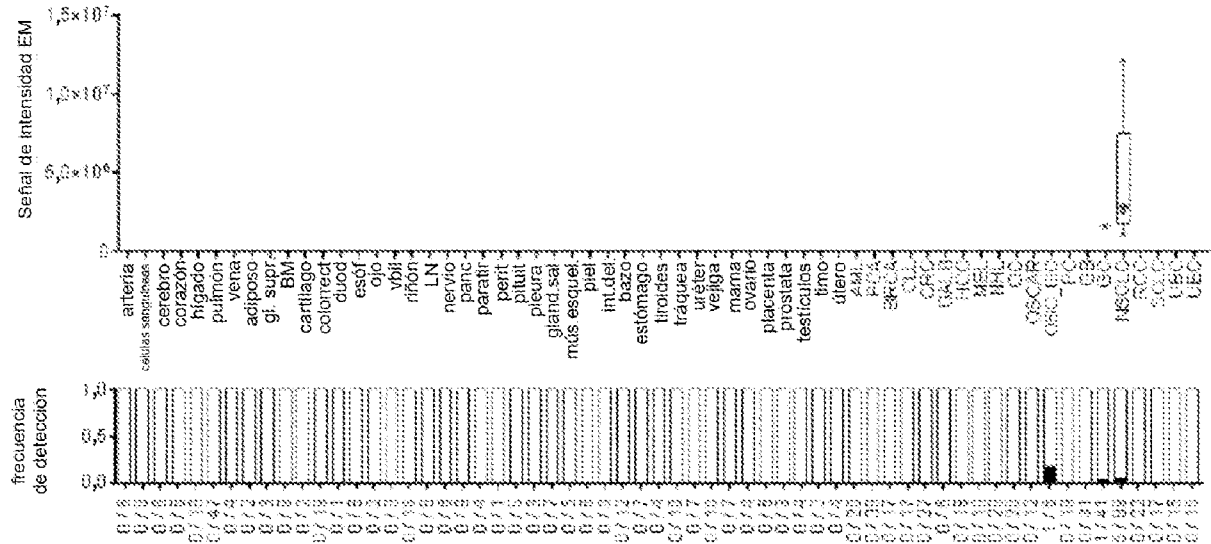
SEQ ID NO: 117; CABY-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4J

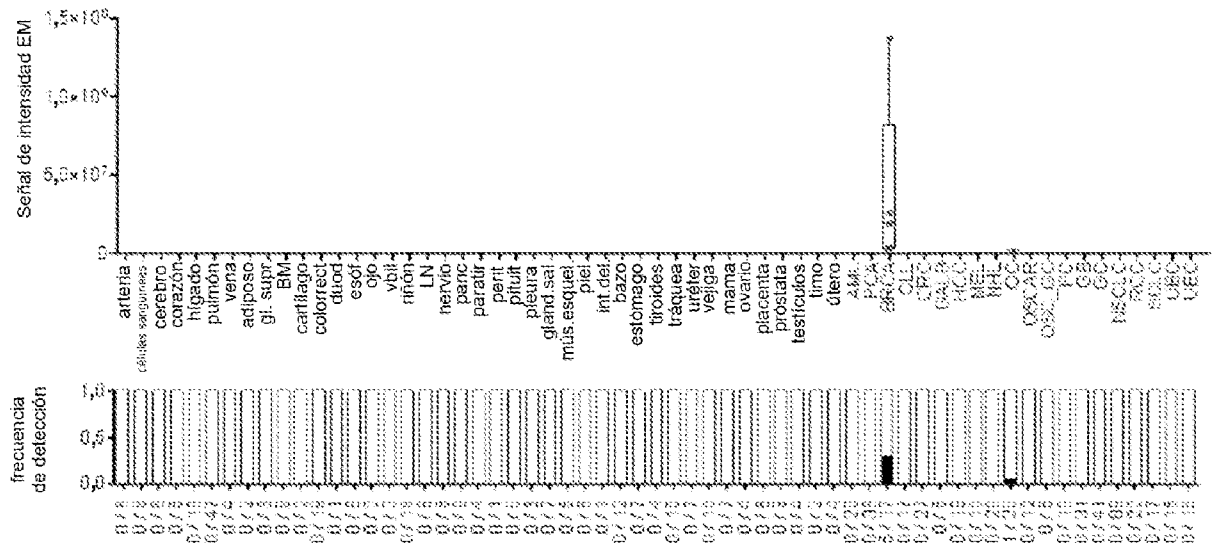
SEQ ID NO: 153: CT83-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4K

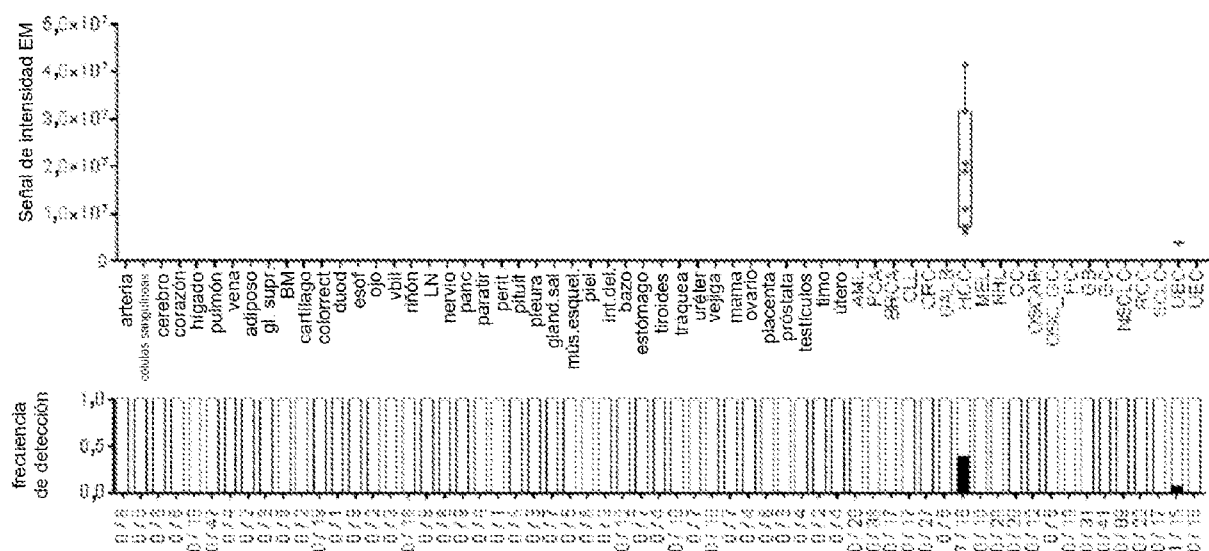
SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4L

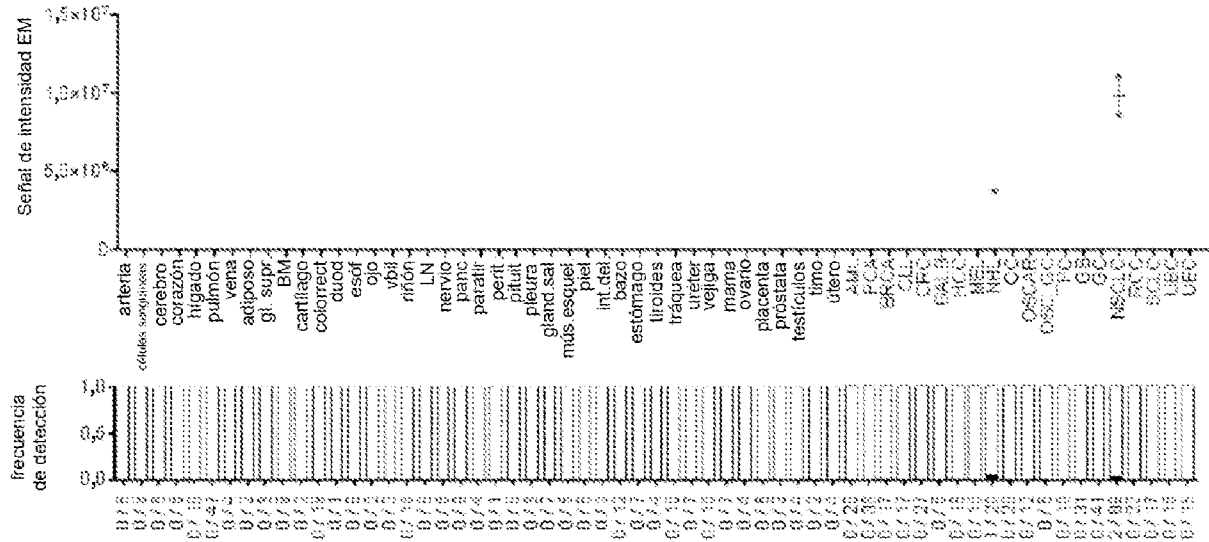
SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4M

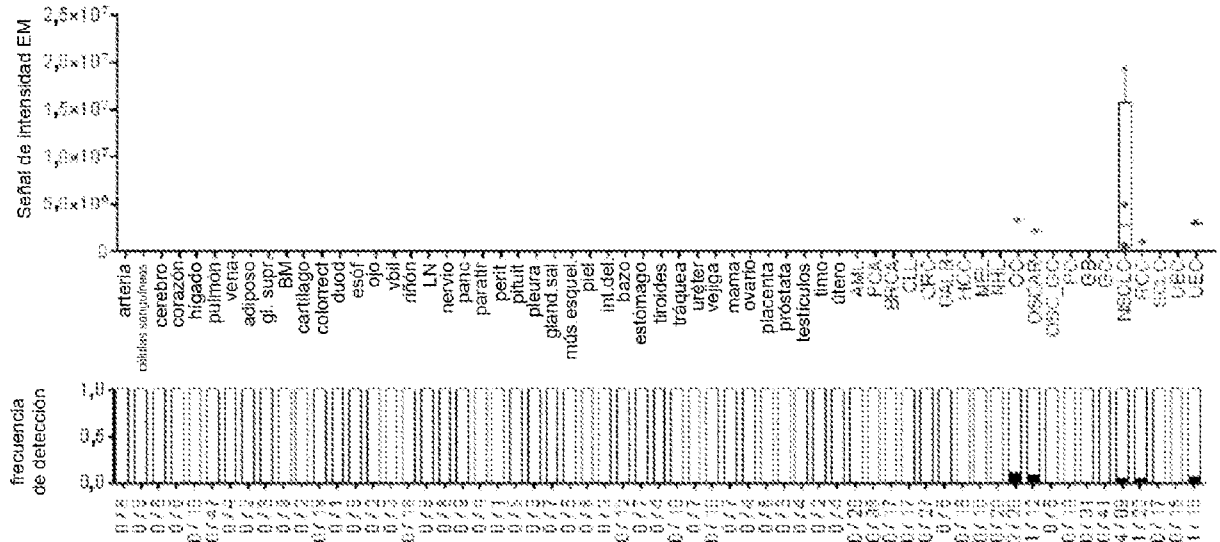
SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4N

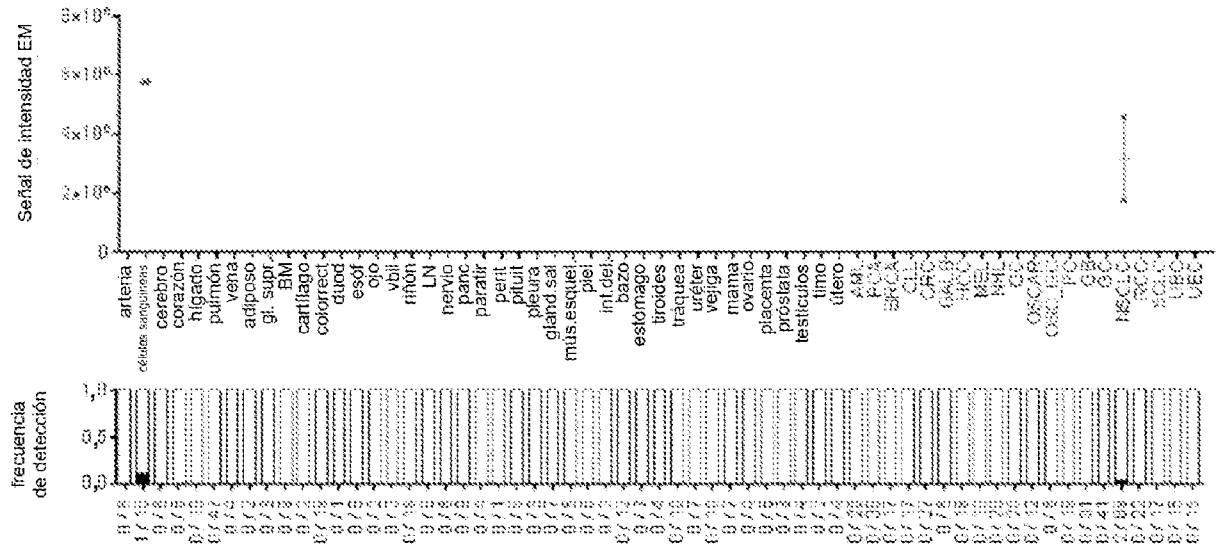
SEQ ID NO: 233: ZFP42-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gt. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 40

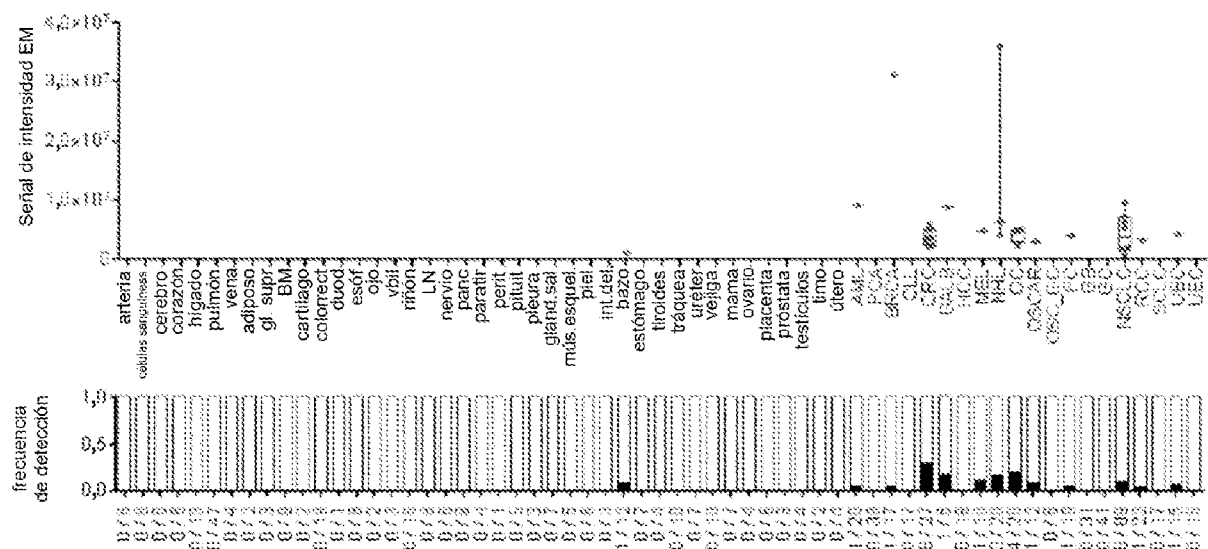
SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colorect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4P

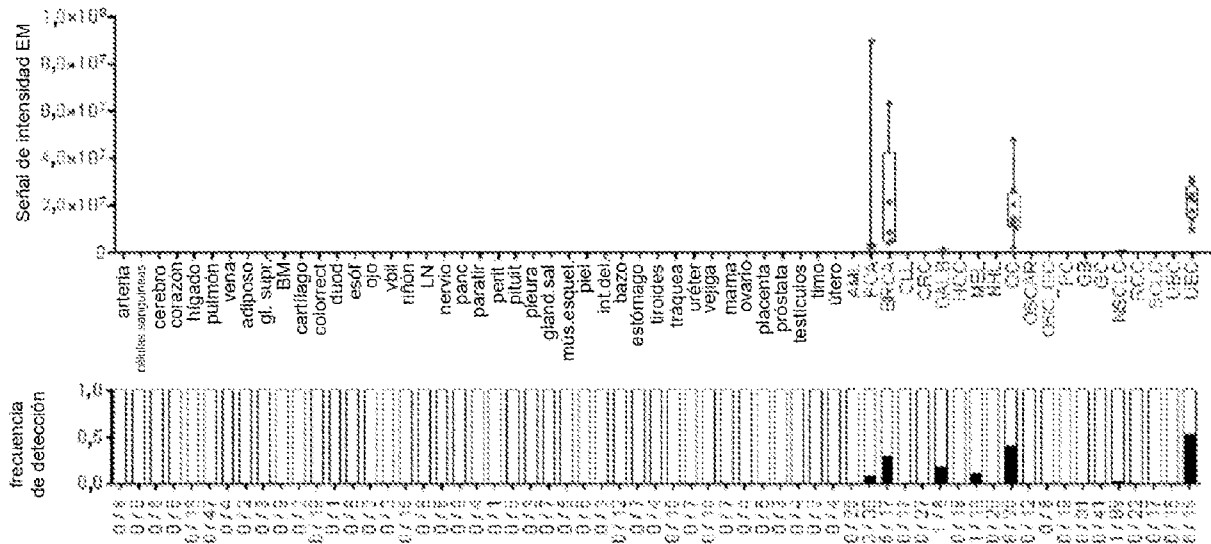
SEQ ID NO: 253: RAD54B-002



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colonect: colon y recto; duod: duodeno; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4Q

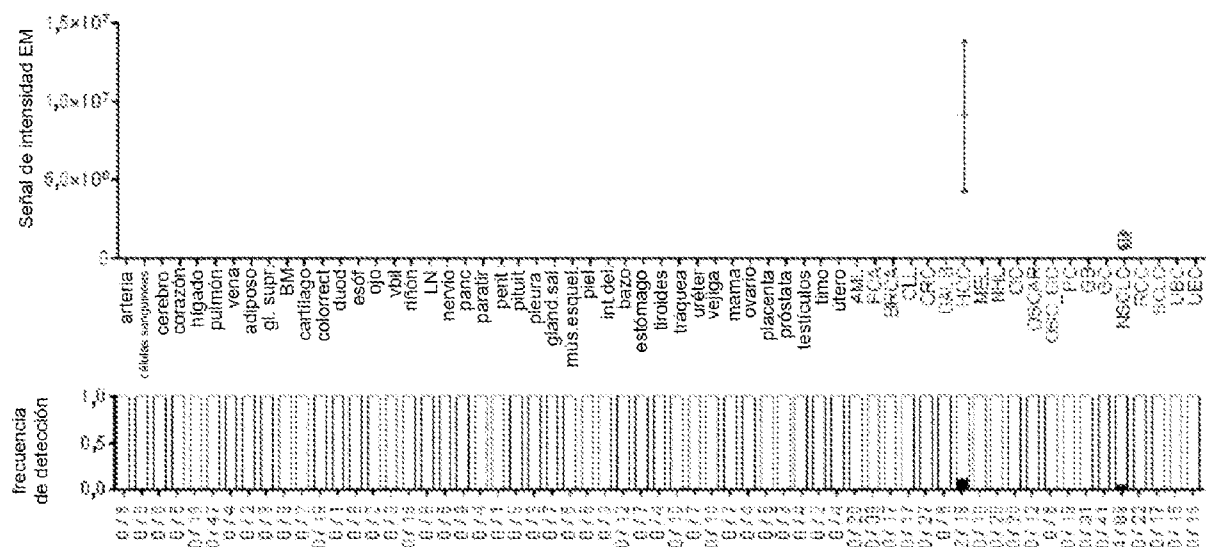
SEQ ID NO: 264: ESR1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colon recto; duod.: duodeno; esóf.: esófago; vbil.: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroidea; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 4R

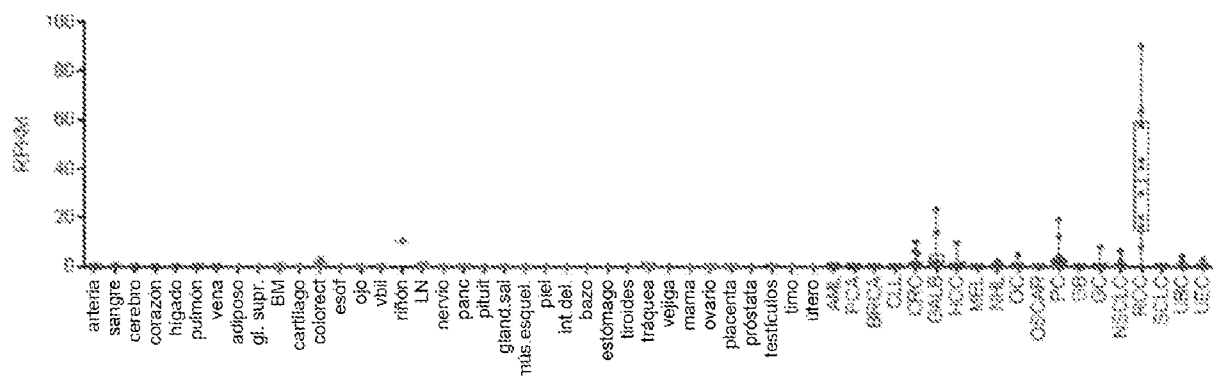
SEQ ID NO: 274: IGF-004



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; colon y recto; duod.: duodeno; esóf.: esófago; vbil: vesícula biliar; LN: ganglio linfático; panc: páncreas; paratir: glándula paratiroides; perit: peritoneo; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; uréter; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero. Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; OSC_GC; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5A

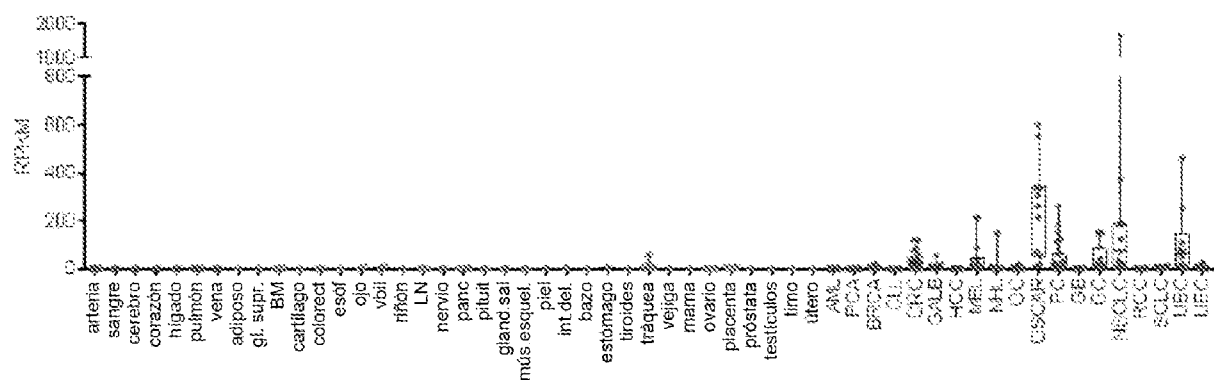
SEQ ID NO: 11: HAVCR1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5B

SEQ ID NO: 14: MMP1-003

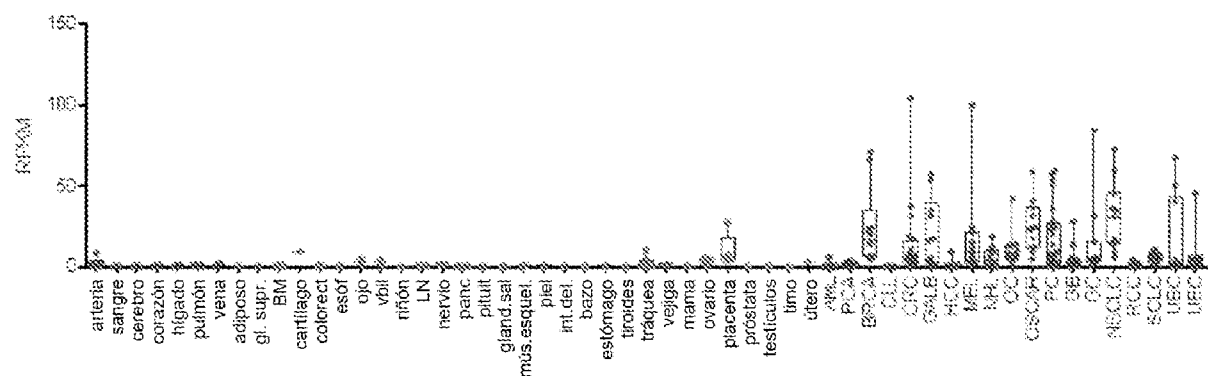


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5C

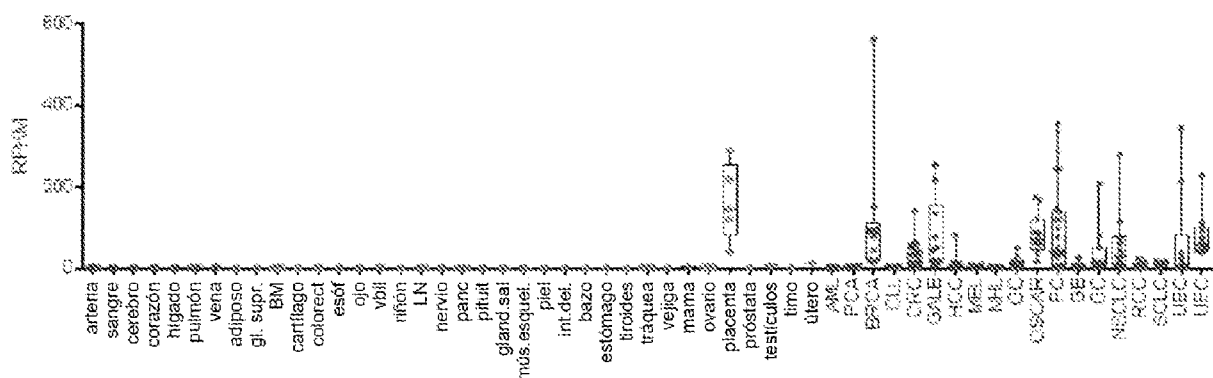
SEQ ID NO: 21: COL6A3-015



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5D

SEQ ID NO: 24: MMP-002

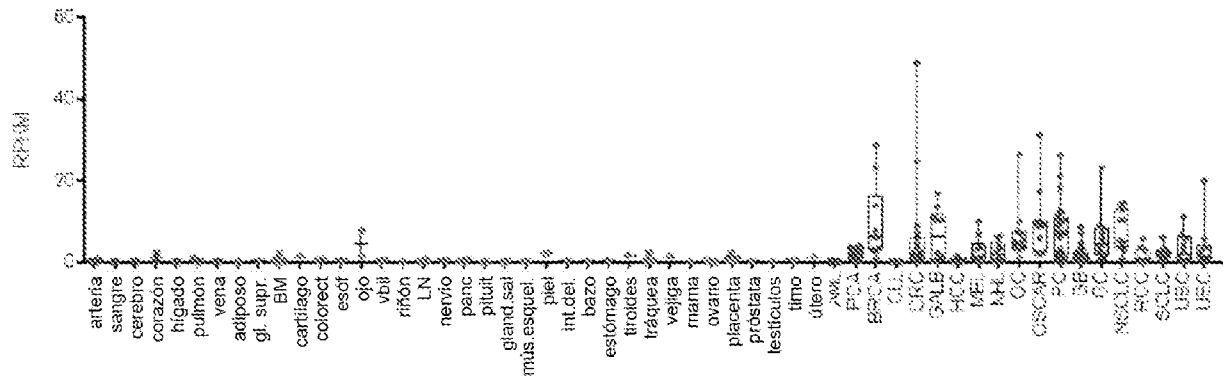


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5E

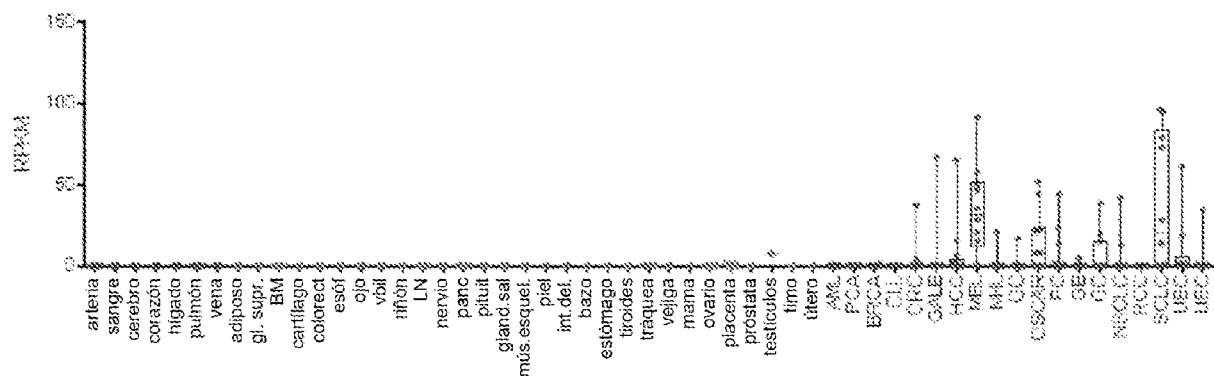
SEQ ID NO: 25: MXRA5-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5F

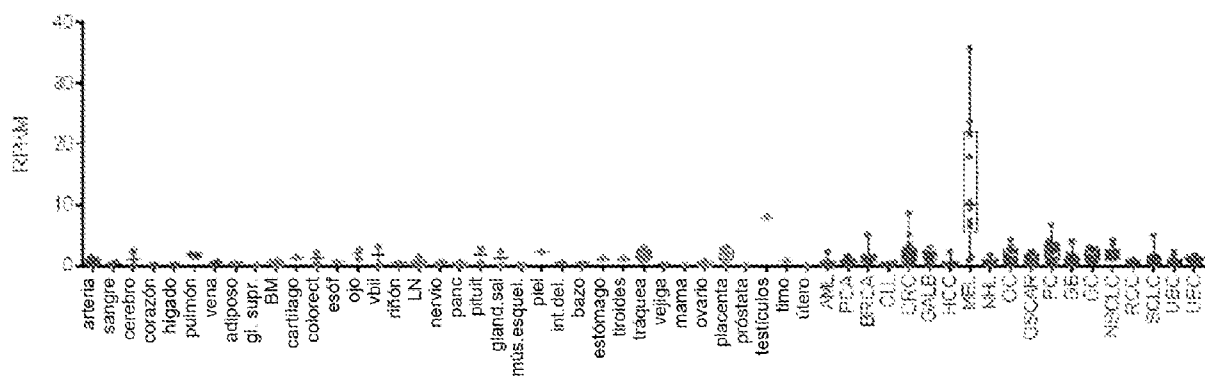
SEQ ID NO: 40: MAGEA3-003



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5G

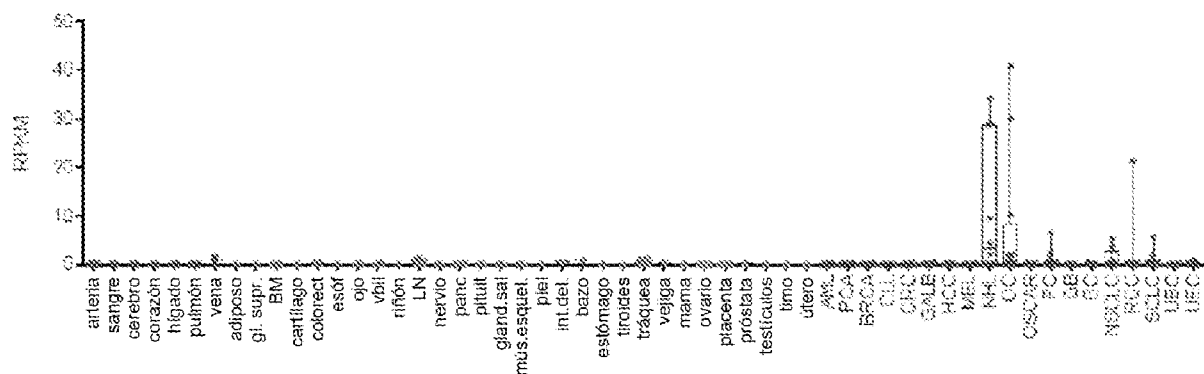
SEQ ID NO: 85: FMN1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
 Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5H

SEQ ID NO: 89: HTR3A-001

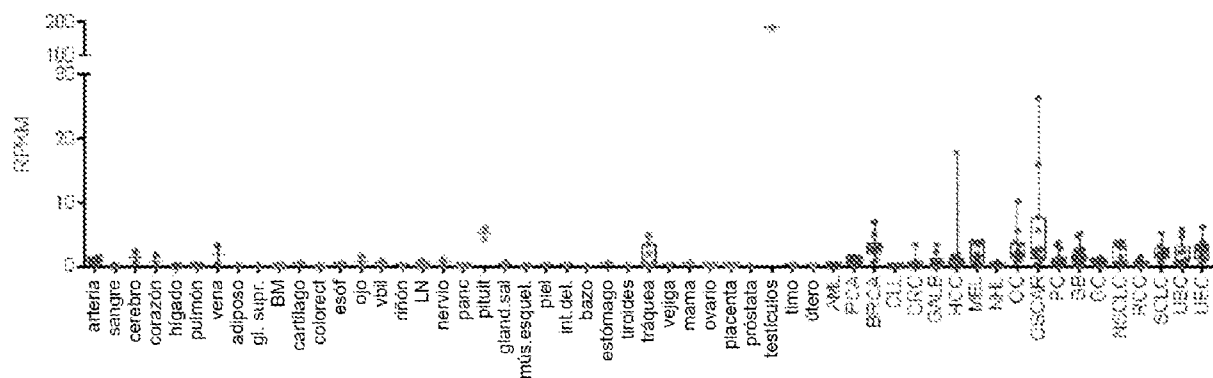


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5I

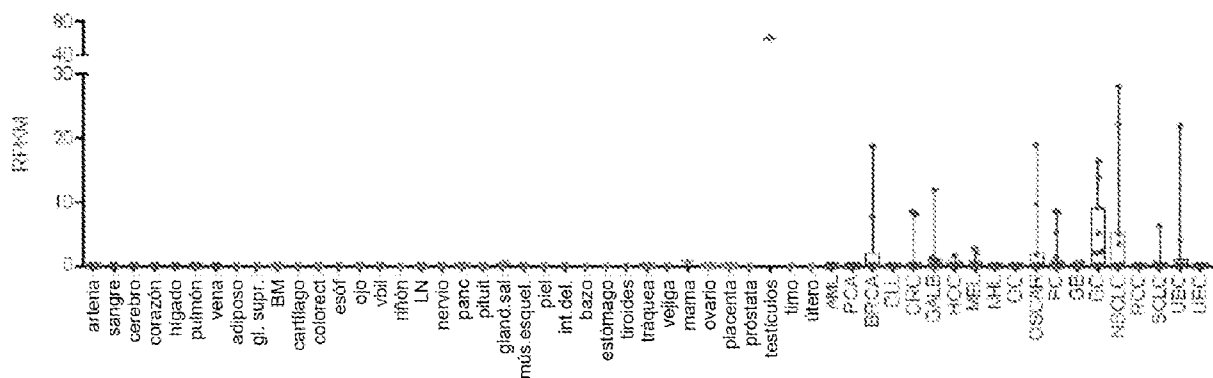
SEQ ID NO: 117: CABY-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5J

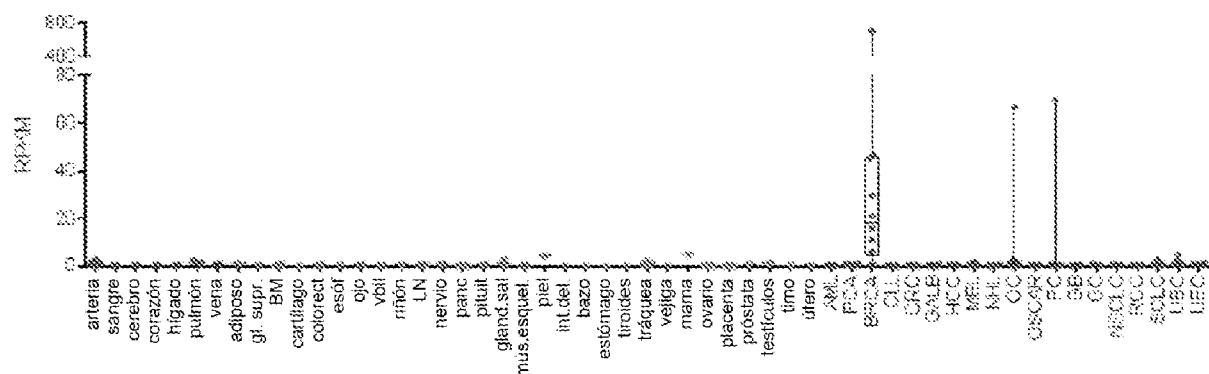
SEQ ID NO: 153: CT83-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5K

SEQ ID NO: 155: CYP4Z-001

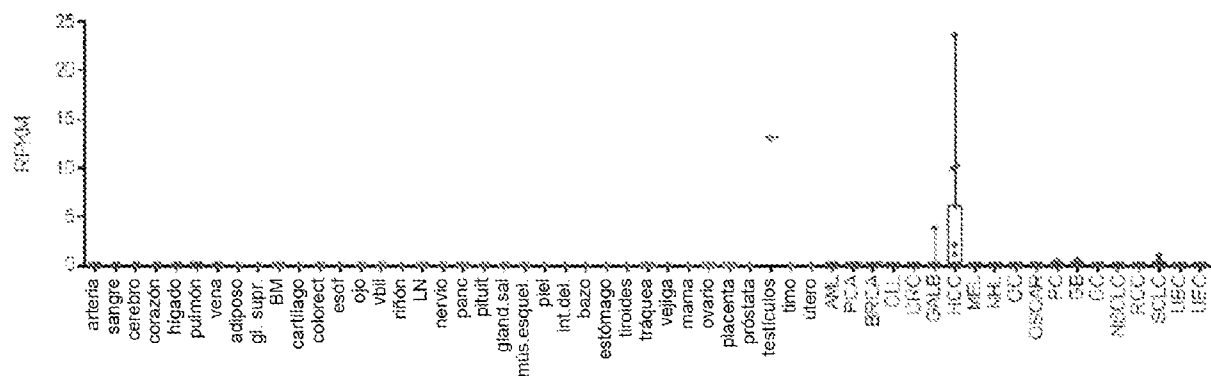


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5L

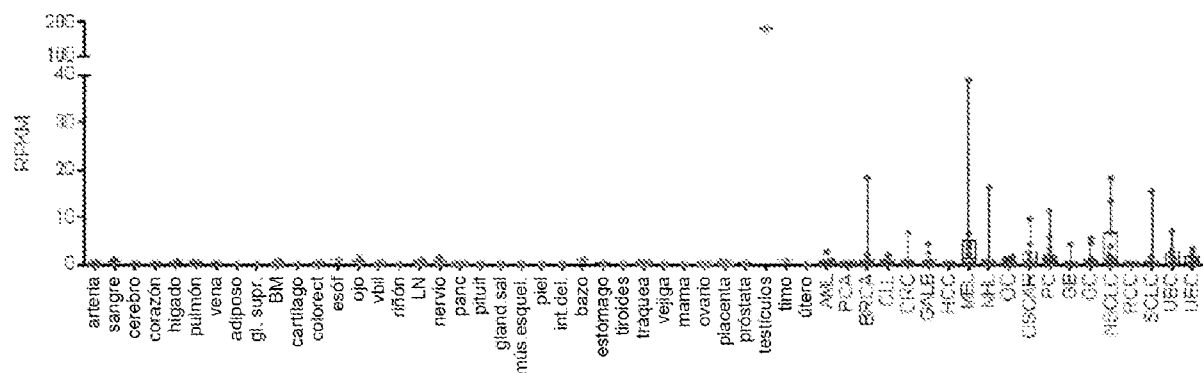
SEQ ID NO: 157: DCAF4L2-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf.: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5M

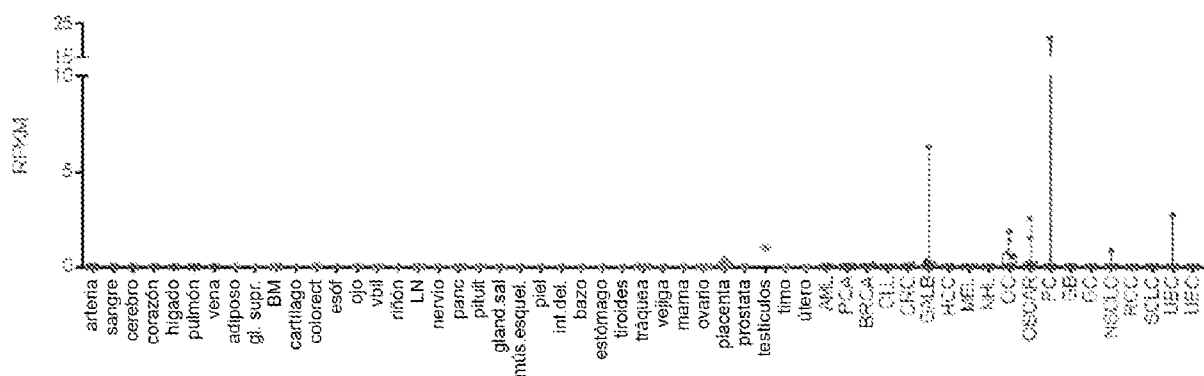
SEQ ID NO: 168: HORMAD1-001



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5N

SEQ ID NO: 233: ZFP42-001

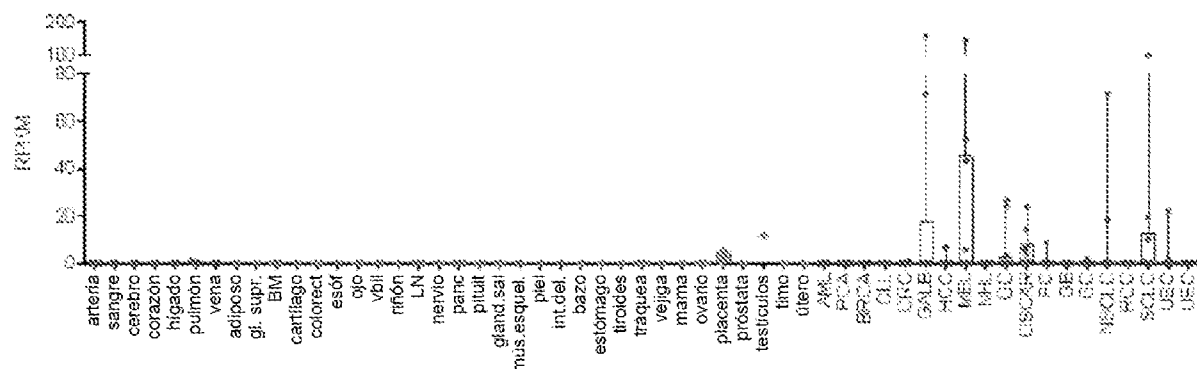


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf.: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 50

SEQ ID NO: 245: MAGEA4-003

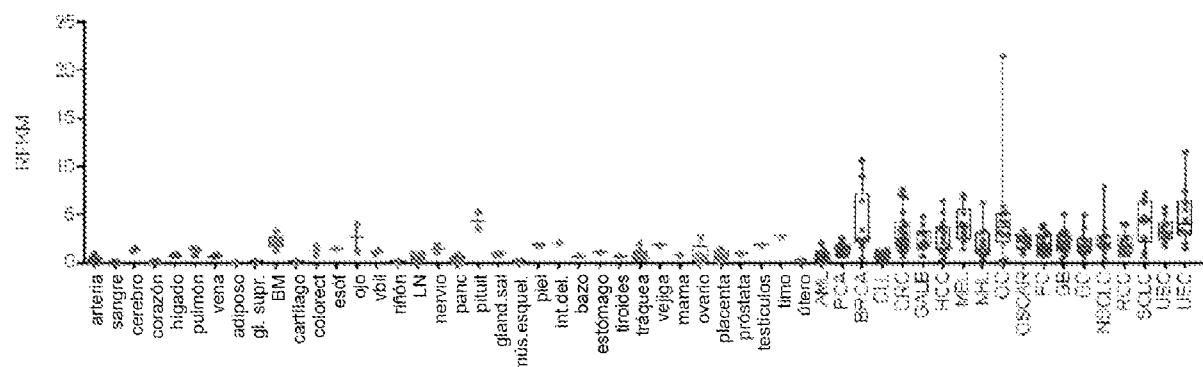


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5P

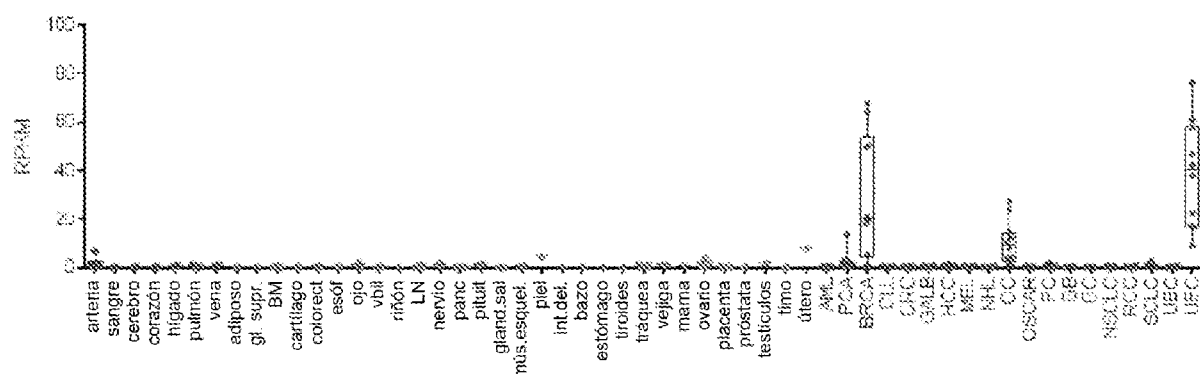
SEQ ID NO: 253: RAD54B-002



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
 Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5Q

SEQ ID NO: 264; ESR1-001

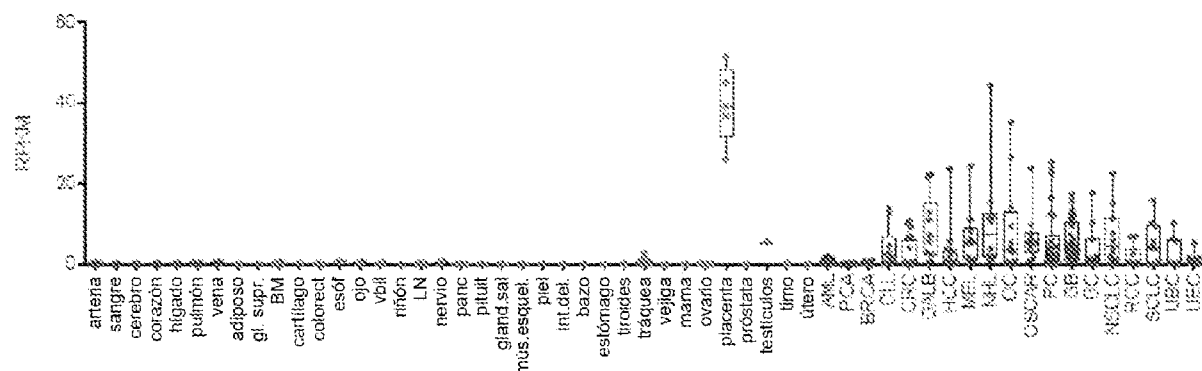


Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo: tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero

Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 5R

SEQ ID NO: 274: IGF-004



Tejidos (de izquierda a derecha): Muestras normales: arteria; células sanguíneas; cerebro; corazón; hígado; pulmón; vena; adiposo; tejido adiposo; gl. supr.: glándula suprarrenal; BM: médula ósea; cartilago; colorect: colon y recto; esóf: esófago; vbil: vesícula biliar; riñón; LN: ganglio linfático; nervio; panc: páncreas; pituit: pituitaria; gland.sal: glándula salival; mús.esquel.: músculo esquelético; piel; int.del.: intestino delgado; bazo; estómago; tiroides; tráquea; vejiga; mama; ovario; placenta; próstata; testículos; timo; útero
 Muestras de tumor: AML; PCA; BRCA; CLL; CRC; GALB; HCC; MEL; NHL; OC; OSCAR; PC; GB; GC; NSCLC; RCC; SCLC; UBC; UEC

Figura 6

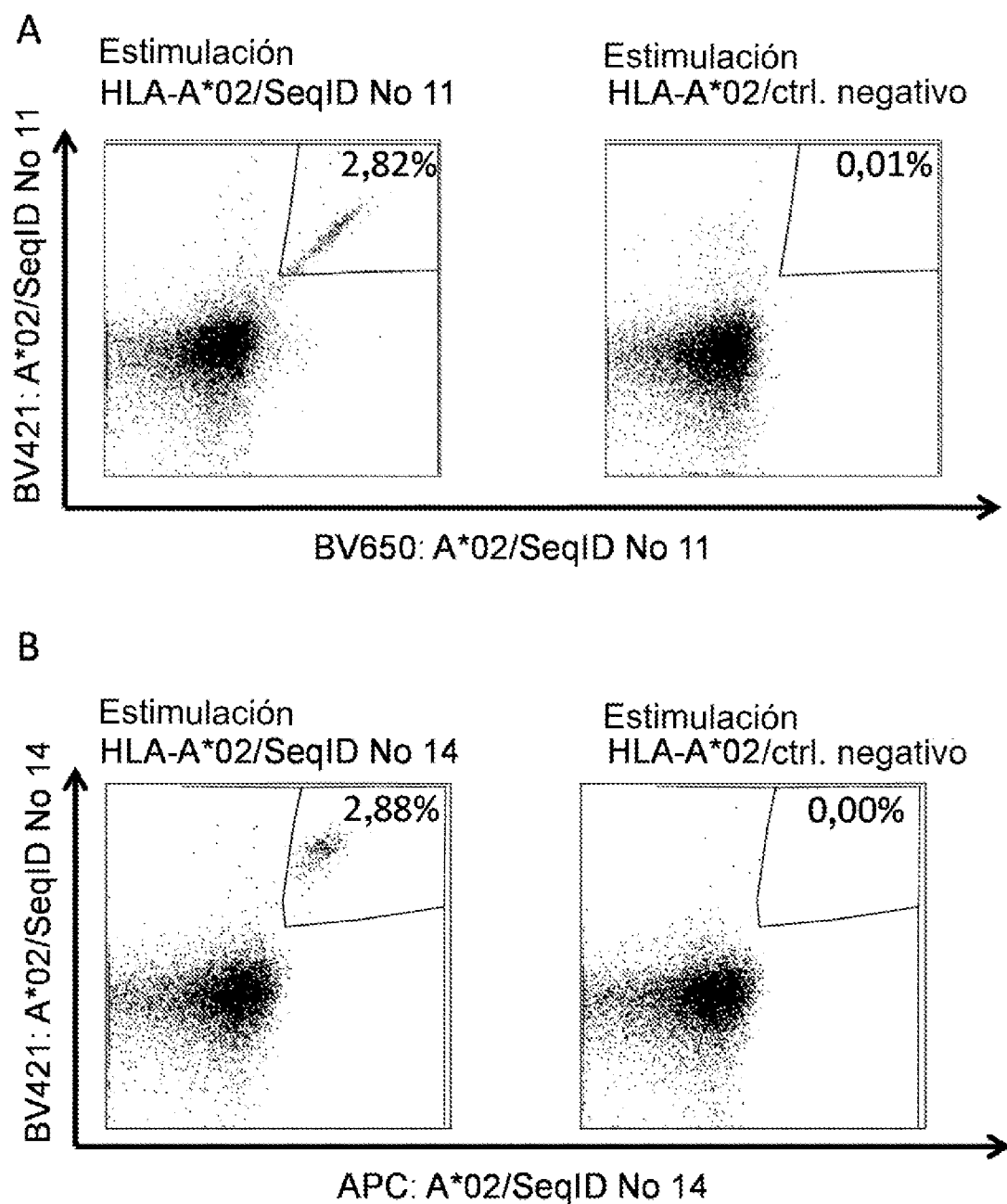


Figura 6 (continuación)

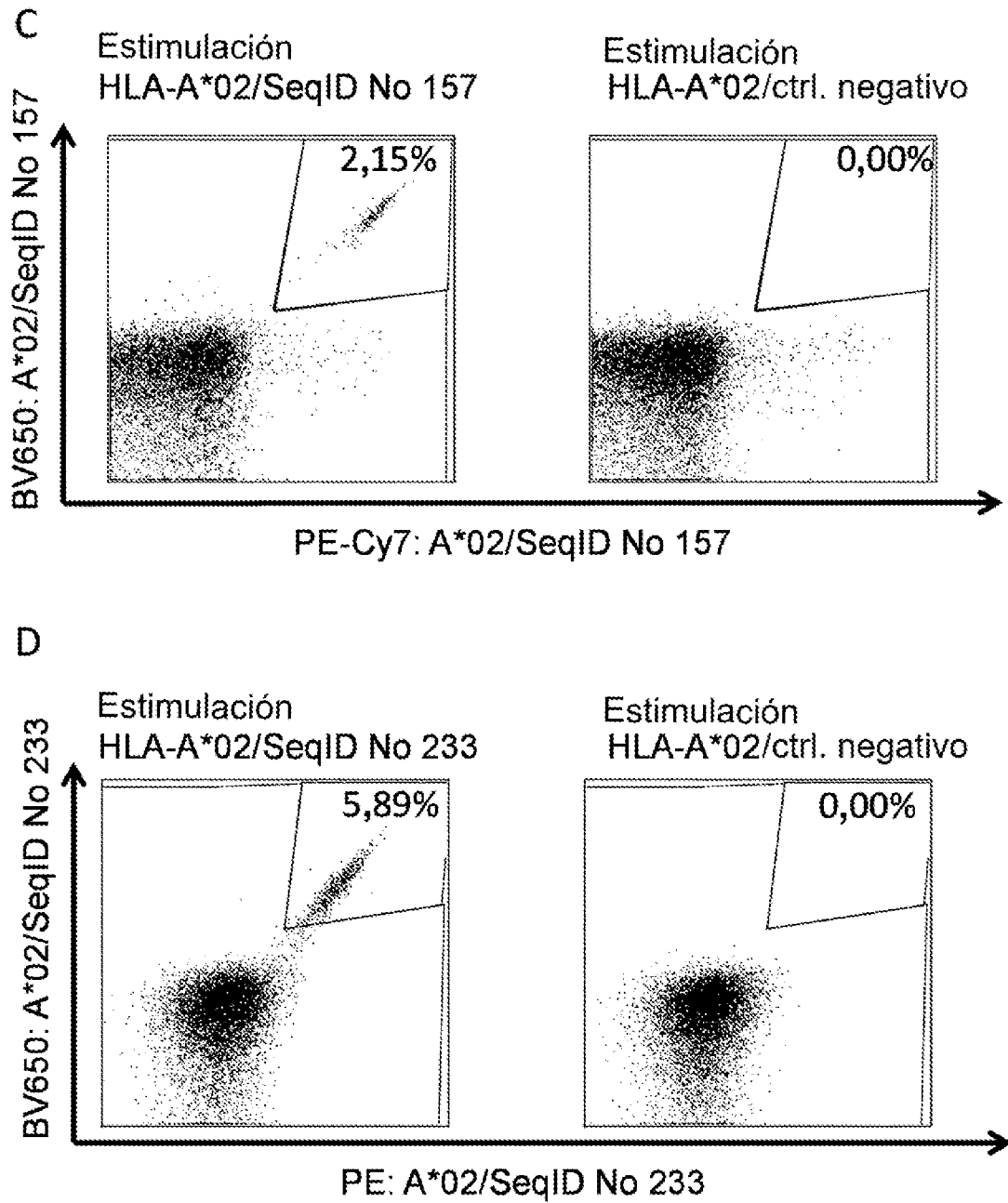


Figura 6 (continuación)

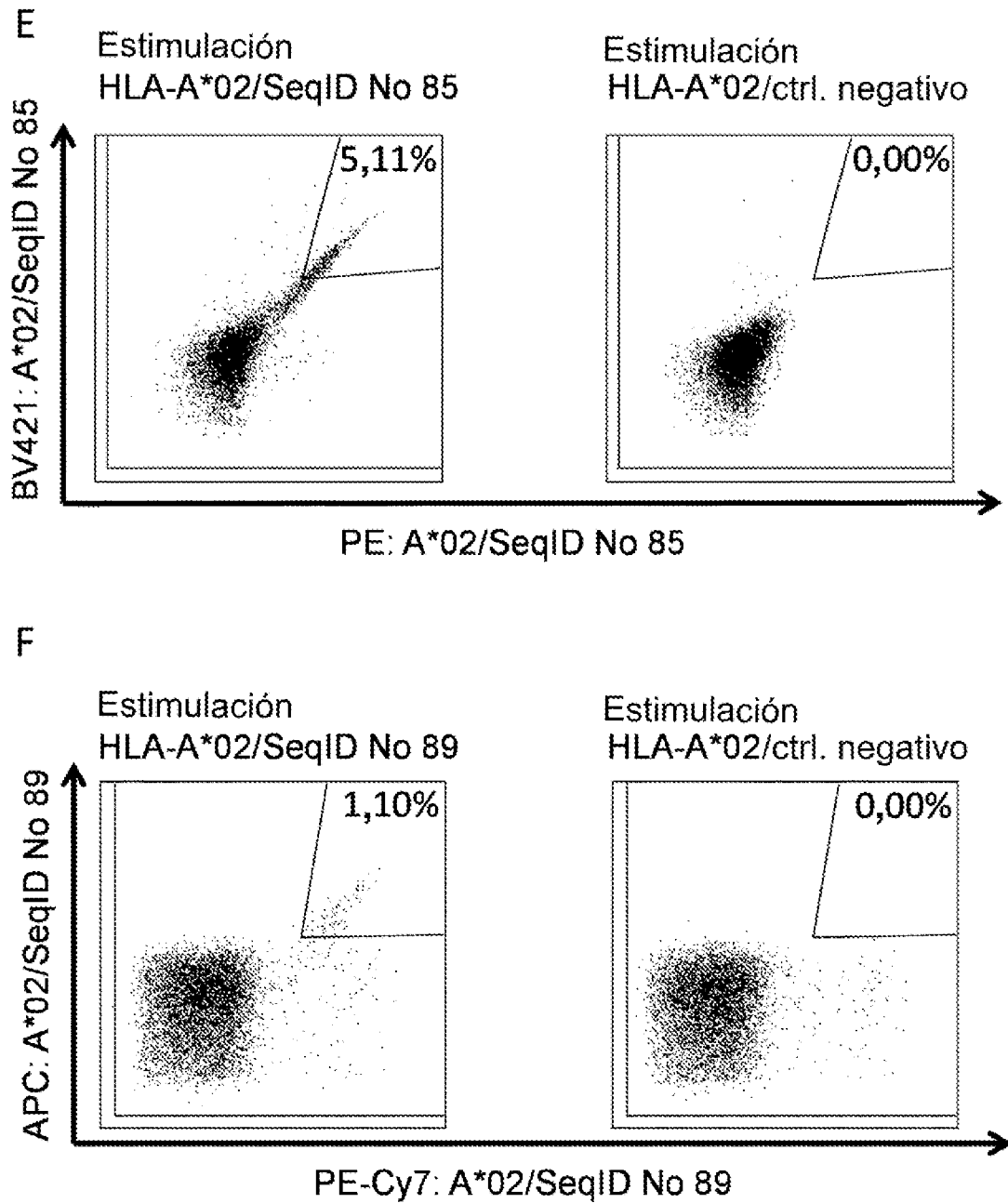


Figura 6 (continuación)

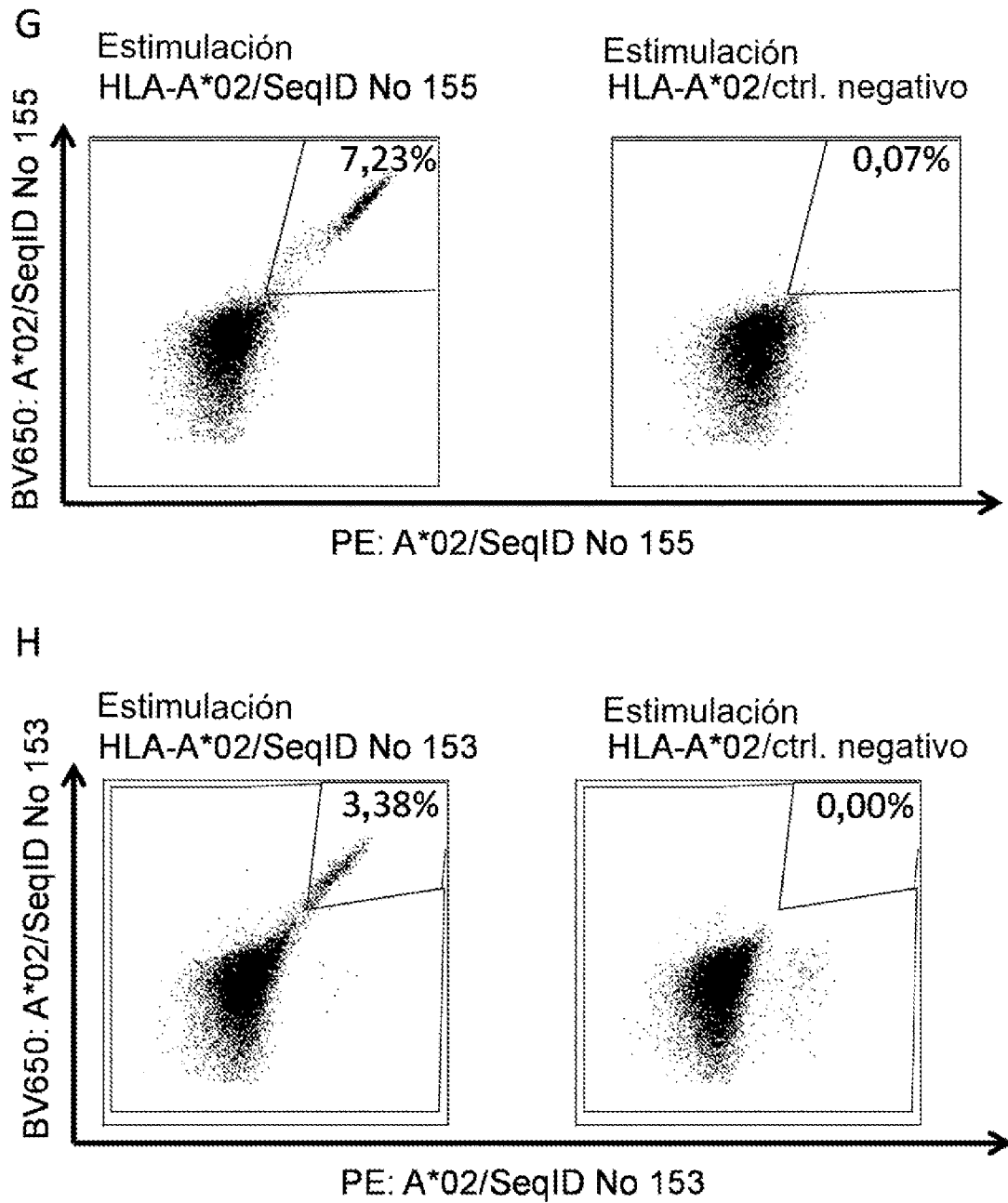


Figura 6 (continuación)

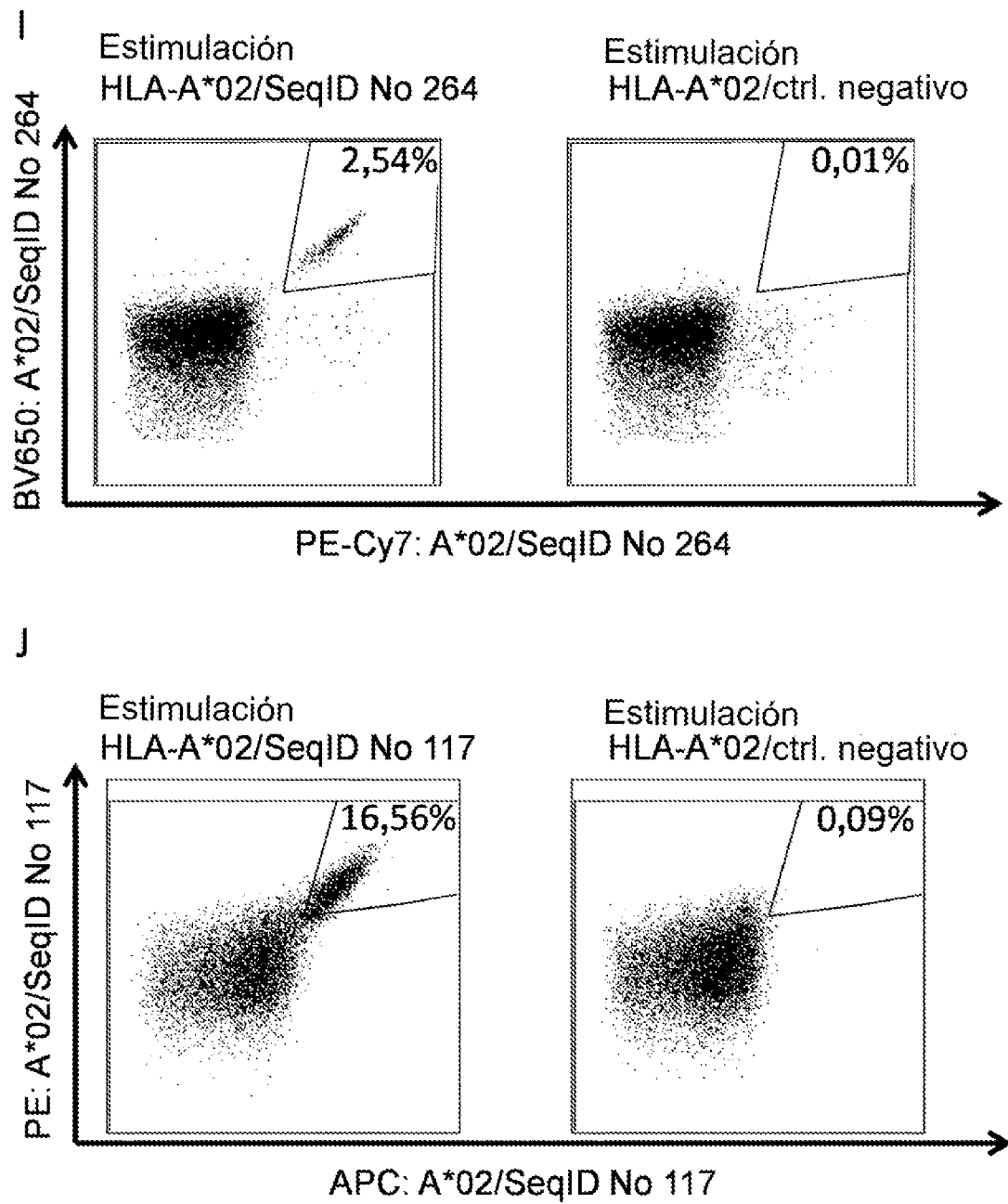


Figura 6 (continuación)

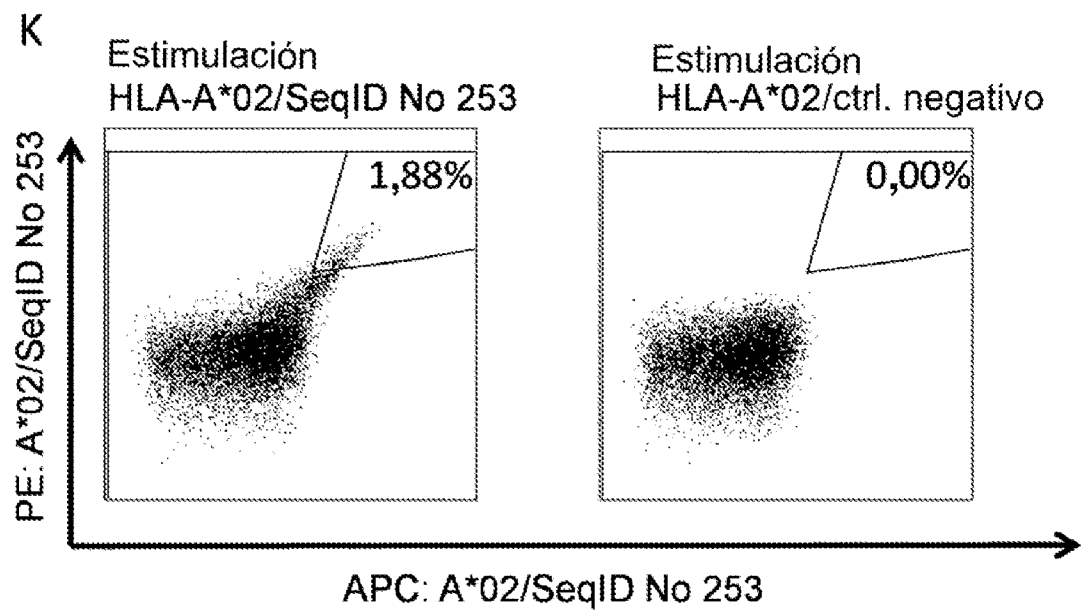


Figura 6 (continuación)

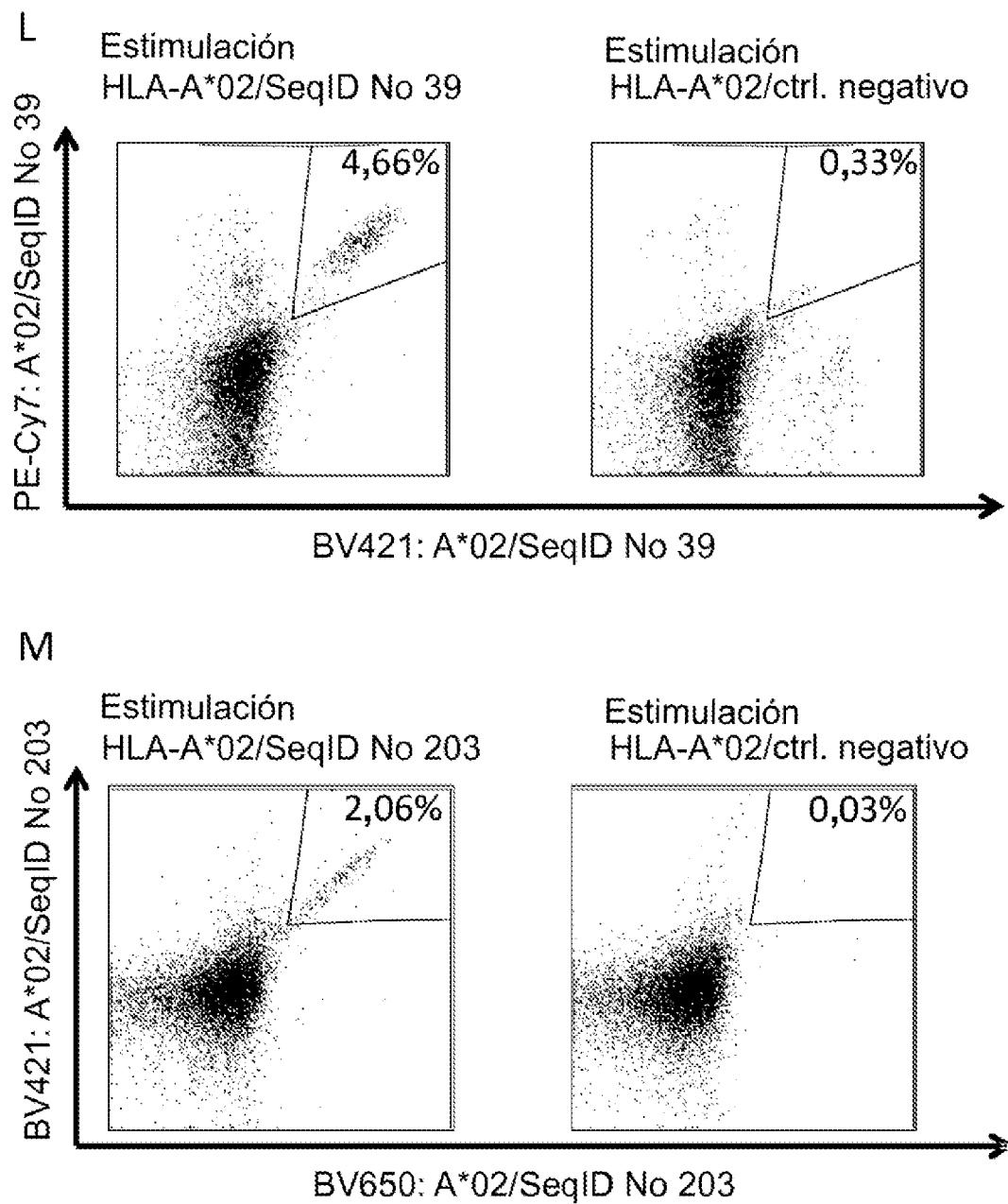
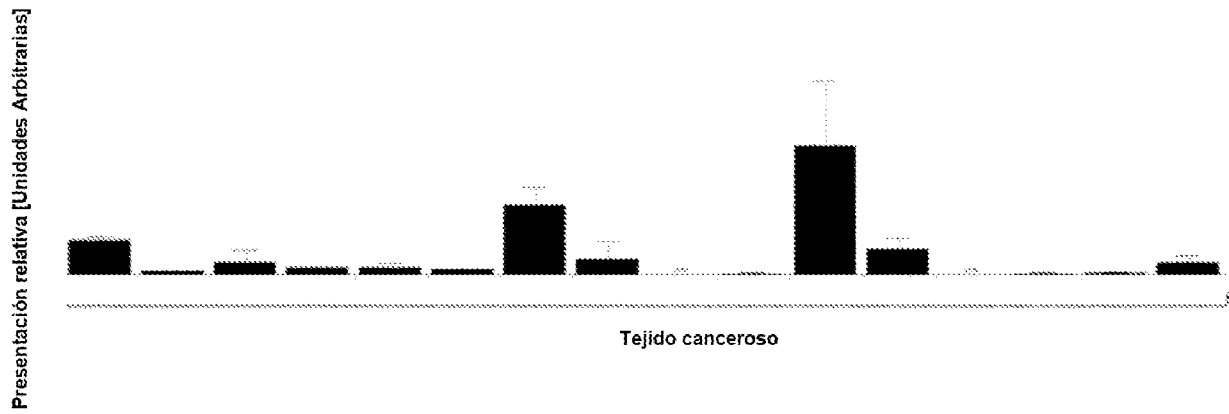


Figura 7A

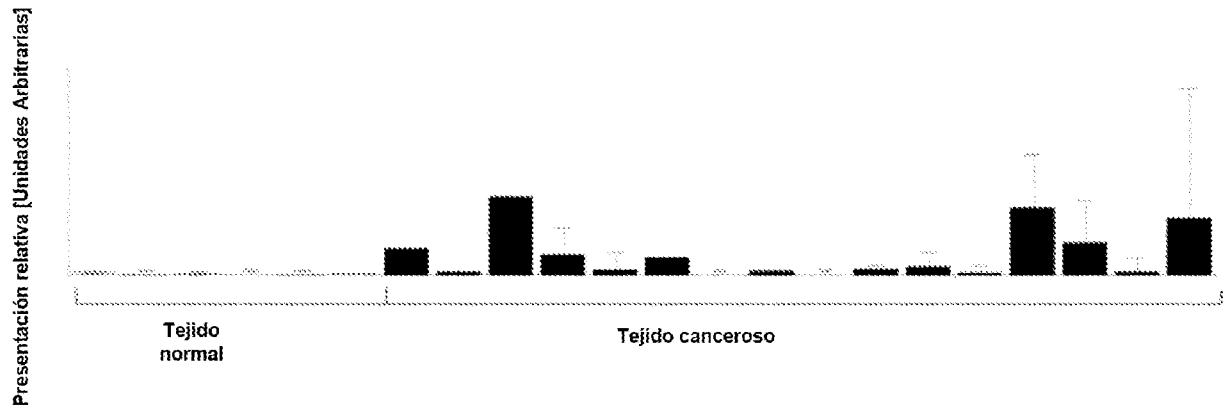
Péptido: LLIPFTIFM (A*02)
SEQ ID NO: 43



Péptido detectado en
 16 tejidos cancerosos (1 cáncer del conducto biliar, 1 cáncer de mama, 1 cáncer de colon, 7 cánceres de pulmón, 2 cánceres de ganglios linfáticos, 3 cánceres ováricos, 1 cáncer de piel) (de izquierda a derecha)

Figura 7B

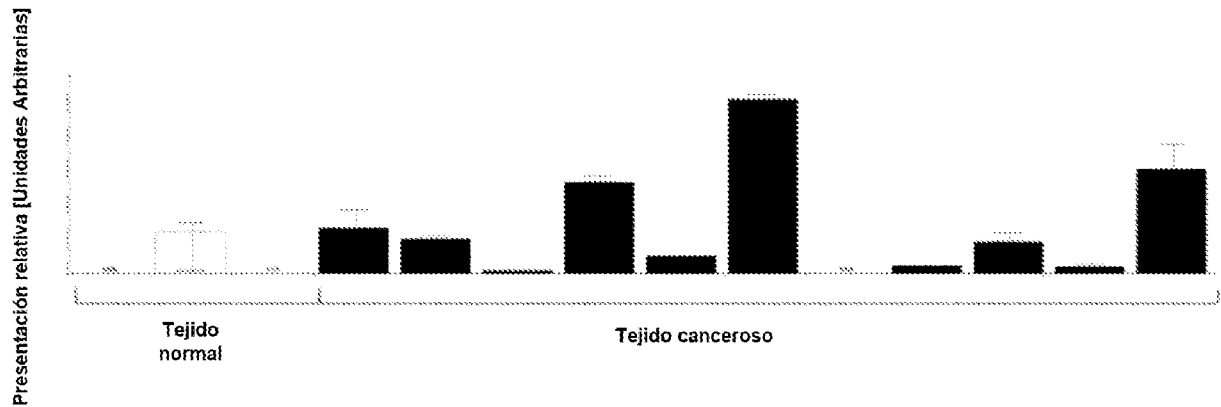
Péptido: ILVTSIFFL (A*02)
SEQ ID NO: 152



Péptido detectado en
 6 tejidos normales (1 ganglio linfático, 5 bazos), 16 tejidos cancerosos (8 cánceres de leucemia leucocítica, 8 cánceres de ganglios linfáticos) (de izquierda a derecha)

Figura 7C

Péptido: VILTSSPFL (A*02)
SEQ ID NO: 156



Péptido detectado en
 3 tejidos normales (1 pulmón, 1 ganglio linfático, 1 bazo), 11 tejidos cancerosos (2 cánceres de mama, 5 cánceres de leucemia leucocítica, 3 cánceres de ganglios linfáticos, 1 cáncer de células mieloides) (de izquierda a derecha)