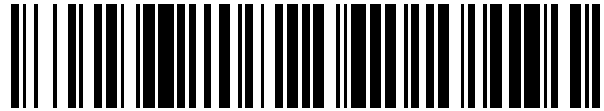


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 529**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11711292 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2547354**

54 Título: **Nueva inmunoterapia contra diversos tumores como el cáncer gastrointestinal y gástrico**

30 Prioridad:

19.03.2010 US 315704 P
19.03.2010 GB 201004551

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WEINSCHENK, TONI;
FRITSCHKE, JENS;
WALTER, STEFFEN;
LEWANDROWSKI, PETER y
SINGH, HARPREET

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 544 529 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

Nueva inmunoterapia contra diversos tumores como el cáncer gastrointestinal y gástrico

La presente invención se refiere a péptidos, ácidos nucleicos y células destinados a la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención se refiere asimismo a epítomos peptídicos asociados a tumores reconocidos por linfocitos T CD8+, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales. La presente invención se refiere a secuencias peptídicas derivadas de moléculas HLA de clase I de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales, en particular respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL).

Antecedentes de la invención

El cáncer gástrico es una enfermedad que se caracteriza por la aparición de células tumorales malignas en la mucosa que recubre el estómago. El cáncer de estómago o gástrico puede aparecer en cualquier parte del estómago y extenderse por todo él y a otros órganos, sobre todo al esófago, a los pulmones y al hígado. El cáncer de estómago es el cuarto cáncer más frecuente en el mundo con 930. 000 casos diagnosticados en 2002. Es una enfermedad con una elevada tasa de mortalidad (~800. 000 al año) que la convierte en la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo, solo superada por el cáncer de pulmón. Afecta con más frecuencia a los varones y sobre todo a los habitantes de los países asiáticos y de países en vías de desarrollo. ([http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/.](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/))

En Estados Unidos representa aproximadamente el 2% (25. 500 casos) de los casos nuevos de cáncer cada año, pero es más frecuente en otros países. En Corea es el cáncer más importante, con el 20,8% de las neoplasias malignas. En Japón el cáncer gástrico sigue siendo el cáncer más común en la población masculina. Cada año en Estados Unidos se diagnostica cáncer de estómago a unos 13. 000 hombres y 8. 000 mujeres. La mayoría tienen más de 70 años.

El cáncer de estómago es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en el mundo, por detrás del cáncer de pulmón, mama, colon y recto. Además, sigue siendo la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer. La *American Cancer Society* calcula que en 2007 se produjeron un millón de casos nuevos, cerca del 70% en países en vías de desarrollo, y unos 800.000 fallecimientos (http://www.cancer.org/downloads/STT/Global_Facts_and_Figures_2007_rev2.pdf.)

La incidencia de la enfermedad presenta una enorme variación geográfica en el globo. La incidencia es máxima en Asia y en regiones de Sudamérica, y mínima en Norteamérica. La mortalidad más elevada se registra en Chile, Japón, Sudamérica y la antigua Unión Soviética.

El cáncer gástrico se diagnostica a menudo en un estadio avanzado debido a la inexistencia de campañas de cribado en la mayor parte del mundo, excepto en Japón (y, de forma limitada, en Corea) donde la detección precoz es un hecho frecuente. Así pues, supone un desafío importante para los profesionales sanitarios. Los factores de riesgo del cáncer gástrico son la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), el tabaquismo, la abundante ingesta de sal y otros factores alimenticios. Una pequeña parte de los casos de cáncer gástrico (1% a 3%) está vinculada a síndromes de predisposición genética. Las mutaciones de la cadherina E están presentes en cerca del 25% de las familias con predisposición a la dominancia autosómica del cáncer gástrico de tipo difuso. Este subgrupo de tumores gástricos ha sido denominado cáncer gástrico difuso hereditario. Puede ser útil ofrecer consejo genético y considerar la gastrectomía profiláctica en portadores jóvenes asintomáticos de mutaciones truncadoras en la línea germinal.

La pared del estómago está compuesta por tres capas de tejido: la mucosa (interna), la capa muscular (media) y la capa serosa (externa). El cáncer gástrico comienza en las células que recubren la mucosa y se extiende hasta las capas externas a medida que crece. Cuatro son los tipos de tratamiento estándar. El tratamiento del cáncer gástrico puede consistir en cirugía, quimioterapia, radioterapia y quimiorradioterapia. La cirugía es el tratamiento primario contra el cáncer gástrico. El objetivo es lograr la resección completa con márgenes negativos (resección R0). Sin embargo, cerca del 50% de los pacientes con cáncer gástrico locorregional no son aptos para la resección R0. R1 indica cáncer residual microscópico (márgenes positivos); y R2 cáncer residual macroscópico pero sin metástasis. El desenlace del paciente depende del estadio del cáncer en el momento del diagnóstico (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™).

La supervivencia a 5 años tras la resección con finalidad curativa se sitúa entre el 30% y el 50% en los pacientes con estadio II y entre el 10% y el 25% en los pacientes con estadio III. Estos pacientes tienen un alto riesgo de recidiva local y sistémica. La metástasis aparece en el 80-90% de los individuos con cáncer de estómago, con una tasa de supervivencia a seis meses del 65% en los diagnosticados en estadios iniciales y de menos del 15% en los diagnosticados en estadios avanzados.

En definitiva, sigue existiendo la necesidad de nuevas opciones terapéuticas eficaces y seguras que mejoren el bienestar prescindiendo del uso de antineoplásicos y otros agentes que pueden causar efectos secundarios graves

para los pacientes con cáncer gástrico, el carcinoma prostático, carcinomas de la cavidad bucal, carcinoma escamoso oral (OSCC), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma MALT inducido por *H. pylori*, carcinoma de colon/cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cánceres de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de hígado, tumores cerebrales de diverso fenotipo, leucemias como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), cáncer de pulmón, sarcoma de Ewing, cáncer de endometrio, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer epitelial de la laringe, carcinoma esofágico, carcinoma oral, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinomas ováricos, carcinoma de células renales, meningioma atípico, carcinoma papilar de tiroides, tumores cerebrales, carcinoma de los conductos salivales, cáncer de cuello de útero, linfomas de linfocitos T/NK extraganglionares, linfoma no hodgkiniano y tumores sólidos malignos del pulmón y la mama, y otros tumores.

WO 02/36614 da a conocer una secuencia de 25 aminoácidos que fue utilizada únicamente a efectos comparativos. La presente invención incorpora péptidos que estimulan el sistema inmunitario del paciente y actúan como agentes antitumorales no invasivos.

Resumen de la invención

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

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos (TCD8⁺) en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en dicha respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: moléculas del MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores MHC de clase II). La conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRIPS y péptidos grandes. Las moléculas MHC de clase II se hallan mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas. Presentan predominantemente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC en el curso de la endocitosis y después son procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

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

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

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

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

a) Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatoцитos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del

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

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

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

d) Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.). Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo.

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

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

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a tumores también pueden ser dianas en una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerrequisito para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítomo en particular.

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales.

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la intolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una

respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo T_{H1} apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ejemplo de espectro de masas de CDC2-001 que demuestra su presentación en la muestra GC2464 de tumor primario. Se llevó a cabo una cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con nanoESI con una mezcla de péptidos eluida de la muestra de CG número 2464. El cromatograma de masas de m/z $597,3501 \pm 0,001$ Da, $z = 2$ muestra un pico de péptido en el tiempo de retención 151,63 min. B) El pico detectado en el cromatograma de masas a los 151,63 min reveló una señal de m/z 597,3501 en el espectro de EM. C) El espectro de masas resultante de la desintegración inducida por colisiones del precursor seleccionado m/z 597,3501 registrado en el experimento de CL-EM con nanoESI en el tiempo de retención indicado confirmó la presencia de CDC2-001 en la muestra de tumor GC2464. D) Para verificar la secuencia se registró el patrón de fragmentación del péptido de referencia sintético CDC2-001 y se comparó con el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural mostrado en C.

Figura 2: Perfiles de expresión de ARNm de proteínas seleccionadas en muestras de tejidos normales y en 25 muestras de cáncer gástrico

- a) CDC2 (Probeset ID: 203213_at)
- b) ASPM (Probeset ID: 219918_s_at)

Figura 3: Ejemplos de resultados de la inmunogenicidad *in vitro* específica de péptido de TUMAP de clase I. Los linfocitos T CD8+ fueron sensibilizados con APC artificiales cargadas con un péptido relevante (recuadro izquierdo) y otro irrelevante (recuadro derecho), respectivamente. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción doble con múltímeros A*2402 relevantes e irrelevantes. Las células mostradas están seleccionadas entre linfocitos CD8+ vivos y las cifras que aparecen en las gráficas representan los porcentajes de células positivas para los múltímeros.

Descripción detallada de la invención

La invención es la definida en las reivindicaciones. Todos los términos utilizados en la presente memoria se definen del modo indicado a continuación a menos que se indique lo contrario. El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos de longitud.

El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítomo o epítomos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 14, aproximadamente.

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

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en 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 desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T.

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

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-A*024 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

Tabla 1: Frecuencias de expresión F del alelo HLA*A024 y de los serotipos más frecuentes del HLA*A02402. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al. 1017-27) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-G_f)^2$. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al. 1211-23).

5 Frecuencias de expresión del HLA*A24 y de los serotipos A*2402 en todo el mundo

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nénets de Rusia	61%
A*2402	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*2402	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*2402	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto ADN monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia. El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

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

El término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas de la presente invención se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y de oligonucleótidos cortos de enlace, o a partir de una serie de oligonucleótidos, con el fin de proporcionar un gen sintético capaz de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

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

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

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

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

El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la

transcripción.

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

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

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

El término «fragmento activo» define un fragmento que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Esto significa que cualquiera de esos fragmentos, necesariamente y como parte de su secuencia de aminoácidos, va a contener un segmento, fragmento o porción que es sustancialmente idéntica, si no lo es exactamente, a una secuencia de las SEQ ID n.º 1 a 33, que corresponde a la estructura natural, o a las proteínas «precursoras» de las SEQ ID n.º 1 a 33. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje de identidad», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad porcentual} = 100 \left[\frac{I}{C+R} \right]$$

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

(I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y

(II) cada hueco (*gap*) de la secuencia de referencia y

(III) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad porcentual, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda la identidad porcentual mínima

especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que la identidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

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

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

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

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

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

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

Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido de las SEQ ID N. ° 1 a 33 se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 μ M, más preferiblemente como máximo de alrededor de 1 nM, y aún más preferentemente como máximo de alrededor de 100 pM, y más preferentemente como máximo de alrededor de 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por los CTL de más de un individuo, de al menos dos, y más preferiblemente de tres individuos.

Así pues, los epítopos de la presente invención pueden ser idénticos a los epítopos específicos de tumor o asociados a tumor naturales o pueden incluir epítopos que difieran como máximo en 4 residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

Abordajes inmunoterapéuticos para el tratamiento

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

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

células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 12 residuos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica, principalmente de proteínas endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía.

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

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítipo de linfocito T. Un prerequisite para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítipo en particular.

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados, entre otros, en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales (Lemmel et al. 450-54; Weinschenk et al. 5818-27).

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epitopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítipo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epitopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epitopos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los CTL CD8-positivos (moléculas de MHC de clase I) o por los CTL CD4-positivos (moléculas de MHC de clase II) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales. Por consiguiente uno de los fines de la presente invención consiste en proveer composiciones de péptidos que contengan péptidos de unión a complejos MHC de cualquiera de las clases.

A la luz de los efectos secundarios graves y los gastos que supone el tratamiento contra el cáncer es evidente la urgente necesidad de mejora de los métodos pronósticos y diagnósticos. Así pues, existe la necesidad de descubrir otros factores que puedan servir como biomarcadores para el cáncer en general y el cáncer gástrico en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados en el tratamiento contra el cáncer en

general y contra el cáncer gástrico en particular.

Y es más, no existe ninguna pauta terapéutica pensada para los pacientes con cáncer gástrico que presentan recidiva bioquímica después de la prostatectomía radical, normalmente causada por tumor residual *in situ* que no ha sido extirpado en presencia de crecimiento localmente avanzado del tumor. Sería deseable contar con nuevas estrategias terapéuticas de menor morbilidad y similar eficacia terapéutica a las estrategias terapéuticas disponibles en estos momentos.

La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento del cáncer gástrico y de otros tumores que sobreexpresan los péptidos de la invención. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado directamente la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras de cáncer gástrico humano primario (véanse el ejemplo 1 y la figura 1).

El gen originario del que derivan los péptidos aparece notablemente sobreexpresado en el cáncer gástrico, el carcinoma de células renales, cáncer de colon, carcinoma de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma, cáncer de próstata, neoplasias benignas y melanoma maligno en comparación con los tejidos normales (véanse el ejemplo 2 y la figura 2), lo cual demuestra el alto grado de asociación del péptido con el tumor, esto es, que tales péptidos tienen una fuerte presencia en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales.

Los péptidos unidos a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T destruyen las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células tumorales gástricas que presentan los péptidos derivados.

Todos los péptidos que fueron compatibles con la plataforma de validación –véase el ejemplo 3– de la presente invención han demostrado ser capaces de estimular las respuestas de los linfocitos T (véanse el ejemplo 3 y la figura 3). Así pues, los péptidos de la presente invención son útiles para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (p. . ej., péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo –NH₂ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej. 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 metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

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

Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para el diagnóstico. Dado que muchos de los péptidos son generados por *células de cáncer gástrico* y se ha determinado que dichos péptidos no están presentes en tejidos normales, dichos péptidos pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos reivindicados en biopsias de tejido puede ayudar al histopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos péptidos mediante anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al histopatólogo de que el tejido es maligno o está inflamado o enfermo. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

La detección de los péptidos en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se prevé que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de los péptidos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

Los péptidos descritos pueden ser utilizados para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las

- respuestas de los linfocitos T o las respuestas de anticuerpos contra el péptido o el péptido unido a moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden ser utilizadas como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, como por ejemplo la vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia de linfocitos de donantes. En el ámbito de la terapia génica, las respuestas de los linfocitos contra los péptidos pueden tenerse en cuenta para la evaluación de efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.
- 10 Los péptidos pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos.
- 15 Además se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.
- La presente invención se refiere a un péptido con una longitud total de entre 10 y 14 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo: a) una secuencia consistente en la SEQ ID N. ° 1; b) una variante de la SEQ ID N. ° 1 que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicha variante es seleccionada entre el grupo de secuencias LFQILQGIVF, LYQILQGIVL, LYQILQGIVI, LFQILQGIVL y LFQILQGIVI.
- 20 La Tabla 2 muestra los péptidos dados a conocer, sus respectivas SEQ ID N. ° y las proteínas originarias de las que pueden surgir dichos péptidos. Todos los péptidos se unen a los alelos HLA A*024.

Tabla 2:Péptidos dados a conocer

SEQ ID N°:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
1*	CDC2-001	LYQILQGIVF	CDK1
2	ASPM-002	SYNPLWLR	ASPM
3	UCHL5-001	NYLPFIMEL	UCHL5
4	MET-006	SYIDVLPEF	MET
5	PROM1-001	SYIIDPLNL	PROM1
6	MMP11-001	VWSDVTPLTF	MMP11
7	MST1R-001	NYLLYVSNF	MST1R
8	NFYB-001	VYTTSYQQI	NFYB
9	SMC4-001	HYKPTPLYF	SMC4
10	UQCRB-001	YYNAAGFNKL	UQCRB
11	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	PPAP2C
12	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9
13	NUF2-001	VYGIRLEHF	NUF2
14	ABL1-001	TYGNLLDYL	ABL1
15	MUC6-001	NYEETFPHI	MUC6
16	ASPM-001	RYLWATVTI	ASPM
17	EPHA2-005	VYFSKSEQL	EPHA2
18	MMP3-001	VFIFKGNQF	MMP3
19	NUF2-002	RFLSGIINF	NUF2
20	PLK4-001	QYASRFVQL	PLK4

ES 2 544 529 T3

(continuación)

SEQ ID N°:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
21	ATAD2-002	KYLTVKDYL	ATAD2
22	COL12A1-001	VYNPTPNSL	COL12A1
23	COL6A3-001	SYLQAANAL	COL6A3
24	FANCI-001	FYQPKIQQF	FANCI
25	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
26	ATAD2-001	AYAIKEEL	ATAD2
27	ATAD2-003	LYPEVFEKF	ATAD2
28	HSP90B1-001	KYNDTFWKEF	HSP90B1
29	SIAH2-001	VFDTAIAHLF	SIAH2
30	SLC6A6-001	VYPNWAIGL	SLC6A6
31	IQGAP3-001	VYKVVGNLL	IQGAP3
32	ERBB3-001	VYIEKNDKL	ERBB3
33	KIF2C-001	IYNGKLFDLL	KIF2C
* Péptido conforme a la presente invención			

Otros péptidos de HLA A*024 interesantes

SEQ ID N°:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
34	CCDC88A-001	QYIDKLNEL	CCDC88A
35	CCNB1-003	MYMTVSIIDRF	CCNB1
36	CCND2-001	RYLPQCSYF	CCND2
37	CCNE2-001	IYAPKLQEF	CCNE2
38	CEA-010	IYPDASLLI	CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6
39	CLCN3-001	VYLLNSTTL	CLCN3
40	DNAJC10-001	IYLEVIHNL	DNAJC10
41	DNAJC10-002	AYPTVKFYF	
42	EIF2S3-001	IFSKIVSLF	EIF2S3, LOC255308
43	EIF3L-001	YYYVGFAYL	EIF3L, LOC340947
44	EPPK1-001	RYLEGTSCI	EPPK1
45	ERBB2-001	TYLPTNASLSF	ERBB2
46	GPR39-001	SYATLLHVL	GPR39
47	ITGB4-001	DYTIGFGKF	ITGB4
48	LCN2-001	SYNVTSVLF	LCN2
49	SDHC-001	SYLELVKSL	LOC642502, SDHC
50	PBK-001	SYQKVIELF	PBK

ES 2 544 529 T3

(continuación)

SEQ ID N°:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
51	POLD3-001	LYLENIDEF	POLD3
52	PSMD14-001	VYISSLALL	PSMD14
53	PTK2-001	RYLPKGFLNQF	PTK2
54	RPS11-001	YYKNIGLGF	RPS11
55	TSPAN1-002	VYTTMAEHF	TSPAN1
56	ZNF598-001	DYAYLREHF	ZNF598
57	ADAM10-001	LYIQTDLHFF	ADAM10
58	MMP12-001	TYKYVDINTF	MMP12
59	RRM2-001	YFISHVLAF	RRM2
60	TMPRSS4-001	VYTKVSAYL	TMPRSS4
61	TSPAN8-001	VYKETCISF	TSPAN8

5 En otra forma de realización de la invención se dan a conocer péptidos de unión a HLA A*02 contra el cáncer gástrico. En las personas que son positivas para A*02 y/o A*24 se pueden emplear mezclas de los péptidos dados a conocer como tratamiento contra el cáncer gástrico. Se prefieren las mezclas de 2 a 20 péptidos y las mezclas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 péptidos.

SEQ ID N°:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
62	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2
63	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
64	LMNB1-001	LADETLKLV	LMNB1
65	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
66	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
67	COPG-001	VLEDLEVTV	COPG, COPG2, TSGA13
68	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
69	COL6A3-003	NLLDLDYEL	COL6A3
70	COL6A3-004	FLIDSSEGV	COL6A3
71	PSMC2-001	ALDEGDIAL	PSMC2
72	UBE2S-001	ALNEEAGRLLL	UBE2S
73	KIF11-001	ILSPTVSI	KIF11
74	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
75	CCNB1-001	ALVQDLAKA	CCNB1
76	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
77	F2R-001	TLDPRSFLL	F2R
78	OLFM4-001	TLDDLLLYI	OLFM4

(continuación)

SEQ ID N°:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) originaria(s)
79	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
80	CEP250-001	SLAEVNTQL	CEP250
81	HIF1A-001	ALDGFVMVL	HIF1A
82	KRAS-001	GVDDAFYTL	KRAS
83	MET-001	YVDPVITSI	MET
84	NCAPG-001	YLLSYIQSI	NCAPG
85	NCAPG-002	QIDDVTIKI	NCAPG
86	TOP-004	YLYGQTTTYL	TOP2A
87	TOP-005	KLDETGNSL	TOP2A
88	LAMC2-002	RLDDLKMTV	LAMC2
89	AHR-001	LTDEILTYV	AHR
90	CCNB1-002	ILIDWLQVQ	CCNB1
91	CEACAM6-001	VLYGPDVPTI	CEACAM6
92	COPB1-001	SIFGEDALANV	COPB1
93	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
94	TPX2-001	KILEDVGV	TPX2
95	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2A, TOP2B

Proteína 2 del ciclo de división celular (CDC2)

5 La cinasa de serina/treonina CDC2, también conocida como Cdk1 (cinasa dependiente de ciclina 1) desempeña un papel esencial en el control del ciclo celular. Se sabe que es el principal regulador de la transición de la fase G2 a la fase M. Al final de la interfase se une a las ciclinas de tipo A. Tras la disgregación de la membrana nuclear, las ciclinas de tipo A son sustituidas por la ciclina B, que forma el factor promotor de la mitosis (MPF) con la Cdc2. El MPF es esencial para dirigir la célula a través del proceso de la mitosis.

10 La función de la Cdc2 en la mitosis no es redundante y no puede ser compensada por la actividad de otras Cdk como las Cdk2, 4 y 6. En cambio, se ha descrito que la Cdc2 interviene en otras fases del ciclo celular como la transición entre las fases G1 y S, y es capaz de sustituir a las «Cdk de la interfase». Así pues, se ha considerado que la Cdc2 sería la única Cdk esencial para el ciclo celular.

15 La sobreexpresión de la Cdc2 se ha detectado en varios tipos de cáncer, con frecuencia relacionada con un mal pronóstico. Entre ellos se encuentran el carcinoma de próstata, los carcinomas de la cavidad bucal, el carcinoma escamoso oral (OSCC), la leucemia mieloide aguda (LMA) (Qian et al.), el linfoma MALT inducido por *H. pylori* (Banerjee et al. 217-25) y el carcinoma de colon (Yasui et al. 36-41). En el carcinoma gástrico se ha descrito la sobreexpresión y/o el incremento de la actividad, lo que podría tener un papel causal. Los inhibidores de la Cdc2 y de otras Cdk han sido considerados como candidatos a fármacos para el tratamiento del cáncer (Shapiro 1770-83).

Proteína de huso anormal asociada a la microcefalia (ASPM)

20 El gen de la proteína de huso anormal asociada a la microcefalia (ASPM) es el ortólogo humano del gen de huso anormal de *Drosophila* (*asp*). Interviene en la regulación de la neurogénesis y su mutación causa microcefalia primaria autosómica recesiva. La ASPM está localizada en los polos del huso mitótico durante la mitosis. La sobreexpresión de ASPM ha sido sugerida como marcador y potencial diana terapéutica del glioblastoma. La reducción de la expresión mediante ARNsi inhibe la proliferación de las células tumorales y la proliferación de las células madre (*stem cells*) neurales. La sobreexpresión de la ASPM también podría predecir el potencial invasivo/metastásico, la recurrencia precoz del tumor y el pronóstico malo en el carcinoma hepatocelular. La ASPM aparece regulada al alza en células inmortalizadas y en tejidos de cáncer de pulmón amicrocítico (Jung, Choi, and

Kim 703-13).

Metaloproteasas de la matriz 3 (MMP3)

5 La MMP3, también llamada progelatinasa o estromalinasina 1, es una endopeptidasa que descompone componentes de la matriz extracelular (MEC) como la fibronectina, la laminina, la elastina, la proteína central del proteoglicano y las regiones no helicoidales de los colágenos. Las MMP son importantes en varios procesos fisiológicos que requieren la reorganización de la matriz extracelular como la migración celular durante la embriogénesis, la remodelación tisular, la vascularización, la involución de la mama tras la lactancia y la cicatrización de las heridas. La MMP3 también interviene en la agregación plaquetaria. Entre las patologías en que aparece un incremento de la expresión y de la secreción de MMP3 se hallan las enfermedades inflamatorias autoinmunitarias y el cáncer.

10 La MMP3 se sobreexpresa en algunos tumores e interviene en la transición del epitelio al mesénquima (EMT). También podría intervenir en las etapas iniciales de la oncogénesis, desencadenando cambios epigenéticos que desembocan en la generación del fenotipo maligno (Lochter et al. 180-93). Se ha demostrado que los polimorfismos del promotor de la MMP3 que están asociados con los niveles de expresión influyen en el riesgo y en el pronóstico de algunos tipos de cáncer como el adenocarcinoma esofágico (Bradbury et al. 793-98) y el carcinoma escamoso oral (Vairaktaris et al. 4095-100)(Liu et al. 430-35). Los pacientes con cáncer gástrico positivo para *H. pylori* cuyas concentraciones séricas de MMP3 y MMP7 son elevadas presentan mayor invasión ganglionar y una supervivencia más corta. En una cohorte de 74 pacientes con cáncer gástrico, la MMP3 apareció expresada en el 27% de los casos (Murray et al. 791-97).

c-Met

20 c-Met media las actividades potencialmente oncógenas del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF)/factor de dispersión, incluida la promoción del crecimiento celular, la motilidad, la supervivencia, la disolución de la matriz extracelular y la angiogénesis.

25 Con la unión al receptor, el HGF activa procesos de señalización posteriores (*downstream*) como las vías de Ras, fosfatidilinositol 3'-cinasa, fosfolipasa C γ , y la relacionada con la proteína-cinasa activada por mitógenos (Dong et al. 5911-18; Furge et al. 10722-27; Furge, Zhang, and Van de Woude 5582-89; Montesano et al. 355-65; Naldini et al. 501-04; Ponzetto et al. 4600-08). La c-Met se expresa predominantemente en las células epiteliales. La activación oncógena de c-Met (también en tejidos malignos no epiteliales) puede ser consecuencia de procesos de amplificación/sobreexpresión, mutaciones activadoras, adquisición de bucles autocrinos de HGF/c-Met o de la fosforilación constitutiva (Di Renzo et al. 147-54; Ferracini et al. 739-49; Fischer et al. 733-39; Koochekpour et al. 5391-98; Li et al. 8125-35; Maulik et al. 41-59; Qian et al. 589-96; Ramirez et al. 635-44; Tuck et al. 225-32)(Nakaigawa et al. 3699-705). La activación constitutiva de c-Met en ratones transgénicos que sobreexpresan el HGF promueve una oncogénesis generalizada (Takayama et al. 701-06; Wang et al. 1023-34). El silenciamiento de MET se traduce en la inhibición del crecimiento tumoral y de las metástasis (Corso et al. 684-93). La amplificación de MET ha sido asociada con la progresión del cáncer gástrico humano (Lin et al. 5680-89).

35 Ubiquitina hidrolasa carboxiterminal L5 (UCHL5)

La UCHL5, también llamada ubiquitina hidrolasa C-terminal (UCH37) o INO80R, es una desubiquitinasa asociada a proteosoma. Separa las cadenas de poli-ubiquitina fijadas a la proteína por el extremo distal rompiendo el enlace isopeptídico entre la Cys76 y la Lys48 del extremo C-terminal (Nishio et al. 855-60). En el núcleo, la UCHL5 está asociada con el complejo remodelador de la cromatina Ino80. Tras la unión de un proteosoma, se activa y podría contribuir a la regulación de la transcripción o a la reparación del ADN que se ha planteado como mediada por el Ino80 y el proteosoma.

45 Las proteasas específicas de la ubiquitina como la UCHL5 intervienen en varios procesos como el control de la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la replicación y la reparación del ADN, la transcripción, el control de calidad de las proteínas, la respuesta inmunitaria y la apoptosis. La UCHL5 podría contribuir a la transformación maligna. Se ha demostrado que su actividad está regulada al alza en el tejido de carcinoma de cuello uterino humano en comparación con el tejido normal adyacente. Es capaz de desubiquitinar y por tanto estabilizar el receptor del TGF-beta y los mediadores posteriores, las proteínas Smad, intensificando así la vía de señalización del TGF-beta. La vía de señalización del TGF-beta potenciada puede actuar como promotora del tumor en los estadios avanzados de progresión del cáncer, aunque posee una doble función y también puede actuar como supresora del tumor en los estadios iniciales y antes de la iniciación (Bierie and Moses 29-40; Horton et al. 138-43; Wicks et al. 8080-84; Wicks et al. 761-63).

Receptor de la proteína estimuladora de los macrófagos (MST1R)

55 El receptor MST1R (o RON) pertenece a la familia Met de tirosina-cinasas asociadas a receptores de la superficie celular y se expresa principalmente en las células epiteliales y en los macrófagos. El MST1R puede inducir la migración, la invasividad, la proliferación y la supervivencia de las células en respuesta a su ligando. Sus propiedades oncogénicas han sido demostradas *in vitro* y en modelos animales *in vivo*, y suele aparecer desregulado en los cánceres humanos (Dussault and Bellon, 2009). Los estudios clínicos han demostrado que la

sobreexpresión del MST1R está asociada con un mal pronóstico y metástasis. La expresión del MST1R es significativa en el tejido de carcinoma gástrico y equivale a la del tejido paraneoplásico, pero en cambio no se observa en la mucosa gástrica normal (Zhou et al. 236-40). La reducción de la expresión del MST1R en células de cáncer de próstata se traduce en la reducción de la quimiotaxia de las células endoteliales *in vitro*, y en la reducción del crecimiento del tumor y el descenso de la densidad de microvasos tras el trasplante ortotópico en la próstata *in vivo*. La desactivación del MST1R mediante ARNsi en una estirpe de células de cáncer de colon altamente oncogénicas redujo la proliferación respecto a las células de control.

Proteína similar a cinesina (KIF2C)

La KIF2C es una despolimerasa de microtúbulos que regula la fijación de los microtúbulos al cinetocoro durante la formación del huso mitótico. Es importante para la segregación cromosómica que tiene lugar en la anafase y puede ser necesaria para coordinar el inicio de la separación de los centrómeros hermanos. La alteración de la fijación de los microtúbulos a los cinetocoros conduce a la segregación desigual de los cromosomas y a la aneuploidía, que se observa en la mayoría de los tumores sólidos (Maney et al. 67-131; Moore and Wordeman 537-46). La KIF2C aparece sobreexpresada en células de cáncer de mama (Shimo et al. 62-70), cáncer de colon, cáncer colorrectal y cáncer gástrico (Nakamura et al. 543-49). Una estirpe de células de cáncer gástrico (AZ521) que expresaba de forma estable la KIF2C presentó un aumento de la proliferación y la migración en comparación con células que habían sido sometidas a una transfección ficticia. La expresión elevada de la KIF2C en el cáncer gástrico podría estar asociada a la invasión del sistema linfático, la metástasis ganglionar y el pronóstico malo. El tratamiento de células de cáncer de mama con ARN pequeños de interferencia dirigidos contra la KIF2C inhibió su crecimiento.

Proteína 4 para el mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC4)

Las proteínas SMC son ATPasas cromosómicas que desempeñan diversos cometidos en la organización y la dinámica de orden superior de los cromosomas. La SMC4 es un componente central del complejo de la condensina que interviene en la condensación de la cromatina y también ha sido vinculada con la segregación de los nucléolos, la reparación del ADN y el mantenimiento de la estructura de la cromatina. El gen SMC4 se ha hallado intensamente expresado en la próstata y en las glándulas salivales normales, muy poco en el colon, el páncreas y el intestino delgado, y nada en absoluto en todos los demás tejidos. La expresión del ARN se ha observado en niveles elevados en muchas estirpes de células cancerosas, como cáncer de mama, próstata, colon o páncreas (Egland et al. 5929-34).

Receptor 2 de efrina de tipo A (EPAH2)

Los receptores Eph son una familia singular de tirosina-cinasas de receptor (RTK) que desempeñan cometidos esenciales en la formación de los patrones embrionarios, el direccionamiento neuronal y el desarrollo vascular durante la embriogénesis normal. La estimulación de EphA2 por su ligando (efrina-A1) provoca la autofosforilación del receptor, y esta estimulación invierte la transformación oncogénica. Los receptores Eph y sus ligandos, las efrinas, se sobreexpresan con frecuencia en muy distintos tipos de cáncer. La EphA2 aparece con frecuencia sobreexpresada y funcionalmente alterada en las células de tumores de gran malignidad, y se cree que promueve el crecimiento tumoral potenciando la adhesión entre la células y la matriz extracelular, el crecimiento independiente de la fijación y la angiogénesis. Se ha demostrado la correlación entre la sobreexpresión de EphA2 y de la efrinaA-1 en el carcinoma gástrico con la profundidad de la invasión tumoral, la estadificación tumor-ganglios-metástasis (TNM), la metástasis ganglionar y el pronóstico malo (Yuan et al. 2410-17).

ATAD2

ATAD2 (también llamado ANCCA) es un nuevo miembro de la familia de proteínas ATPasa AAA+. Potencia la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR) y del receptor de estrógenos (ER), lo que desemboca en la transcripción de genes tales como IGF1R, IRS-2, SGK1 y survivina (AR) en el primer caso y ciclina D1, c-myc y E2F1 (ER) en el segundo. También estimula la actividad transcripcional de c-Myc.

La expresión de ATAD2 es elevada en varios tumores humanos, como el cáncer de mama, el cáncer de próstata y el osteosarcoma. La expresión ha sido vinculada con un pronóstico malo.

AVL9

Sorprendentemente se ha descubierto que esta proteína es una proteína originaria de la que se tienen muy pocos datos, tanto de la proteína en sí como de la función del gen correspondiente.

Proteína de la cadena alfa-1(XII) del colágeno (Col12A1)

La cadena alfa-1(XII) del colágeno es una proteína que en el ser humano está codificada por el gen COL12A1. Este gen codifica la cadena alfa del colágeno de tipo XII, un miembro de la familia de los colágenos FACIT (colágenos asociados a fibrillas con hélices triples interrumpidas). El colágeno de tipo XII es un homotrímero que aparece asociado al colágeno de tipo I, una asociación que supuestamente modifica las interacciones entre las fibrillas de colágeno I y la matriz circundante. Se han descubierto variantes de corte y empalme alternativo que codifican

distintas isoformas.

Proteína de la cadena alfa-3(VI) del colágeno (COL6A3)

El COL6A3 codifica la cadena alfa-3, una de las tres cadenas alfa del colágeno de tipo VI. Los dominios de esta proteína se unen a proteínas de la matriz extracelular, una interacción que explica la importancia de este colágeno en la organización de los componentes de la matriz. La remodelación de la matriz extracelular a través de la sobreexpresión del colágeno VI contribuye a la resistencia contra el cisplatino en células de cáncer de ovario. La presencia de colágeno VI apareció correlacionada con el grado del tumor, un factor pronóstico en el cáncer de ovario (Sherman-Baust et al. 377-86). La COL6A3 se sobreexpresa en el tumor colorrectal (Smith et al. 1452-64), el carcinoma de glándulas salivales (Leivo et al. 104-13) y se expresa diferencialmente en el cáncer gástrico (Yang et al. 1033-40). El COL6A3 ha sido identificado como uno de siete genes con variantes de corte y empalme específicas de tumor. Las alteraciones de corte y empalme específicas de tumor que han sido validadas han demostrado ser muy constantes, lo cual ha permitido la distinción clara entre muestras normales y cancerosas y, en algunos casos, incluso entre distintos estadios tumorales (Thorsen et al. 1214-24).

Anemia de Fanconi, grupo de complementación I (FANCI)

La proteína FANCI aparece en la cromatina como respuesta a los daños en el ADN e interviene en la reparación del mismo (Smogorzewska et al. 289-301). Las mutaciones en el gen FANCI causan la anemia de Fanconi, un trastorno genético recesivo y heterogéneo caracterizado por inestabilidad citogenética, hipersensibilidad a los agentes entrelazantes del ADN, aumento de las roturas cromosómicas y reparación defectuosa del ADN. El corte y empalme alternativo de FANCI da lugar a dos variantes de transcripción que codifican isoformas diferentes.

Proteína de choque térmico de 90 kDa, miembro beta I (HSP90B1)

La proteína HSP90 (también llamada proteína regulada por glucosa 94, Grp94), miembro 1 es una chaperona humana. Participa en procesos vinculados al retículo endoplasmático (RE): traducción, control de calidad de proteínas y degradación asociada al RE (ERAD), detección de estrés en el RE y retención/unión del calcio en el RE (Christianson et al. 272-82; Fu and Lee 741-44). La HSP90 contiene la secuencia KDEL propia de las proteínas retenidas en el RE, pero también aparece en la superficie de las células tumorales (Altmeyer et al. 340-49), así como fuera de la célula. Las HSP son conocidas por ser liberadas de las células necróticas (pero no apoptóticas) y de las células estresadas por diversos estímulos como el choque térmico y el estrés oxidativo, y pueden aparecer en la circulación (Basu et al. 1539-46; Tsan and Gao 274-79). En el medio extracelular, la HSP90 modula (básicamente estimula) las respuestas inmunitarias e interviene en la presentación de antígenos. En la superficie celular puede actuar como receptor para la entrada de patógenos y/o la transducción de señales (Cabanés et al. 2827-38). En caso de expresión o de liberación en la superficie celular específica de tumor puede inducir la inmunidad antitumoral (Zheng et al. 6731-35). Las vacunas con HSP90 han demostrado inmunizar contra el cáncer y contra enfermedades infecciosas tanto en protocolos profilácticos como terapéuticos (revisión en (Bolhassani and Rafati 1185-99; Castelli et al. 227-33; Murshid, Gong, and Calderwood 1019-30)).

Con todo, la HSP90 también se puede considerar una diana para el tratamiento oncológico ya que: 1) aparece correlacionada con la progresión tumoral y contribuye a la resistencia contra la apoptosis, también en la generada por la radiación y la quimioterapia; y 2) está sobreexpresada en muchos tumores, entre ellos el cáncer gástrico, el osteosarcoma (Guo et al. 62-67) y el carcinoma de mama (Hodorova et al. 31-35). La sobreexpresión de la HSP90 está asociada con la malignidad y el pronóstico malo en el cáncer gástrico (Wang, Wang, and Ying 35-41; Zheng et al. 1042-49). La regulación a la baja de la HSP90 en el cáncer gástrico genera la apoptosis de las células cancerosas (Sheu, Liu, and Lan e1096).

Muc 6

El gen MUC6 se expresa en las células de las mucosas. Su supuesta función principal consiste en la protección de las vulnerables superficies epiteliales de los efectos nocivos de la exposición constante a muy diversos agentes cáusticos y proteolíticos endógenos (Toribara et al., 1997). El MUC6 también interviene en la organogénesis epitelial (Reid and Harris, 1999). La expresión de MUC6 se localiza en la mucosa gástrica normal. Aparece sobreexpresada en algunos tipos de cáncer como el adenoma y el carcinoma intestinales, el carcinoma pulmonar (Hamamoto et al. 891-96), los pólipos colorrectales (Bartman et al. 210-18) y el carcinoma de mama (Pereira et al. 210-13), mientras que no se expresa en los respectivos tejidos normales. Se ha planteado que la elevada tasa de expresión de MUC6 en el carcinoma mucinoso actúa como barrera contra la diseminación del cáncer dando lugar a un comportamiento biológico menos invasivo (Matsukita et al. 26-36). La expresión de MUC6 fue inferior en los carcinomas gástricos que en los adenomas o en la mucosa normal y estuvo inversamente correlacionada con el tamaño del tumor, la profundidad de la invasión, la invasión linfática y venosa, la metástasis ganglionar y la estadificación UICC. La regulación a la baja de MUC6 podría contribuir a la transformación maligna de las células epiteliales gástricas y constituye una de las bases moleculares del crecimiento, la invasión, la metástasis y la diferenciación en el carcinoma gástrico (Zheng et al. 817-23). También existen indicios de que la infección por *Helicobacter pylori*, una de las principales causas de carcinoma gástrico, está asociada con la reducción de la expresión de MUC6 (Kang et al. 29-35; Wang and Fang 425-31).

Proteína del cinetocoro Nuf2

El gen NUF2 (CDCA-1) codifica una proteína muy similar a la Nuf2 de levadura, un componente del complejo proteínico conservado que está vinculado al centrómero. La Nuf2 de levadura desaparece del centrómero durante la profase meiótica cuando los centrómeros pierden su conexión con el cuerpo del polo del huso, y desempeña una función reguladora en la segregación de los cromosomas. Se ha demostrado que los ARNcsi contra la survivina y la hNuf2 inactivan temporalmente sus ARNm causando la multinucleación en el primer caso y la muerte celular por paralización de la mitosis en el segundo (Nguyen et al. 394-403). Nuf2 y Hec1 son precisas para la organización de los extremos más (+) de los microtúbulos estables en la placa externa que son necesarios para las fuerzas sostenidas dirigidas hacia los polos responsables de la orientación de los cinetocoros (DeLuca et al. 519-31).

- 5 La proteína Nuf2 se ha hallado sobreexpresada en el NSCLC, vinculada con un mal pronóstico (Hayama et al. 10339-48), así como en el cáncer de cuello uterino (Martin et al. 333-59). En tejidos de cáncer gástrico extirpados (tipo difuso, 6; tipo intestinal, 4), se hallaron 2 variantes de NUF2 reguladas al alza. Se ha planteado que las variantes de corte y empalme alternativo detectadas en este estudio tal vez serían aptas como marcadores diagnósticos y/o nuevas dianas para el tratamiento antitumoral (Ohnuma et al. 57-68). La reducción de la expresión de la NUF2 con ARNsi inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis en el NSCLC, el cáncer de ovario, el cáncer de cuello uterino, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y glioma (Kaneko et al. 1235-40).

Fosfohidrolasa 2 de fosfatos de lípidos (PPAP2C)

Las fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP) convierten dicho ácido en diacilglicerol, e intervienen en la síntesis *de novo* de glicerolípidos, así como en la transducción de señales activadas por receptor mediada por la fosfolipasa D. Se han descrito tres variantes de transcripción resultantes del corte y empalme alternativo que codifican otras tantas isoformas. La PPAP2C aparece regulada al alza en células madre mesenquimáticas humanas (MSC) primarias transformadas de adulto, así como en numerosos tipos de cáncer humano. Se baraja su implicación en la potenciación de la proliferación celular. La sobreexpresión de PPAP2C, pero no de un mutante catalíticamente inactivo, causó la entrada prematura en la fase S, acompañada de la acumulación prematura de ciclina A. La reducción de la expresión disminuye la proliferación celular retrasando la entrada en la fase S (Flanagan et al. 249-60).

Proteína S11 de la subunidad ribosómica 40S (RPS11)

Los ribosomas constan de la subunidad pequeña 40S y de la subunidad grande 60S. Juntas ambas subunidades están compuestas por 4 moléculas de ARN y aproximadamente 80 proteínas estructuralmente distintas. El gen RPS11 codifica una proteína ribosómica que es un componente de la subunidad 40S. El RPS11 es uno de los seis genes hallados en un cribado de marcadores de ARN fecal para el diagnóstico del cáncer colorrectal. Se ha hallado específicamente en los colonocitos fecales de pacientes con cáncer (Yajima et al. 1029-37).

Ubiquitina ligasaE3 de la familia de homólogos Siete *in absentia* 2 (SIAH2)

La SIAH2 es una ubiquitina ligasaE3. Entre sus sustratos se cuentan la beta-catenina, TRAF2 y DCC (ausente en el cáncer colorrectal) (Habelhah et al. 5756-65; Hu and Fearon 724-32; Nakayama, Qi, and Ronai 443-51). La SIAH2 también conduce a la degradación de la proteína nuclear repp86, lo cual desemboca en la abolición de la parada mitótica provocada por la sobreexpresión de esta proteína (Szczepanowski et al. 485-90). La SIAH2 muestra tanto propiedades promotoras del tumor como de las metástasis a través de por lo menos dos vías, revisadas por (Nakayama, Qi, and Ronai 443-51): En la primera, conduce a la ubiquitinización y la degradación de proteínas en la vía de respuesta a la hipoxia, lo que a su vez se traduce en el aumento de la actividad transcripcional de los factores inducibles por la hipoxia (HIF) (Nakayama, Qi, and Ronai 443-51) (Calzado et al. 85-91). En segundo lugar, suprime a Sprouty2, un inhibidor específico de la vía de señalización de Ras/ERK. La actividad SIAH2 está correlacionada con el desarrollo del tumor pancreático probablemente a través de su efecto positivo sobre la vía de señalización de Ras (Nakayama, Qi, and Ronai 443-51).

- 45 Aunque el papel de SIAH2 en el cáncer es algo controvertido, algunos informes señalan la relación entre los niveles bajos de SIAH2 con un pronóstico o una respuesta terapéutica peor (Confalonieri et al. 2959-68) (Jansen et al. 263-71), otros indican una función oncogénica (Frasor et al. 13153-57). La inhibición de SIAH2 ha sido considerada como un tratamiento antitumoral, puesto que se ha demostrado que inhibe el crecimiento de xenoinjertos en modelos de melanoma en ratón (Qi et al. 16713-18; Shah et al. 799-808), y en estirpes de células de cáncer de pulmón humano injertadas a ratones atímicos (Ahmed et al. 1606-29).

Transportador de taurina dependiente de cloruro y sodio (SLC6A6)

La SLC6A6 es un transportador de taurina dependiente de cloruro y sodio (TauT) (Han et al., 2006). Los ratones en que se ha inactivado el transportador de la taurina (taut^{-/-}) sufren hepatopatía crónica por la carencia de taurina, que puede implicar disfunción mitocondrial (Warskulat et al., 2006). La expresión de SLC6A6 está reprimida por el gen supresor de tumores p53 y es transactivada por protooncogenes como WT1, c-Jun y c-Myb. La sobreexpresión de SLC6A6 protege a las células renales de la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino (Han et al., 2006; Han and Chesney, 2009). La expresión del ARNm de SLC6A6 apareció regulada al alza por el factor de necrosis tumoral alfa

55

(TNF-alfa) en células del epitelio intestinal humano Caco-2 (Mochizuki et al., 2005).

Proteína unida a ubiquinol-citocromo c reductasa (UQCRB)

5 La proteína codificada por el gen UQCRB forma parte del complejo de la ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa. Se une a la ubiquinona y participa en la transferencia de electrones. Las mutaciones de este gen están asociadas con la deficiencia en el complejo mitocondrial III. Un pseudogén ha sido descrito en el cromosoma X.

El gen UQCRB puede ser un oncogén potencial o un gen supresor de tumores en el adenocarcinoma ductal pancreático (Harada et al. 13-24). Se ha hallado sobreexpresado en el carcinoma hepatocelular (Jia et al. 1133-39).

Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (ERBB3)

10 El ERBB3 codifica un miembro de la familia de tirosina-cinasas de receptor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Es activado por las neuroregulinas, por otros receptores ERBB y no ERBB, así como por otras cinasas, y a través de mecanismos novedosos. En pasos posteriores (*downstream*) interactúa sobre todo con la vía de la fosfoinositol 3-cinasa/supervivencia AKT/mitógena, pero también con GRB, SHC, SRC, ABL, rasGAP, SYK y el regulador de la transcripción EBP1 (Sithanandam and Anderson 413-48). La sobreexpresión del ERBB3 se ha constatado en muchos tipos de cáncer entre ellos el cáncer gástrico, donde podría jugar un papel etiológico clave e influye negativamente en el pronóstico (Kobayashi et al. 1294-301)(Slesak et al. 2727-32). (Zhang et al. 2112-18) hallaron que la sobreexpresión del ERBB3 era más frecuente en el cáncer gástrico de tipo difuso (26,2%) que en el tipo intestinal (5,0%). En ambos tipos la sobreexpresión estaba asociada con un pronóstico malo. Las estrategias dirigidas contra elERBB3 en el tratamiento contra el cáncer incluyen aptámeros de ARN contra el dominio extracelular (Chen et al. 9226-31), el bloqueo de su expresión génica mediante factores de transcripción sintéticos (Lund et al. 9082-91), inhibidores que son moléculas pequeñas como el isómero de la vitamina E γ -tocotrienol (Samant and Sylvester 563-74), ARNm (Scott et al. 1479-86) y ARNs (Sithanandam et al. 1847-59).

Prominina 1 (Prom1)

25 Función: La prominina-1, también llamada CD133, fue identificada como una molécula específica de las células madre hematopoyéticas CD34+ (Yin et al., 1997) y ha demostrado ser un marcador de las células madre normales y de las células madre cancerosas (CSC) en diversos tejidos. Está localizada principalmente en las proyecciones de la membrana plasmática, y podría intervenir en la organización de la topología de la membrana o en el mantenimiento de la composición lipídica de la membrana plasmática. Se ha sugerido que una isoforma de corte y empalme de la prominina-1 llamada AC133-2 y que carece de un pequeño exón de 27 aminoácidos podría ser un marcador de células madre aún mejor (Mizrak et al., 2008; Bidlingmaier et al., 2008).

30 Solo un pequeño porcentaje de células tumorales suele ser positivo para la prominina-1, como cabe esperar de un marcador de CSC. Según el tipo de tumor, el número de células positivas por masa tumoral varía entre el 1% y el 15% siendo mayoritariamente de en torno al 2%.

35 La prominina-1 ha sido asociada con la formación del tumor, la angiogénesis y la quimiorresistencia (Zhu et al., 2009a) (Bruno et al., 2006; Hilbe et al., 2004) (Bertolini et al., 2009). No obstante, las células positivas para la prominina-1 pueden ser dianas del sistema inmunitario, puesto que son destruidas por las células NK (Castriconi et al., 2007; Pietra et al., 2009) y los linfocitos T citotóxicos (Brown et al., 2009).

40 Si bien en muchas entidades tumorales se ha demostrado que las células positivas para la prominina-1 son funcionalmente CSC y su expresión ha sido asociada con frecuencia con un pronóstico malo, todavía existe controversia. Algunos informes afirman que la identificación de CSC no es ni necesaria ni suficiente (Cheng et al., 2009; Wu and Wu, 2009). Posiblemente la combinación de la prominina-1 con otras moléculas como la CD44, o incluso combinaciones múltiples como prom1(+), CD34(+), CD44(+), CD38(-), CD24(-) sirva como buenos marcadores de CSC (Zhu et al., 2009b; Fulda and Pervaiz, 2010).

45 En el cáncer gástrico difuso se ha sugerido la expresión de PROM1 por un análisis informático (Katoh and Katoh, 2007) y se ha descrito la sobreexpresión en el cáncer gástrico en comparación con el tejido estomacal normal a nivel de la proteína (Smith et al., 2008). Con todo, (Boegl and Prinz, 2009) describieron que la expresión de la prominina-1 estaba reducida en el cáncer gástrico, sobre todo en los estadios avanzados, y afirmaron que su expresión estaba más correlacionada con la angiogénesis –que también aparece reducida en los estadios avanzados– que con el crecimiento del tumor. Un estudio con estirpes celulares de cáncer gástrico (Takaishi et al., 2009) indica que la CD44, pero no la prominina-1, es un marcador de CSC para el cáncer gástrico.

50 Metaloproteinasas de la matriz 11 (MMP11)

55 A semejanza de otras MMP, la MMP11 es una endopeptidasa que interviene en procesos que requieren la remodelación de tejidos, tales como el desarrollo, la curación de heridas y la formación de la cicatriz. También podría regular negativamente la homeostasis de las grasas al reducir la diferenciación de los adipocitos. En contraste con otras MMP, no puede hidrolizar moléculas características de la matriz extracelular, excepto el colágeno VI. No obstante, se han descubierto otros sustratos como la alfa 2-macroglobulina, ciertos inhibidores de proteasas de

serina (serpinas) como la alfa-1-antitripsina, la proteína 1 de unión al factor de crecimiento insulinoide y el receptor de la laminina. En el cáncer, la MMP11 se expresa mayoritariamente en las células estromales que rodean el tejido tumoral. Esto se ha demostrado en numerosas entidades tumorales. Se ha afirmado que la MMP11 se sobreexpresa en el estroma de la mayoría de los carcinomas invasivos humanos, pero raramente en sarcomas y en otros tumores no epiteliales. En la mayoría de casos, aunque no en todos, la MMP11 se expresa en las células del estroma directamente adyacentes al tumor, mientras que las células tumorales, los tejidos normales y las células estromales alejadas del tumor son negativas. Las concentraciones elevadas de MMP11 están correlacionadas con un fenotipo maligno/gran invasividad y un pronóstico malo. Con todo, en casos de carcinoma papilar de tiroides, la expresión de la MMP11 apareció inversamente relacionada con la naturaleza agresiva del tumor. La MMP11 se ha hallado tanto en el tejido tumoral como en el suero sanguíneo de pacientes con cáncer gástrico, y su expresión está correlacionada con la metástasis (Yang et al.). Asimismo, (Deng et al. 274-81) demostraron que la MMP11 se expresa mucho en estirpes de células tumorales y en tumor primario de cáncer gástrico –en contraste con otros tipos de cáncer no exclusivamente en el estroma– y que aparentemente potencia la proliferación de las células tumorales.

Subunidad beta del factor de transcripción nuclear Y (NFYB)

La NFYB, denominada también CBF-B o CBF-A es, aparte de la NFYA y la NFYC, un componente del factor de transcripción basal heterotrimérico NF-Y (también factor de unión a CCAAT o CBF) que se une a los motivos CCAAT –o los motivos complementarios, ATTGG, llamados caja Y– presentes en los promotores y en los intensificadores (*enhancers*) de numerosos genes. Entre los genes diana de NF-Y se encuentran genes de MHC de clase II, el receptor del PDGF beta, varias proteínas de choque térmico, el gen de reparación de emparejamientos erróneos hMLH1 y la topoisomerasa II alfa.

El NFYB no es un oncogén clásico, pero su función podría contribuir a la oncogénesis. En primer lugar, muchos genes del ciclo celular como la ciclina A, la ciclina B1, Aurora A y cdk1 son dianas del NF-Y. Las células quedan detenidas en la fase G2/M si el NFYB no es funcional. (Park et al.) demuestran que la regulación al alza de la ciclina B2 y de otros genes relacionados con el ciclo celular en el adenocarcinoma colorrectal es debida a la actividad del NF-Y. En segundo lugar, la actividad del NF-Y impide la apoptosis. Las células que carecen de NF-Y sufren la apoptosis debido a la activación de p53 y a la reducción de la transcripción de genes anti-apoptóticos cuyos promotores contienen cajas CCAAT, como Bcl-2 (Benatti et al. 1415-28). En tercer lugar, sus propiedades oncogénicas se ven potenciadas en combinación con otros factores de transcripción. Por ejemplo, la p53 mutada se une a las proteínas NF-Y y p300, lo que aumenta la expresión de los genes del ciclo celular inducidos por la NF-Y.

ABL1

La proteína tirosina-cinasa c-Abl transita entre el núcleo y el citoplasma de la célula. La c-Abl nuclear interviene en la inhibición del crecimiento celular y en la apoptosis, en tanto que la c-Abl citoplasmática puede intervenir en la dinámica de la actina, la morfogénesis y la transducción de señales inducida por estímulos extracelulares como los generados por factores de crecimiento y por ligandos de integrinas. Se ha descrito que la c-Abl citoplasmática promueve la mitogénesis.

La actividad de la proteína c-Abl está regulada negativamente por su dominio SH3 y la delección de este dominio transforma el ABL1 en un oncogén. En la leucemia mieloide crónica (LMC) el gen se activa por translocación dentro del gen BCR (*breakpoint cluster region*; región de agrupamiento de fracturas) situado en el cromosoma 22. La proteína de fusión resultante BCR-ABL se localiza en el citosol y permite a las células proliferar sin ser reguladas por las citocinas (Zhao et al.). La actividad de la c-Abl también está regulada al alza en tumores sólidos, tal y como se ha demostrado en el carcinoma de mama y en el NSCLC. La sobreexpresión no es suficiente y la actividad cinasa constitutiva exige la fosforilación de la proteína. En las células de cáncer de mama, la fosforilación de la c-Abl es inducida por las tirosina-cinasas de la membrana plasmática, entre ellas las SFK, los miembros de la familia del EGFR y el receptor del IGF-1. No se han detectado proteínas de fusión ABL en tumores sólidos (Lin and Arlinghaus, 2008). Se ha demostrado que el ABL se expresa en el carcinoma gástrico y en los microvasos asociados, lo cual plantea su posible papel en la angiogénesis. Resulta destacable que el gen A asociado a la citotoxina de *H. pylori* (CagA) conduce a la activación de la c-Abl, que a su vez fosforila el EGFR, lo cual bloquea la endocitosis del EGFR (Bauer, Bartfeld, and Meyer 156-69). Varios inhibidores de tirosina-cinasas son más o menos específicos de la Abl. El imatinib (Gleevec) se utiliza como tratamiento de primera línea contra la LMC y también ha sido aprobado para pacientes con tumores estromales gastrointestinales (GIST) avanzados, puesto que una de sus dianas es KIT (Pytel et al. 66-76)(Croom and Perry, 2003). Otros inhibidores utilizados en oncología son el dasatinib y el nilotinib (Pytel et al. 66-76)(Deremer, Ustun, and Natarajan 1956-75).

Cinasa similar a Polo 4 (Plk4)

Los miembros de la familia de la cinasa Polo (Plk1-4) son importantes durante la división celular, puesto que regulan varias etapas durante la mitosis. La Plk4 es una organizadora de la formación y la duplicación del centriolo (Rodrigues-Martins et al. 1046-50). Si bien la Plk1 es sin duda un oncogén, la función de la Plk4 en el cáncer es ambigua. La regulación a la baja y la sobreexpresión de la Plk4 han sido asociadas con el cáncer en el ser humano, el ratón y la mosca (Cunha-Ferreira et al. 43-49). Por ejemplo, en el cáncer colorrectal la Plk4 se ha hallado sobreexpresada, pero un pequeño grupo de pacientes presentó una fuerte regulación a la baja de la misma

(Macmillan et al. 729-40). Ello se puede explicar por el hecho de que tanto la sobreexpresión como la deficiencia de Plk4 conducen a la formación de un centríolo aberrante, que a su vez desemboca en un número anormal de centrosomas y estructuras que con frecuencia se detectan en células tumorales y que contribuyen a las aberraciones mitóticas causantes de la segregación desigual de los cromosomas y la aneuploidía (Peel et al. 834-43). (Kuriyama et al. 2014-23). (Korzeniewski et al. 6668-75).

Proteína 3 activadora de GTPasa portadora de motivo IQ (IQGAP3)

La IQGAP participa en vías de señalización celular, así como en la arquitectura del citoesqueleto y la adhesión celular. Posee un dominio cuya secuencia es similar a la de las RasGAP y, por tanto, se une a GTPasas pequeñas. Con todo (pese a su nombre), ninguna de ellas activa las GTPasas. En el caso de IQGAP1 y de IQGAP2 se ha demostrado que incluso estabilizan el estado de unión a GTP de Rac1 y de Cdc42, y sobre la IQGAP3 se ha planteado que estabiliza la Ras activada (Nojima et al. 971-78; White, Brown, and Sacks 1817-24). A través de su dominio IQ se unen al calcio/calmodulina y, a través de su dominio homólogo a la calponina, a los filamentos de actina (White, Brown, and Sacks 1817-24). Las IQGAP han sido implicadas en el cáncer. La IQGAP1 se considera un oncogén. Estimula varias vías vinculadas con el cáncer como las vías de señalización mediadas por la MAP-kinasa, la beta-catenina y el VEGF, y aparece sobreexpresada en muchos tumores. La IQGAP2 parece actuar como supresora de tumores y se ha hallado reducida en casos de cáncer gástrico con mal pronóstico (White, Brown, and Sacks 1817-24). Existe muy poca información sobre la IQGAP3. (Skawran et al. 505-16) la hallaron entre los genes regulados al alza en el carcinoma hepatocelular. Dos estudios describen que la IQGAP3 se expresa específicamente en las células proliferantes (Ki67+) del intestino delgado, colon e hígado de ratón (Nojima et al. 971-78)(Kunimoto et al. 621-31).

Portadora 88a de dominio superhelicoidal (CCDC88A)

La CCDC88A es un sustrato de Akt que se une a actina y que interviene en la organización de la actina y en la motilidad celular dependiente de Akt en los fibroblastos. La vía de la CCDC88A/Akt también es esencial en la angiogénesis postneonatal mediada por el VEGF.

La CCDC88A también se expresa mucho en diversos tejidos malignos humanos, como en los carcinomas de mama, colon, pulmón y cuello uterino. Desempeña un papel importante en la progresión tumoral con activación aberrante de la vía de señalización de la Akt.

Ciclina B1 (CCNB1)

La CCNB1 es inducida durante la fase G2/M de la mitosis y forma el factor promotor de la mitosis (MPF) junto con la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1)/Cdc2. La sobreexpresión se ha constatado en diversos tipos de cáncer y con frecuencia está asociada con un mal pronóstico, p. ej. en el cáncer de mama (Aaltonen et al., 2009; Agarwal et al., 2009; Suzuki et al., 2007), meduloblastoma (de et al., 2008), NSCLC (Cooper et al., 2009), cáncer de cuello de útero (Zhao et al., 2006), y otros. Fue uno de los genes incluidos en un grupo de 11 genes distintivos que resultaron predecir un plazo corto para la recurrencia en pacientes con 12 tipos distintos de cáncer (Gliinsky, 2006). No se halló información específica en referencia al cáncer gástrico.

Ciclina D2 (CCND2)

A semejanza de otras ciclinas de tipo D (D1 y D3), la CCND2 se une y activa a la cinasa dependiente de ciclina 4 (Cdk4) o a la Cdk6. Ello es necesario para la transición G1/S. La CCND2 se ha hallado sobreexpresada en muchos tumores, entre ellos tumores de testículo y ovario (Sicinski et al., 1996), neoplasias malignas hematológicas (Hoglund et al., 1996; Gesk et al., 2006) y cáncer gástrico, donde puede estar causada por la infección por *H. pylori* y asociada a un pronóstico malo (Yu et al., 2003). (Yu et al., 2001) (Oshimo et al., 2003) (Takano et al., 1999) (Takano et al., 2000).

Ciclina E2 (CCNE2)

La CCNE2 se une y activa a la Cdk2, como la otra ciclina de tipo E, la CCNE1. Dicha actividad alcanza su máximo en la transición de las fases G1/S. En condiciones normales, la CCNE2 no es detectable en las células quiescentes y solo se encuentra en los tejidos que se están dividiendo activamente (Payton and Coats, 2002). A menudo se expresa de forma aberrante en el cáncer, p. ej. en el de mama, donde está correlacionada con un pronóstico malo (Desmedt et al., 2006; Ghayad et al., 2009; Payton et al., 2002; Sieuwerts et al., 2006), y en el cáncer de próstata metastásico (Wu et al., 2009).

Moléculas de adhesión celular relacionadas con antígeno carcinoembriónico 1, 5 y 6 (CEACAM 1, 5 y 6)

Las CEACAM son glucoproteínas ancladas a la membrana que median en las interacciones entre células y activan las vías de señalización de las integrinas (Chan and Stanners, 2007). También pueden actuar como receptores para patógenos como *E. coli* (Berger et al., 2004) (Hauck et al., 2006) y están involucradas en la regulación inmunitaria (Shao et al., 2006).

- La CEACAM5 y la CEACAM6 tienen funciones pro-oncogénicas. Inhiben la anoikis (Ordonez et al., 2000), promueven la metástasis (Marshall, 2003; Ordonez et al., 2000), y alteran la polarización celular y la arquitectura tisular (Chan and Stanners, 2007). El papel de la CEACAM1 en el cáncer es ambiguo. Tal vez actúe como un supresor de tumores en los estadios iniciales y contribuya a la formación de metástasis, la elusión del sistema inmunitario y la angiogénesis en fases posteriores (Hokari et al., 2007; Liu et al., 2007; Moh and Shen, 2009). Su función depende de la isoforma, puesto que la CEACAM1 tiene 11 variantes de corte y empalme, cuya proporción determina el resultado de la señalización (Gray-Owen and Blumberg, 2006; Leung et al., 2006; Neumaier et al., 1993; Nittka et al., 2008). La proporción de las variantes de corte y empalme puede estar alterada en el cáncer (Gaur et al., 2008).
- La CEACAM5 o la CEACAM6 o ambas están sobreexpresadas hasta en el 70% de los tumores humanos, con frecuencia vinculadas a un pronóstico malo (Chan and Stanners, 2007; Chevinsky, 1991). La CEACAM5 en suero es un marcador clínico establecido del carcinoma de colon y de recto; las concentraciones altas indican un pronóstico malo o recurrencia (Chevinsky, 1991; Goldstein and Mitchell, 2005). También ha sido propuesta como marcador de otras entidades como el cáncer gástrico, pero con una potencia pronóstica limitada (Victorzon et al., 1995). La CEACAM1 puede estar regulada al alza o a la baja en el cáncer, dependiendo de la entidad (Kinugasa et al., 1998) (Dango et al., 2008) (Simeone et al., 2007). (Han et al., 2008) hallaron niveles abundantes de CEACAM5 y CEACAM6 en nueve estirpes de células de cáncer gástrico, mientras que la CEACAM1 fue indetectable. En cambio, un análisis de muestras de tumor primario de 222 pacientes reveló tinción citoplasmática o en membrana de la CEACAM1. La forma ligada a la membrana estuvo relacionada con la potenciación de la angiogénesis (Zhou et al., 2009). Además, el estudio efectuado por (Kinugasa et al., 1998) demostró la regulación al alza en adenocarcinomas gástricos.
- En algunos tumores, CEACAM1 está regulada a la baja en las células tumorales, lo que conduce a la regulación al alza del VEGF, y este factor o las condiciones hipóxicas pueden inducir a la CEACAM1 en el endotelio adyacente. En consonancia con lo anterior, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la CEACAM1 bloqueó la formación del tubo endotelial inducida por el VEGF (Oliveira-Ferrer et al., 2004; Tilki et al., 2006; Ergun et al., 2000).
- Especialmente la CEACAM5 ha sido analizada como diana de fármacos contra el cáncer, entre otros con vacunas. Estos estudios han demostrado que la CEACAM5 puede ser una diana de reacciones de inmunidad celular (Cloosen et al., 2007; Marshall, 2003). Hay disponible un resumen sobre los epítomos de linfocitos T de la CEACAM5 en (Sarobe et al., 2004).
- Canal del cloruro 3 (CLCN3)
- El CLCN3 es un canal de Cl⁻ que puede estar regulado por volumen y contribuir al descenso regulado del volumen (RVD) que ocurre como reacción al aumento del volumen celular en situaciones como el ciclo celular o la hipoosmosis (Lemonnier et al., 2004; Sardini et al., 2003). Con todo, este punto resulta controvertido (Wang et al., 2004) y el canal reductor de volumen activado durante la apoptosis es distinto del CLCN3 (Okada et al., 2006).
- La expresión del CLCN3 cambia durante el ciclo celular, alcanzado el máximo en la fase S (Wang et al., 2004). Las corrientes del CLCN3 podrían ser importantes en procesos relevantes del cáncer en entidades en que el CLCN3 aparece regulado al alza, como el glioma: Las células tumorales necesitan manipular aumentos del volumen proliferativo y disponer de condiciones hipoosmóticas, p. ej. en el edema peritumoral (Ernest et al., 2005; Olsen et al., 2003; Sontheimer, 2008).
- Además, se ha descrito que el CLCN3 potencia la resistencia al etopósido al aumentar la acidificación del compartimiento endocítico tardío (Weylandt et al., 2007).
- La regulación a la baja mediante ARNsi del CLCN3 redujo la migración de células de carcinoma nasofaríngeo *in vitro* (Mao et al., 2008).
- DNAJC10
- La DNAJC10 pertenece a un complejo de degradación supramolecular asociado al RE (ERAD) que reconoce y despliega las proteínas mal plegadas para asegurar su retrotranslocación (Ushioda et al., 2008). La proteína aparece elevada en el carcinoma hepatocelular (Cunnea et al., 2007). La regulación a la baja de la DNAJC10 mediante ARNsi en células de tumor neuroectodérmico aumentó la respuesta apoptótica al antineoplásico fenretinida (Corazzari et al., 2007). Se ha demostrado que la ERdj5 reduce la supervivencia de las células de neuroblastoma al regular a la baja la respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR) (Thomas and Spyrou, 2009).
- Factor de iniciación de la traducción eucariótica 2, subunidad 3 gamma (EIF2S3)
- El EIF2S3 es la subunidad más grande de un complejo proteico (EIF2) que recluta el metionil-ARNt inicial en la subunidad ribosómica 40S (Clemens, 1997). La acción de las cinasas que regulan a la baja la actividad del EIF, como la proteína cinasa dependiente de ARN (PKR), puede ser proapoptótica y supresora de tumores (Mounir et al., 2009). En el cáncer gástrico se han descrito niveles altos de EIF2 fosforilada y sin fosforilar, y se ha observado la redistribución hacia el núcleo. Esta desregulación apunta a la implicación del EIF2-alfa en el cáncer gastrointestinal

(Lobo et al., 2000).

Factor de iniciación de la traducción eucariota 3, subunidad L (EIF3L)

La EIF3L es una de las 10-13 subunidades del EIF3, que está asociado con la subunidad pequeña del ribosoma. El EIF3 interviene en la abolición de la unión prematura de la subunidad grande del ribosoma. La EIF3L es una de las cinco subunidades que han sido consideradas como prescindibles para la formación del EIF3 (Masutani et al., 2007). Un cribado con una genoteca antisentido apunta a que la regulación a la baja de la EIF3L potenciaría la actividad antioncogénica del 5-fluorouracilo en células de carcinoma hepatocelular (Doh, 2008).

Epiplaquina 1 (EPPK1)

El EPPK1 es un gen de la familia de las plaquinas cuyas funciones se desconocen en gran medida. Los genes de las plaquinas son conocidos por intervenir en la interconexión de los filamentos del citoesqueleto y en su anclaje a la unión adhesiva asociada a la membrana plasmática (Yoshida et al., 2008).

Receptor acoplado a proteína G 39 (GPR39)

El GPR39 es un receptor acoplado a proteína G que se cree que está implicado en la función gastrointestinal y metabólica (Yamamoto et al., 2009). Su vía de señalización activa el AMPc y elementos de respuesta del suero (Holst et al., 2004). El ligando endógeno del GPR39 probablemente sea el zinc (Chen and Zhao, 2007). El GPR39 es un nuevo inhibidor de la muerte celular, que podría suponer una diana terapéutica con implicaciones en procesos que comportan la apoptosis y el estrés del retículo endoplasmático como el cáncer (Dittmer et al., 2008). El GPR39 apareció regulado al alza en micromatrices de HFk de riñón fetal humano y en xenoinjertos de tumor de Wilms con células *stem-like* enriquecido con blastema (Metsuyanin et al., 2009), así como en una estirpe de células del hipocampo resistente a diversos estimuladores de la muerte celular (Dittmer et al., 2008).

ERBB2/HER2/NEU

El ERBB2 pertenece a la familia de tirosina-quinasas de receptor del EGFR. Su ligando se desconoce, pero es la pareja de heterodimerización preferida de otros miembros de la familia de HER (Olayioye, 2001). En los carcinomas, el HER2 actúa como oncogén, principalmente porque la amplificación de alto nivel del gen induce la sobreexpresión de la proteína en la membrana celular y la consiguiente adquisición de propiedades ventajosas para la célula maligna (Slamon et al., 1989). La sobreexpresión se observa en cierto porcentaje de numerosos tipos de cáncer, incluido el cáncer gástrico. En la mayoría de los casos está asociada con un mal pronóstico (Song et al., 2010) (Yonemura et al., 1991) (Uchino et al., 1993) (Mizutani et al., 1993).

La ERBB2 es la diana del anticuerpo monoclonal trastuzumab (comercializado como Herceptin), que ha sido sugerido como opción terapéutica para pacientes con cáncer gástrico avanzado HER2-positivo, en combinación con quimioterapia (Meza-Junco et al., 2009; Van Cutsem et al., 2009). Otro anticuerpo monoclonal, el pertuzumab, que inhibe la dimerización de los receptores HER2 y HER3, se encuentra en estudios clínicos avanzados (Kristjansdottir and Dizon, 2010). La sobreexpresión selectiva de HER2 y HER3 en los dos tipos histológicos de cáncer gástrico (tipo intestinal y tipo difuso) está estrechamente asociada con un mal pronóstico (Zhang et al., 2009).

Integrina beta-4 (ITGB4)

Las integrinas intervienen en la adhesión celular, así como en la transducción de señales desde el exterior de la célula al interior y viceversa. La subunidad beta-4 de la integrina forma un heterodímero con la subunidad alfa-6. La integrina resultante promueve la formación de hemidesmosomas entre el citoesqueleto intracelular de queratina y la membrana basal (Giancotti, 2007). La integrina beta-4 cumple una función doble en el cáncer, puesto que media la adhesión estable por un lado y la señalización pro-invasiva (vías de Ras/Erk y PI3K) y la angiogénesis por el otro (Giancotti, 2007; Raymond et al., 2007). Aparece sobreexpresada en muchos tumores, así como en células endoteliales angiogénicas, a menudo en correlación con la progresión y la metástasis. Se han detectado niveles altos en el cáncer gástrico, sobre todo en células invasoras del estroma (Giancotti, 2007; Tani et al., 1996). Con todo, aparece regulada a la baja en el carcinoma gástrico de tipo indiferenciado a medida que el tumor profundiza en la invasión, posiblemente debido a la transición gradual entre el epitelio y el mesénquima, puesto que la integrina beta-4 es una integrina epitelial (Yanchenko et al., 2009).

Lipocalina (LCN2)

La LCN2 o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) es una proteína reguladora del hierro presente en forma de monómero, homodímero o como un heterodímero unido por enlaces disulfuro con la MMP9 (Coles et al., 1999; Kjeldsen et al., 1993). La expresión aumenta en varios tipos de cáncer, en ciertos casos asociada con progresión. Mecanicísticamente, puede estabilizar la MMP9 y alterar la adhesión entre células mediada por la cadherina E, lo cual aumenta la invasividad. Los complejos de la MMP-9 con la LCN2 estuvieron relacionados con una peor supervivencia en el cáncer gástrico (Kubben et al., 2007) (Hu et al., 2009). Aunque se ha observado un claro efecto pro-tumoral en diversos tumores en seres humanos, algunos estudios han demostrado que la LCN2 puede inhibir el factor pro-neoplásico HIF-1alfa, la fosforilación de FA-cinasa y también la síntesis del VEGF, todo lo

cual apunta a que, en condiciones alternativas, paradójicamente la LCN2 también ejerce un efecto antitumoral y antimetastásico en neoplasias de colon, ovario y páncreas, por ejemplo. (Bolignano et al., 2009; Tong et al., 2008). La LCN2 puede ser útil para inhibir la angiogénesis tumoral, además de para suprimir la metástasis tumoral, en tumores que presentan activación de ras (Venkatesha et al., 2006).

5 Complejo de la succinato-deshidrogenasa, subunidad C (SDHC)

La SDHC es una de las cuatro subunidades codificadas en el núcleo de la succinato-deshidrogenasa (complejo mitocondrial II), que transfiere los electrones del succinato a la ubiquinona, dando como resultado fumarato y ubiquinol. La deficiencia de succinato-deshidrogenasa puede causar GIST (McWhinney et al., 2007). Los tumores estromales gastrointestinales familiares podrían estar causados por mutaciones en los genes de las subunidades SDHB, SDHC y SDHD, y los paragangliomas abdominales asociados con tumores gastrointestinales podrían estarlo únicamente por mutaciones de la SDHC (Pasini et al., 2008). En ratones transgénicos la proteína SDHC mutante genera estrés oxidativo y puede contribuir al daño del ADN nuclear, la mutagénesis y, en última instancia, la oncogénesis (Ishii et al., 2005). La succinato-deshidrogenasa es considerada un supresor de tumores (Baysal, 2003; Gottlieb and Tomlinson, 2005). La reducción de los niveles de este complejo enzimático puede derivar en oncogénesis (Eng et al., 2003).

Cinasa de unión a PDZ (PBK)

La PBK es una MAPKK relacionada con las MEK3/6 que activa la cinasa MAP p38, p. ej. en pasos posteriores (*downstream*) de los receptores de factores de crecimiento (Abe et al., 2000; Ayllon and O'connor, 2007). La JNK podría ser una diana secundaria (Oh et al., 2007). Como en los adultos la PBK se expresa en el testículo (véase abajo), se ha propuesto su implicación en la espermatogénesis (Abe et al., 2000; Zhao et al., 2001). Aparte de lo anterior, contribuye a la proliferación y a la resistencia contra la apoptosis mostradas por las células tumorales: Se fosforila y activa durante la mitosis, pasos necesarios para la formación del huso mitótico y la citocinesis (Gaudet et al., 2000; Matsumoto et al., 2004; Park et al., 2009) (Abe et al., 2007). Otras funciones de promoción del crecimiento y antiapoptóticas incluyen la regulación a la baja de la p53 y la fosforilación de las histonas (Park et al., 2006; Zykova et al., 2006) (Nandi et al., 2007). La PBK ha sido clasificada como un antígeno de cáncer-testículo (Abe et al., 2000; Park et al., 2006) y se ha encontrado sobreexpresada en muchos tipos de cáncer.

Polimerasa (dirigida por ADN), delta 3, subunidad accesoria (POLD3)

El complejo de la ADN-polimerasa delta está implicado en la replicación y en la reparación del ADN. Consta del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), el factor de replicación formado por múltiples subunidades C y las 4 subunidades del complejo polimerasa: POLD1, POLD2, POLD3 y POLD4 (Liu and Warbrick, 2006). La POLD3 juega un papel esencial en el reciclado eficiente del PCNA durante los ciclos de disociación-asociación de la polimerasa delta durante la fase de elongación de la replicación del ADN (Masuda et al., 2007).

Subunidad 26S (Prosome, macropaína) del proteosoma, no ATPasa, 14 (PSMD14)

La PSMD14 es un componente del proteosoma 26S. Pertenece al complejo 19S (tapa 19S; PA700), que es responsable de la desubiquitinización del sustrato durante la degradación proteosómica (Spataro et al., 1997). La sobreexpresión de la PSMD14 en células de mamífero afecta a la proliferación celular y a la respuesta a fármacos citotóxicos como la vinblastina, el cisplatino y la doxorubicina (Spataro et al., 2002). La supresión con ARNs de PSMD14 en células HeLa derivó en la reducción de la viabilidad celular y en un aumento de los niveles de proteínas poliubiquitinizadas (Gallery et al., 2007). La regulación a la baja de PSMD14 por ARNs ejerció un impacto considerable en la viabilidad celular causando la parada del ciclo celular en la fase G0-G1, lo que en última instancia acabó precipitando la senescencia (Byrne et al., 2010).

Subunidad 26S (Prosome, macropaína) del proteosoma, ATPasa, 2 (PSMC2)

La PSMC2 forma parte del sistema proteosómico 26S. Es un miembro de la familia de ATPasas triple A, cuya actividad es similar a la de las chaperonas. Esta subunidad ha demostrado interactuar con varios factores de transcripción basales por lo que, además de la participación en las funciones del proteosoma, esta subunidad podría participar en la regulación de la transcripción. Se ha demostrado que el sistema del proteosoma 26S en el músculo esquelético puede ser activado por el TNF-alfa (Tan et al., 2006). En ratones transgénicos HBx, que son portadores del gen regulador de la hepatitis B HBx en su línea germinal, y contraen el carcinoma hepatocelular, la PSMC2 y otras subunidades proteosómicas están reguladas al alza en los tejidos tumorales (Cui et al., 2006). Los niveles de ARNm de la subunidad ATPasa PSMC2 del complejo 19S aumentan en la caquexia por cáncer (Combaret et al., 1999).

Proteína tirosina-cinasa 2 (PTK2)

La PTK2 es una tirosina-cinasa no ligada a receptor que modula la vía de señalización de las integrinas y podría promover el crecimiento y la progresión tumorales, así como la metástasis ((Giaginis et al., 2009); (Hauck et al., 2002); (Zhao and Guan, 2009)). Se ha sugerido que la PTK2 es un marcador de la oncogénesis y de la progresión del cáncer (Su et al., 2002; Theocharis et al., 2009; Jan et al., 2009). Aparece sobreexpresada y/o con actividad

aumentada en una amplia variedad de tipos de cáncer humano, entre ellos el cáncer gástrico. La PTK2 también transduce señales procedentes del receptor de la gastrina, lo que contribuye a la proliferación de las células del cáncer gástrico (Li et al., 2008b). Se ha demostrado que el 8% de los carcinomas gástricos son portadores del virus de Epstein-Barr (EBV). Sublíneas de estirpes de células de cáncer gástrico humano infectadas por el EBV presentan un aumento de la fosforilación de la PTK2 (Kassis et al., 2002). El nivel de fosforilación de tirosinas de PTK2 en células epiteliales gástricas es reducido por el producto de *Helicobacter pylori* cagA-positivo.

Tetraspanina 1 (TSPAN1) y tetraspanina 8 (TSPAN8)

La TSPAN1 y la TSPAN8 pertenecen a la familia de las tetraspaninas que se caracterizan por la posesión de cuatro dominios transmembrana y sendos extremos intracelulares N- y C-terminal y que intervienen en diversos procesos como la adhesión, la motilidad y la activación celular y la invasión del tumor. A menudo forman grandes complejos moleculares con otras proteínas como las integrinas en la superficie celular (Tarrant et al., 2003; Serru et al., 2000). Las funciones de la TSPAN1 se desconocen pero podría intervenir en la secreción (Scholz et al., 2009). La TSPAN1 aparece sobreexpresada en varios tipos de cáncer, a menudo en correlación con el estadio, la progresión y un desenlace clínico malo. Es notable que se haya descrito sobreexpresión en el 56,98% de 86 casos de carcinoma gástrico y que la sobreexpresión estuviera correlacionada positivamente con el estadio clínico, la infiltración y el estado ganglionar y negativamente con las tasas de supervivencia y el grado de diferenciación del tumor (Chen et al., 2008). El TSPAN8 ha sido descrito como un gen asociado a la metástasis en muchos tipos de tumores (PMID: 16467180). En el cáncer gastrointestinal, la expresión de TSPAN8 está asociada con un pronóstico malo (PMID: 16849554).

Proteína con dedos de zinc 598 (ZNF598)

La ZNF598 es una proteína con dedos de zinc de función desconocida.

Desintegrina y metaloproteínasa 10 (ADAM10)

La ADAM10 interviene en la angiogénesis, el desarrollo y la oncogénesis. Aparece sobreexpresada en el carcinoma gástrico. Varios inhibidores de ADAM selectivos contra la ADAM-10 están siendo objeto de estudios clínicos para el tratamiento del cáncer. (PMID: 19408347)

Metaloproteínasa de la matriz 12 (MMP12)

La MMP12 es una endopeptidasa de zinc que degrada la elastina y muchas otras proteínas de la matriz y ajenas a ésta y que está implicada en la migración de los macrófagos y en la inhibición de la angiogénesis (Chakraborti et al., 2003; Chandler et al., 1996; Sang, 1998). También interviene en procesos patológicos de destrucción de tejidos como el asma, el enfisema y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la artritis reumatoide y el crecimiento tumoral (Cataldo et al., 2003; Wallace et al., 2008). Los inhibidores de la MMP12 son objeto de debate como agentes para el tratamiento de esas enfermedades (Churg et al., 2007; Norman, 2009). La MMP12 aparece sobreexpresada con frecuencia en el cáncer, donde podría desempeñar funciones ambiguas. Si bien puede estar implicada en la disolución de la matriz y, por tanto, en la metástasis, también puede inhibir el crecimiento tumoral a través de la producción de angiostatina, lo que influye negativamente en la angiogénesis. La potenciación de la expresión de la MMP12 se ha descrito en el cáncer gástrico, donde ha demostrado ser favorable: Se ha correlacionado negativamente con la densidad de microvasos, el VEGF, el grado de diferenciación del tumor, la invasión vascular, la metástasis ganglionar y la recurrencia. Los pacientes con sobreexpresión de MMP12 demostraron una tasa de supervivencia significativamente mejor (Cheng et al., 2010; Zhang et al., 2007b; Zhang et al., 2007a)

Ribonucleótido reductasa M2 (RRM2)

La RRM2 es una de las dos subunidades de la ribonucleótido reductasa, que genera desoxirribonucleótidos a partir de los ribonucleótidos. La sobreexpresión de RRM2 ha sido observada en tumores como el cáncer gástrico y refuerza el potencial metastásico (PMID: 18941749) (PMID: 19250552). La reducción de la expresión de la RRM2 mediante ARNsi redujo el crecimiento tumoral en varias especies (ratón, rata, mono) (PMID: 17929316; PMID: 17404105).

Proteasa transmembrana, serina 4 (TMPRSS4)

La TMPRSS4 es una proteasa de serina transmembrana de tipo II presente en la superficie celular que aparece altamente expresada en varios tejidos cancerosos, entre ellos en el cáncer de páncreas, de colon y gástrico. Las funciones biológicas de la TMPRSS4 en el cáncer son desconocidas. La TMPRSS4 tiene cuatro variantes de corte y empalme (Scott et al., 2001; Sawasaki et al., 2004). La expresión en el carcinoma de ovario está correlacionada con el estadio (Sawasaki et al., 2004). La TMPRSS4 aparece muy elevada en tejidos de cáncer de pulmón, y la reducción de la expresión de la TMPRSS4 con el tratamiento con ARN de interferencia pequeños (ARNsi) en estirpes celulares de cáncer de pulmón y de colon aparece asociada con la reducción de la invasión celular y la adhesión célula-matriz, así como con la modulación de la proliferación celular (Jung et al., 2008).

Desyodinasas, yodotironina, tipo II (DIO2)

La DIO2 convierte la prohormona tiroxina (T4) en la bioactiva 3,3',5-triyodotironina (T3). Está altamente expresada en la glándula tiroides, y la expresión y/o la actividad aparecieron desreguladas en tumores tiroideos (de Souza Meyer et al., 2005) (Arnaldi et al., 2005). No obstante, también ha sido hallada en otros tejidos, como en el pulmón normal y en el afectado por cáncer (Wawrzynska et al., 2003), así como en tumores cerebrales (Murakami et al., 2000).

Proteína de unión 3 al ARNm del factor de crecimiento insulinoide 2 (IGF2BP3)

La IGF2BP3 está presente básicamente en el nucleolo, donde se une al ARNm del IGF2 y reprime su traducción. Interviene en la embriogénesis y está regulada a la baja en los tejidos adultos. En las células tumorales puede estar regulada al alza y, por tanto, es considerada una proteína oncofetal (Liao et al. 2005). Se ha hallado sobreexpresada en muchos tipos de cáncer, entre ellos el gástrico, asociada con un pronóstico malo (Jeng et al. 2009)(Jiang et al. 2006). Los péptidos derivados de la IGF2BP3 han sido analizados en estudios de vacunación contra el cáncer (Kono et al. 2009).

Lamina B1 (LMNB1)

La lamina B1 es una proteína de la lámina y de la matriz nucleares que interviene en la estabilidad nuclear, la estructura de la cromatina y la expresión génica. La lamina es degradada en las primeras etapas de la apoptosis (Neamati et al. 1995)(Sato et al. 2008b; Sato et al. 2008a; Sato et al. 2009). La LMNB1 se expresa en cierta medida básicamente en todas las células somáticas normales, y los estudios preliminares indican que podría estar reducida durante la patogenia de algunos tipos de cáncer, entre ellos el gástrico (Moss et al. 1999). En otros tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular, la LMNB1 se ha hallado regulada al alza y en correlación positiva con el estadio y el tamaño del tumor y el número de ganglios afectados (Lim et al. 2002).

Familia del sitio de integración MMTV de tipo sin alas, miembro 5A

La WNT5A es una proteína de señalización secretada que interviene en procesos del desarrollo y en la oncogénesis. La señalización canónica de la WNT5A a través de los receptores *Frizzled* y LRP5/LRP6 desemboca en el mantenimiento de las células madre/progenitoras, mientras que su señalización no canónica a través de los receptores *Frizzled* y ROR2/PTK/Ryk controla la polaridad tisular, la adhesión o el movimiento celular, p. ej. en la interfaz tumor-estroma, lo que conduce a la invasión (Katoh and Katoh, 2007). Podría actuar como supresor de tumores en algunos tipos de cáncer, pero aparece regulada al alza en otros, entre ellos el cáncer gástrico, en el cual contribuye a la progresión y la metástasis y se traduce en un pronóstico malo (Li et al., 2010) (Yamamoto et al., 2009) (Kurayoshi et al., 2006).

Proteína activadora de fibroblastos, alfa (FAP)

La FAP es una gelatinasa de membrana integral. Su posible actividad proteasa de serina podría intervenir en el control del crecimiento de los fibroblastos o en las interacciones entre el epitelio y el mesénquima durante el desarrollo, la reparación de tejidos y la carcinogénesis epitelial (Scanlan et al. 1994). La FAP tiene un papel potencial en el crecimiento tumoral, la metástasis y la angiogénesis a través de procesos de adhesión y migración celular, así como de la degradación rápida de los componentes de la matriz extracelular. Está presente en las células tumorales que invaden la matriz extracelular, en los fibroblastos reactivos asociados al cáncer y en las células endoteliales implicadas en la angiogénesis, pero no en las células inactivas del mismo tipo. (Dolznic et al. 2005; Kennedy et al. 2009; Rettig et al. 1993; Rettig et al. 1994; Scanlan et al. 1994; Zhang et al. 2010). La expresión de FAP se ha confirmado en células de cáncer gástrico y en fibroblastos estromales asociados (Zhi et al. 2010)(Chen et al. 2006)(Mori et al. 2004; Okada et al. 2003). En un modelo en ratón, se ha demostrado que las células que expresan la FAP constituyen un componente supresor del sistema inmunitario no redundante del microentorno tumoral (Kraman et al. 2010). En modelos de ratón de vacunación tumoral, la FAP fue utilizada con éxito como diana para respuestas de linfocitos T CD8+ y CD4+ (Loeffler et al. 2006; Wen et al. 2010)(Lee et al. 2005)(Fassnacht et al. 2005).

Complejo proteico del coatómero, subunidad gamma (COPG);

Complejo proteico del coatómero, subunidad gamma 2 (COPG2);

Complejo proteico del coatómero, subunidad beta 1 (COPB1)

COPG, COPG2 y COPB1 son subunidades del complejo del coatómero, también llamado complejo proteico de recubrimiento 1 (COPI) que está asociado con las vesículas no recubiertas con clatrina. Las vesículas recubiertas con COPI median en el transporte retrógrado del aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático y en el transporte dentro del Golgi (Watson et al., 2004). También podrían intervenir en el transporte anterógrado (Nickel et al., 1998). El tráfico retrógrado regula, entre otros, el transporte nuclear dependiente de EGF del EGFR, que se une el COPG (Wang et al., 2010). El COPG se ha hallado sobreexpresado en células de cáncer de pulmón y en células del endotelio microvascular asociadas al cáncer de pulmón (Park et al., 2008).

La secuencia de la COPG2 expresada ubicuamente es idéntica en un 80% a la del GOPG (Blagitko et al., 1999). La COPG2 puede formar un complejo similar a COP I en lugar de con GOPG, que probablemente es funcionalmente redundante (Futatsumori et al., 2000).

- 5 La reducción de la expresión de COPB1 en una estirpe celular que expresa el regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística (CFTR) sugiere que el complejo del coatómero está implicado en el tráfico del CRTR a la membrana plasmática (Denning et al., 1992) (Bannykh et al., 2000).

Enzima conjugadora de ubiquitina E2S (UBE2S)

- 10 La UBE2S es un factor auxiliar del complejo promotor de la anafase (APC), una ligasa de ubiquitina E3 que regula la salida de la mitosis y la G1 actuando sobre reguladores del ciclo celular. La UBE2S elonga las cadenas de ubiquitina una vez que los sustratos han sido pre-ubiquitinizados por otros componentes (Wu et al., 2010). La UBE2S también actúa sobre la proteína VHL para la degradación proteosómica, lo cual estabiliza el HIF-1alfa (Lim et al., 2008) y posiblemente sustenta la proliferación, la transición entre el epitelio y el mesénquima y la metástasis (Chen et al., 2009) (Jung et al., 2006). La UBE2S aparece sobreexpresada en varias entidades tumorales.

Miembro 11 de la familia de la cinesina (KIF11)

- 15 La KIF11 es necesaria para el montaje del huso mitótico bipolar. Se ha hallado regulada al alza en varios tipos de cáncer, a menudo en correlación con parámetros clínico-patológicos (Liu et al., 2010) (Peyre et al., 2010). Los inhibidores de la KIF11 que son moléculas pequeñas, como la S-tritil-L-cisteína (STLC), desarrollados como posibles fármacos contra el cáncer, detienen las células en mitosis y promueven la apoptosis de las células cancerosas (Tsui et al., 2009) (Wiltshire et al., 2010) (Ding et al., 2010). En el marco clínico, los inhibidores de la KIF11 han demostrado una actividad limitada (Kaan et al., 2010; Tunquist et al., 2010; Wiltshire et al., 2010; Zhang and Xu, 2008).

Con dominio de desintegrina y metaloproteasa 8 (ADAM8)

- 25 La ADAM8 fue considerada en un principio una ADAM inmuno-específica, pero también se ha hallado en otros tipos de células, a menudo en condiciones que implican inflamación y remodelación de la matriz extracelular, tales como tumores o enfermedades respiratorias como el asma (Koller et al. 2009). Muchos tipos de ADAM, incluida la ADAM8, se expresan en tumores malignos humanos, donde intervienen en la regulación de las actividades de los factores de crecimiento y de las funciones de las integrinas, lo que desemboca en la promoción del crecimiento y la invasión celular, aunque los mecanismos precisos de los mismos no se conocen con claridad en estos momentos (Mochizuki and Okada 2007). En tumores gástricos de ratón tanto la ADAM8 como otras ADAM aparecen aumentadas, probablemente debido a la potenciación de la vía de señalización del EGFR (Oshima et al. 2011).

Homólogo del ciclo de división celular 6 (*S. cerevisiae*) (CDC6)

- 35 La CDC6 es esencial para iniciar la replicación del ADN. Se localiza en el núcleo durante la G1, pero se trasloca al citoplasma al inicio de la fase S. La CDC6 también regula la activación del punto de control de la replicación a través de su interacción con ATR (Yoshida et al. 2010). La desregulación de la CDC6 puede causar la inactivación del locus INK4/ARF que codifica tres importantes genes supresores de tumores: p16INK4a y p15INK4b, activadores de la vía del retinoblastoma, y ARF, activador de p53 (Gonzalez et al. 2006). La disminución de la expresión de la CDC6 con ARNsi puede impedir la proliferación y promover la apoptosis (Lau et al. 2006). La CDC6 está regulada al alza en diversos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer gástrico (Nakamura et al. 2007)(Tsukamoto et al. 2008).

Receptor F2R del factor de coagulación II (trombina) (F2R)

- 40 El F2R, también llamado receptor activado por proteínasa (PAR1) es un receptor acoplado a proteína G. Las señales de PAR1, PAR2 y PAR4 regulan la liberación de calcio o la activación de la proteína-quinasa activada por mitógeno que conducen a la agregación plaquetaria, la relajación vascular, la proliferación celular, la liberación de citocinas y la inflamación (Oikonomopoulou et al. 2010). Se cree que el F2R interviene en la proliferación del endotelio y de las células tumorales y en la angiogénesis, y está sobreexpresado en tumores invasivos y metastásicos de muchos tipos. Los niveles de expresión aparecen correlacionados directamente con el grado de invasividad del cáncer (García-Lopez et al. 2010)(Lurje et al. 2010). En células de carcinoma gástrico, la activación del F2R puede desencadenar un abanico de respuestas que promueven el crecimiento y la invasión de las células tumorales, p. ej. la sobreexpresión de NF-kappaB, EGFR y tenascina-C (TN-C) (Fujimoto et al. 2010). En consecuencia, la expresión del F2R en el cáncer gástrico se ha hallado asociada con la profundidad de la invasión de la pared, la diseminación peritoneal y el pronóstico malo (Fujimoto et al. 2008). Un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PAR1 humana (ATAP-2), que reconoce un epítipo (SFLLRNPN) del extremo N-terminal del receptor de la trombina, ha sido descrito también como el péptido agonista de PAR1 TFLLRNPNDK (Hollenberg and Compton 2002; Mari et al. 1996; Xu et al. 1995).

Olfatomedina 4 (OLFM4)

- 55 La OLFM4, cuya función se desconoce en gran medida, aparece sobreexpresada en el epitelio colónico inflamado y

en diversos tipos de tumor humano, especialmente los del aparato digestivo (Koshida et al., 2007). La OLFM4 es un marcador robusto de células madre en el intestino humano y marca un subgrupo de células de cáncer colorrectal (Van der Flier et al., 2009). La OLFM4 inhibe la proteína promotora de la apoptosis GRIM-19 (Zhang et al., 2004) (Huang et al., 2010), regula el ciclo celular y promueve la transición a la fase S en la proliferación de las células cancerosas. Además, la OLFM4 está asociada con la adhesión tumoral y la metástasis (Yu et al., 2011b). La sobreexpresión forzada de la OLFM4 en células de tumor de próstata de ratón acelera la formación del tumor en un hospedador singénico (Zhang et al., 2004). La OLFM4 se ha hallado sobreexpresada en el cáncer gástrico (Aung et al., 2006). La inhibición de la expresión de la OLFM4 puede inducir la apoptosis en presencia de un agente citotóxico en células de cáncer gástrico (Kim et al., 2010). Asimismo, la concentración sérica de OLFM4 en pacientes quirúrgicos con cáncer gástrico estaba elevada en comparación con donantes sanos (Oue et al., 2009). La OLFM4 ha sido identificada como un nuevo gen diana para los ácidos retinoicos (AR) y el agente de desmetilación 5-aza-2'-desoxicitidina. Estos dos agentes han demostrado ser eficaces en el tratamiento de ciertos pacientes con leucemia mieloide (Liu et al., 2010).

Antígeno de superficie celular Thy-1 (THY1)

La Thy-1 (CD90) es una glucoproteína anclada por GPI presente en muchos tipos celulares, entre ellos los linfocitos T, neuronas, células endoteliales y fibroblastos. El Thy-1 interviene en procesos tales como la adhesión, regeneración nerviosa, crecimiento tumoral, supresión de tumores, migración, muerte celular y activación de los linfocitos T. El Thy-1 parece ser un marcador de la angiogénesis adulta pero no de la embrionaria (Lee et al. 1998). Además, ha sido considerado como un marcador de varios tipos de células madre (células madre mesenquimáticas, células madre hepáticas («células ovales») (Masson et al. 2006), células madre queratinocíticas (Nakamura et al. 2006) y células madre hematopoyéticas (Yamazaki et al. 2009)). El Thy-1 está regulado al alza en varios tipos de cáncer tales como el cáncer gástrico y GIST, para los cuales ha sido propuesto como marcador (Yang and Chung 2008; Zhang et al. 2010)(Oikonomou et al. 2007).

Proteína centrosómica de 250 kDa (CEP250)

La Cep250 interviene en la cohesión de los centros organizadores de los microtúbulos (Mayor et al., 2000). También es llamada proteína centrosómica asociada a Nek2 o C-Nap1, ya que coincide en su localización con la de ésta y es un sustrato de la cinasa de serina/treonina Nek2. La cinasa Nek2 y sus sustratos regulan la unión entre los centrosomas (Bahmanyar et al., 2008). Al inicio de la mitosis, cuando los centrosomas se separan para la formación del huso bipolar, la C-Nap1 es fosforilada y con ello se disocia de los centrosomas. Los experimentos *in vitro* demuestran que la sobreexpresión de la Cep250 altera la organización de los microtúbulos en el centrosoma (Mayor et al., 2002).

Factor inducible por hipoxia 1, subunidad alfa (factor de transcripción básico hélice-bucle-hélice) (HIF1A)

La HIF1A es la subunidad sensible al oxígeno del factor inducible por la hipoxia (HIF), un factor de transcripción activo en condiciones de hipoxia, que son frecuentes en los tumores. Interviene en la transcripción de más de 60 genes implicados en la supervivencia, el metabolismo de la glucosa, la invasión, la metástasis y la angiogénesis (p. ej., VEGF). La HIF1 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, a menudo asociada con un pronóstico malo, y se considera una diana interesante para la manipulación farmacológica (Griffiths et al. 2005; Quintero et al. 2004; Stoeltzing et al. 2004)(Zhong et al. 1999).

En el cáncer gástrico, la HIF1A contribuye a la angiogénesis (Nam et al. 2011), está correlacionada con el tamaño del tumor, con menos grado de diferenciación, estadio tumoral, supervivencia más corta (Qiu et al. 2011) y metástasis (Wang et al. 2010)(Han et al. 2006; Kim et al. 2009; Oh et al. 2008; Ru et al. 2007). También se cree que promueve la resistencia contra los antineoplásicos como el 5-FU por la inhibición de la apoptosis inducida por fármacos y el descenso de la acumulación intracelular del fármaco (Nakamura et al. 2009)(Liu et al. 2008). El inhibidor del HIF-1alfa 2-metoxi-estradiol redujo significativamente las propiedades metastásicas de células de cáncer gástrico (Rohwer et al. 2009).

Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS)

El KRAS es un miembro de la superfamilia de las GTPasas pequeñas y un protooncogén involucrado en las primeras etapas de muchas vías de transducción de señales, como las vías mediadas por MAPK y AKT, que son potencialmente oncogénicas. Las sustituciones sencillas de aminoácidos provocan mutaciones activadoras que desembocan en una proteína transformadora que desempeña un papel clave en varias neoplasias malignas como el cáncer gástrico (Capella et al., 1991). Las mutaciones oncogénicas de KRAS son poco frecuentes en el cáncer gástrico. En un subtipo de cáncer gástrico, el locus KRAS estaba amplificado, dando como resultado la sobreexpresión de la proteína KRAS. Así pues, la amplificación génica probablemente constituye la base molecular de la sobreactivación de KRAS en el cáncer gástrico (Mita et al., 2009). Los alelos mutantes de KRAS contribuyen a la inducción del VEGF por la hipoxia (Kikuchi et al., 2009; Zeng et al., 2010). La KRAS mutada también se puede detectar en suero o plasma de pacientes con cáncer y, por tanto, ha sido sugerida como un marcador tumoral fácilmente accesible (Sorenson, 2000). El péptido KRAS-001 procede de una de las dos variantes de corte y empalme: la NP_004976 (188 aminoácidos) y no de la variante NP_203524 (189 aminoácidos). Las variantes de

corte y empalme difieren en el último exón, donde está localizado KRAS-001.

Complejo de la condensina I no SMC, subunidad G (NCAPG)

5 La NCAPG forma parte del complejo de la condensina I, que está compuesto por proteínas SMC (Mantenimiento estructural de los cromosomas) y no SMC, y que regula la condensación y la segregación de los cromosomas durante la mitosis (Seipold et al., 2009). La sobreexpresión de NCAPG se ha constatado en numerosos tumores, como el carcinoma nasofaríngeo (Li et al., 2010), el carcinoma hepatocelular (Satow et al., 2010) y el melanoma (Ryu et al., 2007). En los tejidos normales, la NCAPG presenta su expresión máxima en el testículo. Ha sido sugerida como un posible marcador de la proliferación y un potencial indicador pronóstico en el cáncer (Jager et al., 2000).

10 Topoisomerasa (ADN) II alfa (TOP2A) y topoisomerasa (ADN) II beta (TOP2B)

15 Los genes TOP2A y TOP2B codifican isoformas altamente homólogas de una ADN- topoisomerasa, enzimas que controlan y alteran los estados topológicos del ADN durante la transcripción y que intervienen en la condensación cromosómica, la separación de las cromátides, la replicación y la transcripción. La topoisomerasa es una diana para varios fármacos antitumorales, como las antraciclinas, y diversas mutaciones han sido asociadas con la resistencia farmacológica (Kellner et al., 2002) (Jarvinen and Liu, 2006). La TOP2A es esencial para la proliferación celular (la TOP2B no). El gen está localizado junto al oncogén HER2 y aparece amplificado en la gran mayoría de tumores de mama con HER2 amplificado, pero también en aquellos que no presentan dicha amplificación (Jarvinen and Liu, 2003), y en muchas otras entidades tumorales. En un subgrupo de cáncer gástrico, la TOP2A ha sido hallada amplificada y sobreexpresada, a menudo junto con HER2 (Varis et al., 2002) (Liang et al., 2008).

20 Laminina, gamma 2 (LAMC2)

25 Las lamininas son, después de los diversos tipos de colágeno, el principal componente de la membrana basal. Intervienen en la adhesión, la diferenciación y la migración celular, la señalización y la metástasis. La cadena gamma 2 junto con las cadenas alfa 3 y beta 3 constituyen la laminina 5. La LAMC2 promueve el crecimiento invasivo de células cancerosas humanas *in vivo*. Aparece altamente expresada en el cáncer humano en el frente de invasión, y su expresión está correlacionada con un pronóstico malo (Tsubota et al., 2010). Se trata de un producto de escisión generado por la MMP-2 a partir de la laminina 5 que es capaz de activar la señalización del EGFR y promover la motilidad celular (Schenk et al., 2003). En el carcinoma gástrico, la LAMC2 puede ser inducida por miembros de la familia del EGFR o por Wnt5a, y se ha demostrado que la actividad invasiva depende de la LAMC2 (Tsubota et al., 2010) (Yamamoto et al., 2009).

30 Receptor de hidrocarburos arílicos (AHR)

35 El AHR se une a hidrocarburos aromáticos planares como la TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), y media la transcripción de genes, entre ellos los de enzimas metabolizadoras de xenobióticos como las enzimas del citocromo P450. También interviene en la progresión del ciclo celular (Barhoover et al. 2010). Se cree que el AhR está parcialmente asociado con la actividad cancerígena de las dioxinas, puesto que presenta funciones promotoras de la proliferación y anti-apoptóticas, y podría conducir a la desregulación del contacto entre las células, la dediferenciación y el potenciamiento de la motilidad (Watabe et al. 2010)(Dietrich and Kaina 2010)(Marlowe et al. 2008). La expresión del AHR puede ser regulada a la baja por el TGF-beta (Dohr and Abel 1997; Wolff et al. 2001) e inducida por la señalización de Wnt o de la beta-catenina (Cheshire et al. 2004). La sobreexpresión de la AHR se ha constatado en muchos tipos de cáncer como el cáncer gástrico, donde aparece correlacionada con la expresión frecuente de CYP1A1 (Ma et al. 2006). La expresión del AHR y la traslocación al núcleo fueron mayores en el cáncer gástrico que en los tejidos normales, y la expresión aumentó gradualmente durante la oncogénesis (Peng et al. 2009a). La activación de la vía del AhR potencia la invasividad de las células de cáncer gástrico probablemente a través de la inducción dependiente de c-Jun de la MMP-9 (Peng et al. 2009b). En un modelo de ratón, la expresión de un mutante constitutivamente activo del receptor de hidrocarburos arílicos (CA-AhR) provoca la aparición de tumores de estómago, que se correlacionan con un aumento de la mortalidad (Andersson et al. 2002; Kuznetsov et al. 2005). La función del AhR en el cáncer parece ser ambigua, ya que algunos estudios también apuntan hacia una actividad supresora de tumores (Gluschnaider et al. 2010)(Fan et al. 2010).

Receptor de motilidad mediada por el hialuronano (RHAMM) (HMMR)

50 El HMMR puede aparecer en la superficie celular donde se une al ácido hialurónico (AH) e interacciona con el receptor del AH CD44. Esta interacción interviene en procesos como la motilidad celular, la curación de heridas y la invasión (Gares and Pilarski, 2000). A nivel intracelular, el HMMR está asociado con el citoesqueleto, los microtúbulos, los centrosomas y el huso mitótico e interviene en el control de la integridad del huso mitótico. El HMMR aparece sobreexpresado en varios tejidos cancerosos (Sohr and Engeland, 2008). Se ha planteado que el AH protege a las células cancerosas del sistema inmunitario. El AH en suero suele aparecer elevado en los pacientes con metástasis (Delpech et al., 1997). El HMMR ha sido identificado como un prometedor antígeno asociado a tumor y un posible factor pronóstico en la LMA y en la LLC. Los péptidos derivados del HMMR han sido utilizados en vacunas contra la leucemia. El HMMR-001 ha sido analizado para evaluar su inmunogenicidad *in vitro*, pero no ha sido empleado en vacunas (Tzankov et al., 2011) (Greiner et al., 2010; Schmitt et al., 2008; Tabarkiewicz

and Giannopoulos, 2010)(Greiner et al., 2005). La sobreexpresión del HMMR también se ha constatado en otros tipos de cáncer, a menudo asociados con un pronóstico malo. El HMMR también aparece sobreexpresado en el cáncer gástrico, a menudo junto con el CD44, y se ha planteado que facilita la invasión y la metástasis(Li et al., 1999) (Li et al., 2000a) (Li et al., 2000b).

5 TPX2, homólogo, asociado a microtúbulos (*Xenopus laevis*) (TPX2)

La TPRX2 es una proteína vinculada a la proliferación que se expresa en las fases S, G(2) y M del ciclo celular y es considerada como un marcador de proliferación (Cordes et al., 2010).

Es necesaria para la nucleación normal de los microtúbulos, p. ej. en el montaje de los husos mitóticos. La TPX2 recluta y activa a Aurora A (Bird and Hyman, 2008; Moss et al., 2009). La fosforilación de la TPX2 por la cinasa similar a polo 1 aumenta su capacidad para activar a Aurora A (Eckerdt et al., 2009). La TPX2 aparece sobreexpresada en muchos tipos de tumor y a menudo en conjunción con AuroraA (Asteriti et al., 2010). Ejemplos de tipos de cáncer donde se ha hallado sobreexpresión de la TPX2 (a menudo asociada con un pronóstico malo o estadio avanzado) son: meningioma et al., 2010), cáncer de pulmón (Kadara et al., 2009) (Lin et al., 2006; Ma et al., 2006)(Manda et al., 1999) y carcinoma hepatocelular (Shigeishi et al., 2009b)(Satow et al., 2010) (Wang et al., 2003).

15 La presente invención se refiere a un péptido con una longitud total de entre 10 y 14 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo: a) una secuencia consistente en la SEQ ID N. ° 1; b) una variante de la SEQ ID N. ° 1 que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicha variante es seleccionada del grupo de las secuencias LFQILQGIVF, LYQILQGIVL, LYQILQGIVI, LFQILQGIVL y LFQILQGIVI.

20 La presente invención se relaciona, además, con los péptidos descritos previamente, dotados de la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos descritos previamente, en que el péptido consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos conforme a las SEQ ID N. ° 1 a SEQ ID N. ° 95.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos descritos previamente, en que el péptido incluye enlaces no peptídicos.

25 La presente invención se refiere, además, a los péptidos descritos previamente, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en concreto de una que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos descritos previamente, siempre que el péptido no sea la proteína humana entera.

30 La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico descrito previamente que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa un ácido nucleico descrito previamente.

35 La presente invención se refiere, además, a un péptido como el descrito previamente, un ácido nucleico como el descrito antes o un vector de expresión con el descrito antes para el uso en medicina.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico como el antes descrito o un vector de expresión como el antes descrito.

La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora descrita que es una célula presentadora de antígeno.

40 La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora descrita en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido descrito, método que comprende el cultivo de la célula hospedadora descrita y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

45 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, el cual comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno cualquier péptido descrito.

50 La presente invención se refiere, además, al método descrito, en que dicho antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto

de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método descrito, en que dicha célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido que contiene la SEQ ID N. ° 1 o una variante de la secuencia de aminoácidos que es seleccionada del grupo formado por las secuencias LQILQGIVF, LYQILQGIVL, LYQILQGIVI, LQILQGIVL y LQILQGIVI.

La presente invención se refiere, además, a los linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, producidos con el método descrito, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos descrita.

Se describe un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) como los definidos.

La presente invención se refiere, además, a un péptido conforme a la invención, el ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la invención, la célula hospedadora conforme a la invención, o el linfocito T citotóxico activado conforme a la invención para el uso en el tratamiento del cáncer, como por ejemplo, cáncer gástrico, gastrointestinal, colorrectal, pancreático, pulmón o renal.

La presente invención se refiere, además, a un péptido conforme a la invención, el ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la invención, la célula hospedadora conforme a la invención, o el linfocito T citotóxico activado conforme a la invención para el uso como medicamento del modo descrito, en que el medicamento es una vacuna.

La presente invención se refiere, además, al uso no terapéutico del péptido conforme a la invención, para la generación y el desarrollo de anticuerpos que son específicos contra un complejo de MHC/péptido que comprende dicho péptido.

Se describen proteínas marcadoras concretas que pueden ser usadas para el pronóstico del cáncer gástrico. Además, se describe el uso de esas dianas novedosas para el tratamiento del cáncer. Como se indica en la presente memoria, en la bibliografía se ha descrito que las proteínas codificadas por ABL1, ADAM10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A y PTK2 están sobreexpresadas en el cáncer gástrico en comparación con el tejido gástrico normal y otros tejidos vitales (p. . ej., hígado, riñón, corazón).

Se ha demostrado que la proteínas codificadas por ABL1, ADAM10, ADAM8, AHR, ASPM, ATAD2, CCDC88A, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, CLCN3, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, IQGAP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NFYB, NUF2, OLFM4, PBK, PLK4, PPAP2C, PROM1, PTK2, RRM2, SIAH2, THY1, TOP2A, TPX2, TSPAN1, TSPAN8, UBE2S, UCHL5 y WNT5A desempeñan un papel importante en la oncogénesis puesto que intervienen en la transformación maligna, el crecimiento y la proliferación celular, la angiogénesis o la invasión del tejido normal. De igual modo en el caso de las proteínas codificadas por DNAJC10, EIF2S3, EIF3L, POLD3, PSMC2, PSMD14 y TMPRSS4, existen algunas pruebas de que desempeñan funciones relevantes en el cáncer.

Se ha demostrado que las proteínas codificadas por PROM1, WNT5A, SMC4, PPAP2C, GPR38, OLFM4 y THY1 están altamente expresadas y/o son funcionalmente importantes en las células madre y/o en las células madre cancerosas. Se ha debatido el papel de la PROM1 como marcador de células madre de cáncer gástrico, aunque los datos son controvertidos. Las células madre cancerosas son una subpoblación de células tumorales dotada del potencial de autorrenovación necesario para el crecimiento sostenido del tumor. Estas células residen en estructuras especializadas y altamente organizadas, llamadas nichos de células madre cancerosas que son necesarias para el mantenimiento del potencial de autorrenovación de las células madre cancerosas.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de las proteínas AHR, ASPM, ATAD2, CCNB1, CCND2, CCNE2, CDK1 (CDC2), CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HIF1A, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF11, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, LMNB1, MET, MMP11, MMP3, MST1R, MUC6, NCAPG, NUF2, OLFM4, PBK, PPAP2C, PROM1, PTK2, TMPRSS4, TPX2, TSPAN1 y WNT5A en tumores está asociada con estadios avanzados de la enfermedad y un mal pronóstico para los pacientes.

Así pues, se describen métodos para identificar un animal, preferiblemente un ser humano, que es probable que sufra un cáncer gástrico. En un ejemplo, la probabilidad determinada se sitúa entre el 80% y el 100%. Tal método comprende la determinación del nivel de al menos una de las proteínas MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 en una muestra tumoral del sujeto animal. En una forma de realización, la muestra se obtiene por cirugía radical. En otro ejemplo, la muestra se obtiene mediante biopsia por punción.

Cuando el nivel determinado de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 indica que están

regulados al alza en el 20% o más de las células respecto al determinado en células epiteliales benignas del mismo individuo, se considera que el sujeto animal probablemente tenga un cáncer gástrico.

Cuanto más proteínas del grupo estén reguladas al alza, a saber, MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6, más alta es la probabilidad de que el sujeto animal esté afectado por un cáncer gástrico.

5 En un ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo *in situ*. En otro ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo *in vitro*. En otro ejemplo más, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo *in vivo*. En un ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo con microscopía con captura por
10 láser combinada con inmunoelectrotransferencia (*Western blot*).

En un ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo con un anticuerpo específico para MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6. En otro ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se
15 lleva a cabo mediante una PCR con un cebador específico para un ARNm que codifica MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6. En otro ejemplo más, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo con una sonda nucleotídica específica para un ARNm que codifica MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6. En otro ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo mediante hibridación Northern. En otro ejemplo, la determinación del nivel de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 se lleva a cabo mediante un ensayo de protección de ribonucleasa. En otros
20 ejemplos, pruebas inmunológicas tales como el ensayo de adsorción (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) o la inmunoelectrotransferencia pueden ser utilizadas para detectar polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 en una muestra de líquido corporal (sangre, suero, esputo, orina o líquido peritoneal, etc.). Biopsias, muestras de tejido y muestras de células (como de los ovarios, ganglios linfáticos, raspados de células epiteliales de la superficie del ovario, biopsias de pulmón, biopsias de hígado), y cualquier muestra de líquido que contenga células (como líquido peritoneal, esputo y derrame pleural) pueden ser analizadas por disgregación y/o solubilización de la muestra de tejido o células y sometida a un inmunoensayo para la
25 detección de polipéptidos, como ELISA, RIA o inmunoelectrotransferencia. Esas muestras de células o tejidos también pueden ser analizadas con métodos basados en ácidos nucleicos, como por ejemplo amplificación por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), hibridación Northern, transferencias puntual o por ranuras. Para visualizar la distribución de las células tumorales en una muestra de tejido y detectar un polipéptido o un ARNm que sean marcadores del cáncer gástrico pueden emplearse pruebas diagnósticas que conservan la estructura tisular de la muestra, como por ejemplo tinción inmunohistológica, hibridación de ARN *in situ* o RT-pCR *in situ*. Para la localización *in vivo* de masas tumorales es posible utilizar pruebas de diagnóstico por la imagen como la resonancia magnética (RM) mediante la introducción en el sujeto de un anticuerpo que se una específicamente a polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 (concretamente a un polipéptido localizado en la superficie celular), en que el anticuerpo esté conjugado o acoplado de otro modo a un marcador paramagnético (u otra molécula detectable adecuada, dependiendo del método de diagnóstico por la imagen usado); otra alternativa consiste en localizar un anticuerpo específico de marcador tumoral
30 desprovisto de marcaje con un anticuerpo secundario que lleve acoplada una molécula detectable.

Además, se describen proteínas/péptidos quiméricos/de fusión que comprenden los polipéptidos MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 y fragmentos de los mismos, incluidos fragmentos funcionales, proteolíticos y antigénicos.

45 El compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4⁺. Los epítopos que estimulan a los CD4⁺ son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en el toxoide tetánico. En un ejemplo el péptido es una proteína de fusión, que en concreto comprende aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR. En un ejemplo se describe una proteína humana truncada o una proteína de fusión de un fragmento de proteína y otra porción polipeptídica siempre que la porción humana incluya una o más secuencias de aminoácidos descritas en la
50 invención.

Se describen anticuerpos contra los polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6, contra las proteínas quiméricas/de fusión que comprenden los polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6, así como contra los fragmentos de los polipéptidos MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6, incluidos fragmentos proteolíticos y fragmentos antigénicos, y
55 contra las proteínas/péptidos quiméricos/de fusión que comprenden estos fragmentos. Además, también se describen métodos para usar tales anticuerpos para el pronóstico del cáncer, en particular del cáncer gástrico.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos quiméricos. Las estirpes de células inmortales que producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención también son parte de la presente invención.

5 Cualquier persona con aptitudes ordinarias en la técnica entenderá que en determinadas circunstancias la expresión elevada de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 como gen marcador de tumor indicará un pronóstico peor para el sujeto con cáncer gástrico. Por ejemplo, niveles relativamente altos de expresión de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 pueden indicar un tumor primario relativamente grande, una carga tumoral mayor (p. ej., más metástasis), o un fenotipo tumoral relativamente más maligno.

Cuanto más proteínas del grupo compuesto por MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 estén sobreexpresadas, peor será el pronóstico.

10 Los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos implican el uso de métodos conocidos, p. ej., métodos a base de anticuerpos para detectar polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 y métodos basados en la hibridación y/o la amplificación de ácidos nucleicos para detectar el ARNm de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6.

15 Además, como la destrucción rápida de las células tumorales provoca a menudo la generación de autoanticuerpos, los marcadores tumorales de cáncer gástrico de la invención pueden ser usados en ensayos serológicos (p. ej., en una prueba de ELISA con el suero del sujeto) para detectar autoanticuerpos contra MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 en un sujeto. Los niveles de autoanticuerpos específicos contra polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 que sean al menos unas 3 veces mayores (y preferiblemente al menos 5 o 7 veces mayores, o más preferiblemente al menos 10 o 20 veces mayores) que una muestra de control serán indicativos de cáncer gástrico.

20 Los polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 localizados en la superficie celular, en el interior de la célula o secretados pueden ser empleados para el análisis de biopsias, p. ej. muestras de tejido o células (incluidas células obtenidas de muestras de líquido como el líquido de la cavidad peritoneal) para identificar una biopsia tisular o celular como portadora de células de cáncer gástrico. La biopsia puede ser analizada como un tejido intacto o como una muestra celular íntegra, o la muestra de tejido o de células puede ser disgregada y/o solubilizada si el tipo de prueba diagnóstica así lo exige. Por ejemplo, las biopsias o las muestras pueden ser sometidas a un análisis del tejido intacto o de las células íntegras para determinar los niveles de polipéptidos o de ARNm de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 *in situ*, p. ej. mediante inmunohistoquímica, hibridación de ARNm *in situ* o RT-PCR *in situ*. La persona versada en la técnica sabrá cómo procesar los tejidos o células para el análisis de los niveles de polipéptidos o de ARNm con métodos inmunológicos como ELISA, inmunotransferencia, o métodos equivalentes, o análisis de los niveles de ARNm mediante métodos analíticos basados en ácidos nucleicos tales como RT-PCR, hibridación Northern, o transferencia puntual o por ranuras.

Equipos para la medición de los niveles de expresión de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6.

35 Se describen equipos para detectar un nivel elevado de expresión de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 como genes marcadores de cáncer gástrico en un sujeto. Un equipo para detectar un polipéptido marcador de cáncer gástrico contiene preferentemente un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido marcador de cáncer gástrico seleccionado. Un equipo para detectar el ARNm de un marcador de cáncer gástrico contiene preferentemente uno o más ácidos nucleicos (p. ej., uno o más cebadores o sondas oligonucleotídicas, sondas de ADN, sondas de ARN, o moldes para generar sondas de ARN) que se hibriden específicamente con el ARNm de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6.

40 En concreto, el equipo con anticuerpo puede ser utilizado para detectar la presencia y/o medir el nivel de un polipéptido de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 que es reconocido específicamente por el anticuerpo o un fragmento inmunorreactivo del mismo. El equipo puede incluir un anticuerpo reactivo con el antígeno y un reactivo para detectar una reacción del anticuerpo con el antígeno. Tal equipo puede ser un kit de ELISA y puede contener un control (p. ej., una cantidad especificada de un polipéptido marcador de cáncer gástrico concreto), anticuerpos primarios y secundarios si procede, y cualquier otro reactivo necesario como moléculas detectables, sustratos enzimáticos y reactivos colorimétricos como los antes descritos. Alternativamente, el equipo de diagnóstico puede ser un kit de inmunotransferencia que en general comprende los componentes y reactivos descritos en la presente memoria.

50 Un equipo basado en ácidos nucleicos puede ser utilizado para detectar y/o medir el nivel de expresión de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 mediante la detección y/o la medición de la cantidad de ARNm de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 presente en una muestra, como una biopsia de tejido o de células. Por ejemplo, un equipo de RT-PCR para la detección de la expresión elevada de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 contiene preferentemente suficientes cebadores oligonucleotídicos para llevar a cabo la transcripción inversa del ARNm del marcador de cáncer gástrico en ADNc y la amplificación con PCR de dicho ADNc, y preferentemente también contendrá moldes y cebadores de PCR de control para llevar a cabo los pertinentes controles negativo y positivo, así como controles internos para la cuantificación. Una persona con conocimientos ordinarios de la técnica sabrá seleccionar los cebadores adecuados para llevar a cabo las reacciones de transcripción inversa y PCR, así como las reacciones de control pertinentes. Se

pueden encontrar indicaciones por ejemplo en F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N. Y., 1997. En la técnica se conocen muchas variaciones de la RT-PCR. La administración dirigida de inmunotoxinas contra MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 puede servir como dianas terapéuticas para el tratamiento o la prevención del cáncer gástrico. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se una específicamente a polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 localizados en la superficie puede ser conjugada con un radioisótopo u otro compuesto tóxico. Los conjugados de anticuerpo se administran al sujeto de modo que la unión del anticuerpo a su polipéptido afín de cáncer gástrico se traduce en la administración dirigida del compuesto terapéutico en las células de cáncer gástrico, tratando así un cáncer de ovario.

La fracción terapéutica puede ser una toxina, radioisótopo, fármaco, sustancia química, o una proteína (véase p. ej., Bera et al. "Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalent disulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding to erbB2" *Cancer Res.* 59:4018-4022 (1999)). Por ejemplo, el anticuerpo puede estar ligado o conjugado a una toxina bacteriana (p. ej., toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina colérica) o toxina vegetal (p. ej., toxina del ricino) para la administración dirigida de la toxina en una célula que exprese MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6. Esta inmunotoxina puede ser administrada a una célula y tras su unión al polipéptido marcador del cáncer gástrico localizado en la superficie celular, la toxina conjugada al anticuerpo específico del marcador de cáncer gástrico entrará en contacto con la célula.

Además, si alguno de los polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 tiene un ligando específico (p. ej., un ligando que se una a una proteína localizada en la superficie celular), este ligando puede ser usado en lugar de un anticuerpo para dirigir un compuesto tóxico contra la célula de cáncer gástrico, tal y como se ha descrito antes.

El término «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, el término «anticuerpos» también incluye fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de moléculas de inmunoglobulina, siempre que posean alguna de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador del cáncer gástrico, administración de una toxina contra una célula de cáncer gástrico que exprese un gen marcador de cáncer gástrico con un nivel elevado, y/o inhibición de la actividad de un polipéptido marcador del cáncer gástrico) descritos en la presente memoria.

Si es posible los anticuerpos descritos se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica sabe que para fabricar los anticuerpos descritos se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores del cáncer gástrico enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, un ADNc que codifica un polipéptido de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6, o un fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o células eucariotas (p. ej., de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se puede purificar una proteína recombinante con la que generar una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador del cáncer gástrico usado para generar el anticuerpo.

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para el uso previsto (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con métodos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunoelectrotransferencia, tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer gástrico congelados o fijados en formol. Después de la caracterización *in vitro* inicial, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínico conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE. UU. 4.816.567).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que

estimula a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

5 Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE. UU. N. ° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

10 Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348, publicada el 22 de diciembre de 1994 y en la Pat. de EE. UU. N. ° 4.342.566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento que tiene dos sitios de combinación con antígenos y todavía es capaz de reconocer antígenos de reactividad cruzada.

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

25 Los anticuerpos descritos también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., de ratón) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos quiméricos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá casi todos o al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

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

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

60 Los anticuerpos descritos se administran preferiblemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución esté

aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej. películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

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

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

Como las proteínas ABL1, ADAM10, AHR, CCND2, CDC6, CDK1, CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM6, COL6A3, EIF2S3, LOC255308, EPHA2, ERBB2, ERBB3, F2R, FAP, HMMR, HSP90B1, IGF2BP3, ITGB4, KIF2C, KRAS, LAMC2, LCN2, MET, MMP11, MMP12, MMP3, MST1R, NUF2, OLFM4, PROM1, RRM2, THY1, TMPRSS4, TOP2A, TSPAN1, WNT5A, HIF1A y PTK2 han demostrado estar altamente expresadas en al menos un subgrupo de tejidos de cáncer gástrico en comparación con los tejidos normales, la inhibición de su expresión o actividad puede ser integrada en cualquier estrategia terapéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer gástrico.

El principio de la terapia antisentido se basa en la hipótesis de que es posible suprimir la expresión génica de secuencias específicas (ya sea por vía transcripcional o traduccional) mediante la hibridación en el interior de la célula del ADN genómico o del ARNm con una molécula antisentido complementaria a ellos. La formación de ese ácido nucleico bicatenario híbrido trastoca la transcripción del ADN genómico que codifica el antígeno tumoral que constituye la diana, o altera el procesamiento/transporte/traducción y/o la estabilidad del ARNm del antígeno tumoral diana.

Los ácidos nucleicos antisentido se pueden hacer llegar a las células con diversas estrategias. Por ejemplo, a un sujeto se le pueden administrar directamente oligonucleótidos antisentido o ARN antisentido (p. ej., por inyección intravenosa) de tal forma que puedan ser absorbidos por las células tumorales. Otra alternativa consiste en la introducción en células *in vivo* de vectores virales o plasmídicos que codifiquen ARN antisentido (o fragmentos de ARN). Los efectos antisentido también se pueden inducir con secuencias codificantes, pero la magnitud de los cambios fenotípicos es muy variable. Los cambios fenotípicos inducidos por la terapia antisentido se valoran en función de los cambios en, p. . ej. las concentraciones del ARNm diana, concentraciones de la proteína diana y/o niveles de actividad de dicha proteína.

En un ejemplo concreto, la inhibición de la función del marcador tumoral gástrico con terapia génica antisentido se puede lograr con la administración directa de ARN antisentido del marcador tumoral gástrico a un sujeto. El ARN antisentido del marcador tumoral se puede producir y aislar con una técnica estándar, pero se produce más fácilmente con la transcripción *in vitro* utilizando un ADNc antisentido del marcador tumoral controlado con un promotor eficiente (p. ej., el promotor de T7). La administración a células del ARN antisentido del marcador tumoral se puede efectuar con cualquiera de los métodos de administración directa de ácidos nucleicos descritos a continuación.

Una estrategia alternativa para inhibir la función de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 con terapia génica consiste en la expresión intracelular de un anticuerpo anti-MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 o de una porción de anticuerpo anti-MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6. Por ejemplo, el gen (o fragmento de gen) que codifica un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 y que inhibe su actividad biológica se sitúa bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora específica (p. ej., específica de tejido o de tumor), dentro de un vector de expresión de ácidos nucleicos. El vector se administra a continuación al sujeto de tal modo que es asimilado por las células de cáncer de pulmón u otras células, que segregarán los anticuerpos anti-MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6 y bloquearán la actividad biológica de los polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6. Preferentemente, los polipéptidos de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 están presentes en la superficie extracelular de células de cáncer gástrico.

En los métodos susodichos, que incluyen la administración y la absorción de ADN exógeno por las células del sujeto (transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser incorporados a un vector en forma de ADN desnudo o de ácidos nucleicos para suministrar los ácidos nucleicos a las células con los que inhibir la expresión de la proteína marcador del tumor gástrico. El vector puede estar disponible en una preparación comercial, como un vector adenovirico (Quantum Biotechnologies Inc., Laval, Quebec, Canadá). La liberación del ácido nucleico o del vector en las células se puede materializar a través de varios mecanismos. Como ejemplo, puede ser a través de liposomas con preparaciones comerciales de liposomas como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO- 25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md., EE. UU.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis., EE. UU.), así como otros liposomas desarrollados según los procedimientos habituales en la técnica. Asimismo, el ácido nucleico o el vector de esta invención se pueden suministrar *in vivo* mediante electroporación, una tecnología que ofrece Genetronics, Inc. (San Diego, California, EE. UU.) o mediante un aparato SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, EE. UU.).

Como ejemplo, el vector puede ser un sistema viral, como un sistema de vector retrovirico que puede encapsidar un genoma retrovirico recombinante. El retrovirus recombinante infecta las células y con ello inocula un ácido nucleico antisentido que inhibe la expresión de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB o MUC6. El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no se limita al uso de vectores retroviricos. Existen otras técnicas comunes para llevar a cabo este procedimiento, tales como vectores adenoviricos, vectores viricos adenoasociados (AAV), vectores lentiviricos, vectores retroviricos pseudotipados. También se pueden utilizar técnicas de transducción física, como liposomas y a través de receptores y otros mecanismos de endocitosis. La presente invención se puede utilizar en conjunción con cualquiera de estos y de otros métodos usuales de transferencia génica.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P o ³⁵S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En un ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1 x 10 μ M.

Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos ópticos. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopia, tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo, y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra de tejido patológico puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6.

La presente invención proporciona pues un péptido con una longitud total de entre 10 y 14 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo: a) una secuencia consistente en la SEQ ID N. ° 1; b) una variante de la SEQ ID N. ° 1 que induce la reacción cruzada de linfocitos T con dicho péptido, en que dicha variante es seleccionada entre el grupo de las secuencias LFQILQGIVF, LYQILQGIVL, LYQILQGIVI, LFQILQGIVL y LFQILQGIVI.

Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. Las secuencias que se comparan en la presente memoria pueden tener una adición o deleción (por ejemplo, un hueco o similar) en la alineación óptima de las dos secuencias. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras herramientas de análisis.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Fong et al. 8809-14)(Appay et al. 1805-14;Colombetti et al. 2730-38;Zaremba et al. 4570-77).

Estos CTL pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la

5 secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía (Rammensee, Bachmann, and Stevanovic) y de las bases de datos científicas (Rammensee et al. 213-19), ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los CTL activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

Tabla 3: Variantes y motivos descritos de los péptidos acordes con las SEQ ID N. ° 1 a 33

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Código del péptido		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID 1	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Código del péptido		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID 2	Variantes			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UHL5-001	Código del péptido		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID 3	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Código del péptido		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID 4	Variantes			F								
												L
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PROM-001	Código del péptido		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID 5	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Código del péptido		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
SEQ ID 6	Variantes			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	Código del péptido		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
SEQ ID 7	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	Código del péptido		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
SEQ ID 8	Variantes			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SMC4-001	Código del péptido		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F	

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID 9	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	Código del péptido		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L
SEQ ID 10	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	Código del péptido		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
SEQ ID 11	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	Código del péptido		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
SEQ ID 12	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	Código del péptido		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
SEQ ID 13	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	Código del péptido		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
SEQ ID 14	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	Código del péptido		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
SEQ ID 15	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	Código del péptido		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
SEQ ID 16	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	Código del péptido		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
SEQ ID 17	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	Código del péptido		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	
SEQ ID 18	Variantes			Y								
											L	
											I	

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	Código del péptido		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
SEQ ID 19	Variantes			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	Código del péptido		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
SEQ ID 20	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	Código del péptido		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
SEQ ID 21	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	Código del péptido		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
SEQ ID 22	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Código del péptido		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID 23	Variantes			F								

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Código del péptido		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID 24	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Código del péptido		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
SEQ ID 25	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	Código del péptido		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID 26	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Código del péptido		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID 27	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B1-001	Código del péptido		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID 28	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Código del péptido		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID 29	Variantes			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	Código del péptido		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID 30	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	Código del péptido		V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID 31	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001	Código del péptido		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID 32	Variantes			F								
												F
												I
				F								F

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	Código del péptido		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID 33	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CDC2-001	Código del péptido		L	Y	Q	I	L	Q	G	I	V	F
SEQ ID 1	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-002	Código del péptido		S	Y	N	P	L	W	L	R	I	
SEQ ID 2	Variantes			F								
												L
												F
				F								L
				F								F
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
UHL5-001	Código del péptido		N	Y	L	P	F	I	M	E	L	
SEQ ID 3	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MET-006	Código del péptido		S	Y	I	D	V	L	P	E	F	
SEQ ID 4	Variantes			F								
												L

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PROM-001	Código del péptido		S	Y	I	I	D	P	L	N	L	
SEQ ID 5	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMP11-001	Código del péptido		V	W	S	D	V	T	P	L	T	F
SEQ ID 6	Variantes			Y								
				F								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MST1R-001	Código del péptido		N	Y	L	L	Y	V	S	N	F	
SEQ ID 7	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NFYB-001	Código del péptido		V	Y	T	T	S	Y	Q	Q	I	
SEQ ID 8	Variantes			F								
												L
												F
				F								L

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				F							F	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SMC4-001	Código del péptido		H	Y	K	P	T	P	L	Y	F	
SEQ ID 9	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
UQCRB-001	Código del péptido		Y	Y	N	A	A	G	F	N	K	L
SEQ ID 10	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PPAP2C-001	Código del péptido		A	Y	L	V	Y	T	D	R	L	
SEQ ID 11	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
AVL9-001	Código del péptido		F	Y	I	S	P	V	N	K	L	
SEQ ID 12	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-001	Código del péptido		V	Y	G	I	R	L	E	H	F	
SEQ ID 13	Variantes			F								
												L

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABL1-001	Código del péptido		T	Y	G	N	L	L	D	Y	L	
SEQ ID 14	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MUC-006	Código del péptido		N	Y	E	E	T	F	P	H	I	
SEQ ID 15	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ASPM-001	Código del péptido		R	Y	L	W	A	T	V	T	I	
SEQ ID 16	Variantes			F								
											F	
											L	
				F							F	
				F							L	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
EPHA2-005	Código del péptido		V	Y	F	S	K	S	E	Q	L	
SEQ ID 17	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
MMP3-001	Código del péptido		V	F	I	F	K	G	N	Q	F	

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEQ ID 18	Variantes			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
NUF2-002	Código del péptido		R	F	L	S	G	I	I	N	F	
SEQ ID 19	Variantes			Y								
											L	
											I	
				Y							L	
				Y							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
PLK4-001	Código del péptido		Q	Y	A	S	R	F	V	Q	L	
SEQ ID 20	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-002	Código del péptido		K	Y	L	T	V	K	D	Y	L	
SEQ ID 21	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL12A1-001	Código del péptido		V	Y	N	P	T	P	N	S	L	
SEQ ID 22	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
COL6A3-001	Código del péptido		S	Y	L	Q	A	A	N	A	L	
SEQ ID 23	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
FANCI-001	Código del péptido		F	Y	Q	P	K	I	Q	Q	F	
SEQ ID 24	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
RSP11-001	Código del péptido		Y	Y	K	N	I	G	L	G	F	
SEQ ID 25	Variantes			F								
											L	
											I	
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-001	Código del péptido		A	Y	A	I	I	K	E	E	L	
SEQ ID 26	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ATAD2-003	Código del péptido		L	Y	P	E	V	F	E	K	F	
SEQ ID 27	Variantes			F								
											L	
											I	

ES 2 544 529 T3

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				F							L	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HSP90B1-001	Código del péptido		K	Y	N	D	T	F	W	K	E	F
SEQ ID 28	Variantes			F								
												L
												I
				F								L
				F								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SIAH2-001	Código del péptido		V	F	D	T	A	I	A	H	L	F
SEQ ID 29	Variantes			Y								
												L
												I
				Y								L
				Y								I
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
SLC6A6-001	Código del péptido		V	Y	P	N	W	A	I	G	L	
SEQ ID 30	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
IQGAP3-001	Código del péptido		V	Y	K	V	V	G	N	L	L	
SEQ ID 31	Variantes			F								
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
ERBB3-001	Código del péptido		V	Y	I	E	K	N	D	K	L	
SEQ ID 32	Variantes			F								

(continuación)

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
											F	
											I	
				F							F	
				F							I	
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KIF2C-001	Código del péptido		I	Y	N	G	K	L	F	D	L	L
SEQ ID 33	Variantes			F								
												F
												I
				F								F
				F								I

5 También pueden ser adecuados péptidos más largos. También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 11 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítomo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítomo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítomo durante el procesamiento.

En consecuencia, la presente invención también proporciona péptidos y variantes de epítomos de MHC de clase I en los que el péptido o variante tienen una longitud total de entre 10 y 14 aminoácidos.

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

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N. ° 1.

15 «Consiste esencialmente en» significa que un péptido conforme a la presente invención, además de la secuencia conforme a cualquiera de las SEQ ID N. ° 1 a SEQ ID N. ° 95 o una variante de las mismas, contiene segmentos adicionales de aminoácidos localizados en los extremos N- y/o C-terminal que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítomo para el epítomo de moléculas MHC.

20 No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido conforme a la presente invención en las células. En una forma de realización de la presente invención, el péptido es una parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497.

25 Además, el péptido o variante puede incluir enlace peptídico inverso o enlaces no peptídicos. En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

35 Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La patente de Estados Unidos 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en

presencia de NaCNBH_3 .

5 Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej. el grupo hidrofóbico t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

10 Adicionalmente, los péptidos de la invención pueden ser sintetizados para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el D-isómero de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido en lugar del L-isómero habitual. Y aún más, al menos uno de los residuos de aminoácidos de los péptidos de la invención puede ser sustituido por uno de los consabidos residuos de aminoácidos no naturales. Alteraciones como éstas pueden servir para aumentar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la capacidad de unión de los péptidos de la invención.

15 De manera similar, un péptido o variante descritos pueden ser modificados químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005, que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobenzilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido per fórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan et al. (John Wiley and Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

20 En resumen, la modificación de p. ej. los residuos arginilos de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilgloxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal con residuos de arginina. La cisteína se puede modificar sin la modificación simultánea de otros sitios nucleofílicos como sucede con la lisina y la histidina. Así pues, para la modificación de la cisteína hay disponible un gran número de reactivos. Las páginas web de empresas como Sigma-Aldrich (<http://www.sigma-aldrich.com>) ofrecen información sobre reactivos concretos.

La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro.

35 El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico.

Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal.

40 La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α -amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etileno)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas.

Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar por ejemplo con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

45 Los residuos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede consumir con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

En estudios recientes sobre la modificación del triptófano se han empleado N-bromosuccinimida, 2-hidroxi-5-nitrobenzilbromuro o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-escatol).

50 La modificación de proteínas terapéuticas y péptidos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

55 Un péptido o variante que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados con la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámida, como muestra Lu et al. (1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-

amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloiletilendiamina (entrelazante) y acriloisarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer Marder, and Albericio 29-43) y las referencias citadas en la misma).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

La purificación puede llevarse a cabo mediante una sola o una combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej. la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica un péptido o variante peptídica de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión que expresa un polipéptido conforme a la invención.

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

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

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen (Saiki et al. 487-91)). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por 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 hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas

incluyen las reveladas en las patentes de EE. UU. N. ° 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.

5 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 con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

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

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

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

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

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

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

50 La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procarionta o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariontas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N. ° ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por

ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

5 La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consuma con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariontas, véanse por ejemplo Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. El método de Beggs (1978) Nature 275,104-109 también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

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

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

25 En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) son en la actualidad objeto de investigación como tratamiento contra el cáncer de próstata (Sipuleucel-T) (Rini et al. 67-74; Small et al. 3089-94).

30 Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un péptido o de su variante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

35 En otra forma de 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 pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Brunsvig et al. 1553-64; Staehler et al.).

40 Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo dicho método la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de linfocitos T con moléculas MHC humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

45 Preferiblemente, la célula de mamífero carece del transportador de péptidos TAP o bien este se presenta en un nivel reducido o funciona defectuosamente. 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.

50 La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE. UU. con el N. ° de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N. ° de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Karre et al 1985.

55 Preferentemente, la célula hospedadora no expresa sustancialmente moléculas MHC de clase I antes de la transfección. También es preferible que la célula estimuladora exprese una molécula importante que proporcione una señal coestimuladora para los linfocitos T, como B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

De forma similar, si se utiliza como antígeno un epítipo de MHC de clase I, los linfocitos T serán CTL CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga la SEQ ID N. ° 1 o una secuencia de aminoácidos variante de la misma, en que dicha variante se selecciona entre el grupo de las secuencias LFQILQGIVF, LYQILQGIVL, LYQILQGIVI, LFQILQGIVL y LFQILQGIVI.

5 Existen otros métodos para generar CTL *in vitro*. Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples et al (1995) y Kawakami et al (1992) emplean linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al (1995) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los CTL. Jochmus et al (1997) describen la producción de CTL autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. Hill et al (1995) y Jerome et al (1993) emplean linfocitos B para la producción de CTL autólogos. Asimismo, para la preparación de CTL autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. 2003 describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En este estudio, las aAPC se generaron adheriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo citocinas como la interleucina-12.

Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase por ejemplo Porta et al (1994), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

Los linfocitos T activados que están dirigidos contra los péptidos de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, se describen linfocitos T activados que pueden obtenerse con los susodichos métodos de la invención.

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 1 a 95.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos.

Otra alternativa consiste en que los linfocitos T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que analizada se le detecte.

40 En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD8-positivos conformes a la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase I) y/o células estromales circundantes al tumor (células tumorales) (que en ocasiones también expresan MHC de clase I; (Dengjel et al. 4163-70)).

Los linfocitos T de la presente invención se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también proporciona un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen está reprimido en el tejido del que deriva el tumor pero en cambio se expresa en éste. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

Los linfocitos T se pueden obtener por métodos conocidos en la materia, como, por ejemplo, los antes descritos.

55 Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos y se pueden encontrar por ejemplo en (Dudley et al. 850-54; Dudley et al. 2346-57; Rosenberg et al. 889-97; Rosenberg et al. 1676-80; Yee et al. 16168-73); revisado en (Gattinoni et al. 383-93) y (Morgan et al.).

Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, vector de expresión, célula o CTL activado es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención puede ser utilizada como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede ser utilizada sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o con cualquier o cualesquier moléculas conocidas.

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i. d., i. m., s. c., i. p. e i. v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y Longenecker et al. 1993). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los linfocitos T CD8. No obstante, la estimulación de los CTL CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8, el compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos estimuladores de los CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N. ° 1 y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 15 y más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, 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 revisión general por ejemplo.

Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN de naturaleza viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o los péptidos codificados por el ácido nucleico puede ser una proteína de fusión, dotada por ejemplo con un epítipo que estimule a los linfocitos T específicos del CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej. respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX[®], AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA[®]), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, JuvImmune[®], LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel[®], micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej. MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel 932-33). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N. ° 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) [Gabrilovich 1996].

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación

- del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos T_{H1} y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta T_{H1} provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta T_{H2}. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 471-84). La patente de EE. UU. N.º 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 de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.
- Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen[®], Hiltonol[®], poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.
- Los adyuvantes preferidos son imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón alfa, oligonucleótidos CpG y derivados, poli-(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, y formulaciones de partículas con PLG o virosomas.
- En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante se selecciona del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, sargramostim), imiquimod, resiquimod e interferón alfa.
- En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante se selecciona del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, sargramostim), imiquimod y resiquimod.
- En otra forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es imiquimod o resiquimod.
- Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3th Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Formulaciones de ejemplo se pueden encontrar en EP2113253.
- La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en concreto del cáncer gástrico, del carcinoma de células renales, el cáncer de colon, el carcinoma de pulmón amicrocítico, adenocarcinoma, cáncer de próstata, neoplasia benigna y melanoma maligno.
- Se describe además un equipo que comprende:
- (a) un envase que contiene una composición farmacéutica como la descrita más arriba, en forma de solución o liofilizada;
 - (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y
 - (c) opcionalmente, (I) instrucciones de uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

El equipo puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (V) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

5 Los equipos descritos comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej. viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el equipo y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones en el envase que indica las instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej. de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El equipo puede comprender, además, un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

15 Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

20 Los equipos descritos pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención acompañado o no de otros componentes (p. ej. otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

25 Preferiblemente, los equipos descritos incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej. GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénesis, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

30 El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente equipo.

35 La presente formulación puede ser toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

40 Puesto que los péptidos descritos proceden de MST1R, UCHL5, SMC4, NFYB, PPAP2C, AVL9, UQCRB y MUC6 que fueron aislados en el cáncer gástrico, el medicamento de la invención debe utilizarse preferentemente para tratar el cáncer gástrico.

45 A continuación se describirá la presente invención con los ejemplos siguientes que muestran las formas de realización preferidas de la misma a título ilustrativo, sin que con ello se pretenda limitar la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1:

50 Identificación de los péptidos asociados a tumor presentados en la superficie celular

Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes fueron facilitados por la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (KPUM), Kyoto, Japón, la Facultad de Medicina de la Universidad de la Ciudad de Osaka (OCU), Osaka, Japón, y el Hospital Universitario de Tübingen, Alemania. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito

antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

- 5 Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk, K. 1991; Seeger F. H. T 1999) con el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, sefarsosa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Métodos

- 10 Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema nanoAcquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm d.i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo operar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia. La Fig. 1 muestra un ejemplo de espectro obtenido de tejido tumoral correspondiente al péptido asociado a MHC de clase I CDC2-001 y su perfil de elución en el sistema UPLC.

25 EJEMPLO 2

Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos de la invención

- 30 No todos los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas MHC son adecuados para la inmunoterapia, porque la mayoría de ellos proceden de proteínas celulares normales que se expresan en multitud de tipos de células. Muy pocos de esos péptidos están asociados a tumores y probablemente sean capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual derivan. A fin de descubrirlos y de minimizar el riesgo de que la vacuna genere autoinmunidad los inventores se centraron en los péptidos derivados de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

- 35 El péptido ideal sería el derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que derivaban de genes dotados con un perfil de expresión similar al ideal los péptidos identificados se asignaron a las proteínas y después a los genes originarios y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

Fuentes de ARN y preparación

- 40 Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por diversos centros clínicos (véase Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Alemania) y después se purificaron con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 45 El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, CA, EE. UU.). El ARN de varios individuos (de 2 y 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. Cuatro voluntarios sanos donaron sangre de la que se extrajeron los leucocitos.

- 50 La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent)

Experimentos con micromatrices

El análisis de la expresión génica 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, CA, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador 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, NY, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el 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 por defecto en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0.

Los perfiles de expresión de los genes originarios que aparecen altamente sobreexpresados en el cáncer gástrico se muestran en la Fig. 2.

15 EJEMPLO 3

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I delIMA941

Para obtener información relativa a la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, llevamos a cabo un análisis con una conocida plataforma de estimulación *in vitro* descrita por (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978). Con este sistema hemos podido demostrar resultados positivos de inmunogenicidad (es decir, de expansión de linfocitos T específicos) en 47 de 54 TUMAP restringidos a HLA-A*2402 y en 3 de 3 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 analizados, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en el ser humano (Tabla 4).

25 Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis HLA-A*24 o de capas leucocíticas HLA-A*2 de donantes sanos obtenidas del Banco de sangre de Tubinga.

Los linfocitos CD8+ fueron directamente enriquecidos o primero se aislaban las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) con un medio de separación en gradiente estándar (PAA, Cölbe, Alemania). Los linfocitos CD8+ o las PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / estreptomina 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). En esta etapa del cultivo al medio TCM también se le añadieron IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Novartis Pharma, Núremberg, Alemania). El aislamiento de los linfocitos CD8+ se efectuó por selección positiva con microperlas MicroBeads CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania).

La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros (Walter et al. 4974-78) con pequeñas modificaciones. En suma, se sintetizaron moléculas recombinantes HLA-A*2402 y HLA-A*0201 cargadas con el péptido y biotiniladas desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada. El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9. 3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung, Ledbetter, and Muller-Eberhard 4611-15) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,6 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los pMHC usados como controles de alta y baja inmunogenicidad fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 modificado) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800. 000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng de pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa del 95%. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37°C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces.

Finalmente, se realizaron análisis multiméricos tiñendo las células con multímeros A*0201 o A*2402 fluorescentes (productos según la descripción de {Altman, 1996 ALTMAN1996 /id}) y anticuerpo CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) o adicionalmente con un marcador de viabilidad (Colorante vital Live/dead-Aqua o colorante Violet (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), y se hicieron en un citómetro FACSCalibur (BD) de cuatro colores o en un

LSRII SORP (BD; dieciocho colores, equipado con azul (488 nm), violeta (405 nm), rojo (640 nm) y verde (532 nm), respectivamente.

5 Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FCSExpress o FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.).
 10 La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ multimérico+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de multimérico+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células multimérico+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones de los respectivos controles negativos (estimulación con el multimérico irrelevante y tinción con el multimérico relevante) y las células no estaban localizadas en la diagonal de la gráfica).

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de IMA941

15 En 47 de los 54 péptidos HLA-A*2402 y en 3 de los 3 péptidos HLA-A*0201 analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se pudo demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 3 se muestran a modo de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de dos péptidos de la invención tras la tinción de multiméricos específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados correspondientes a los 54 péptidos A*2402 y a los 3 péptidos A*0201 se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I

Los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por Immatics presentan el porcentaje de donantes y de pocillos que dieron positivo entre los evaluables. Como mínimo resultaron evaluables cuatro donantes y 48 pocillos de cada péptido. La SEQ ID N. ° 1 es la de la invención.

SEQ ID N°:	Antígeno	Donantes positivos/evaluables [%]	Pocillos positivos/evaluables [%]
1	CDC2-001	83	28
2	ASPM-002	67	32
18	MMP3-001	11	1
4	MET-006	67	21
3	UHL5-001	75	12
7	MST1R-001	50	13
33	KIF2C-001	17	2
9	SMC4-001	73	10
17	EPHA2-005	0	0
5	PROM1-001	83	26
6	MMP11-001	33	11
8	NFYB-001	50	7
16	ASPM-001	17	3
20	PLK4-001	60	5
14	ABL1-001	83	18
26	ATAD2-001	33	3
21	ATAD2-002	17	1
27	ATAD2-003	0	0
12	AVL9-001	100	31
22	COL12A1-001	0	0

ES 2 544 529 T3

(continuación)

SEQ ID N°:	Antígeno	Donantes positivos/evaluables [%]	Pocillos positivos/evaluables [%]
23	COL6A3-001	0	0
24	FANCI-001	17	1
28	HSP90B1-001	50	7
15	MUC6-001	83	22
13	NUF2-001	100	50
19	NUF2-002	50	6
11	PPAP2C-001	83	29
25	RPS11-001	17	3
29	SIAH2-001	50	8
30	SLC6A6-001	17	1
10	UQCRB-001	83	24
31	IQGAP3-001	100	24
32	ERBB3-001	83	
	CCDC88A-001	0	0
	CCNB1-003	33	3
	CCND2-001	17	10
	CCNE2-001	0	0
	CEA-010	40	3
	CLCN3-001	33	6
	DNAJC10-001	50	15
	DNAJC10-002	33	3
	EIF2S3-001	17	1
	EIF3L-001	100	29
	EPPK1-001	17	1
	GPR39-001	50	6
	ITGB4-001	67	20
	LCN2-001	17	1
	SDHC-001	33	3
	PBK-001	0	0
	POLD3-001	67	7
	PSMD14-001	17	1
	PTK2-001	17	4
	TSPAN1-002	17	1

(continuación)

SEQ ID N°:	Antígeno	Donantes positivos/evaluables [%]	Pocillos positivos/evaluables [%]
	ZNF598-001	83	17

Los péptidos siguientes ya han sido descritos en otras solicitudes presentadas por Immatics y están incluidos en las vacunas IMA901 (MET-001 y TOP-001), IMA910 (MET-001 y TOP-001) e IMA950 (IGF2BP3-001). Por ejemplo, MET-001 propicia reacciones *in vivo* extremadamente buenas y los datos se pueden considerar como una indicación de la utilidad clínica de los péptidos.

5

SEQ ID N°:	Antígeno	Donantes positivos/evaluables [%]	Pocillos positivos/evaluables [%]
	IGF2BP3-001	50	21
	MET-001	67	42
	TOP-001	40	10

Lista de referencias bibliográficas

- 10 Ahmed, A. U., et al. "Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth." J Natl.Cancer Inst. 100.22 (2008): 1606-29.
- Allison, J. P. and M. F. Krummel. "The Yin and Yang of T cell costimulation." Science 270.5238 (1995): 932-33.
- Altmeyer, A., et al. "Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96." Int J Cancer 69.4 (1996): 340-49.
- 15 Appay, V., et al. "Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide." Eur.J Immunol. 36.7 (2006): 1805-14.
- Banerjee, S. K., et al. "Expression of cdc2 and cyclin B1 in Helicobacter pylori-associated gastric MALT and MALT lymphoma : relationship to cell death, proliferation, and transformation." Am J Pathol. 156.1 (2000): 217-25.
- 20 Bartman, A. E., et al. "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps." Int J Cancer 80.2 (1999): 210-18.
- Basu, S., et al. "Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway." Int Immunol. 12.11 (2000): 1539-46.
- Bauer, B., S. Bartfeld, and T. F. Meyer. "H. pylori selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA." Cell Microbiol. 11.1 (2009): 156-69.
- 25 Benatti, P., et al. "A balance between NF-Y and p53 governs the pro- and anti-apoptotic transcriptional response." Nucleic Acids Res 36.5 (2008): 1415-28.
- Bertolini, G., et al. "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 106.38 (2009): 16281-86.
- Bierie, B. and H. L. Moses. "TGF-beta and cancer." Cytokine Growth Factor Rev. 17.1-2 (2006): 29-40.
- 30 Bitoun, E. and K. E. Davies. "The robotic mouse: unravelling the function of AF4 in the cerebellum." Cerebellum. 4.4 (2005): 250-60.
- Bolhassani, A. and S. Rafati. "Heat-shock proteins as powerful weapons in vaccine development." Expert.Rev.Vaccines. 7.8 (2008): 1185-99.
- 35 Borset, M., et al. "The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies." Leuk.Lymphoma 32.3-4 (1999): 249-56.
- Bradbury, P. A., et al. "Matrix metalloproteinase 1, 3 and 12 polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk and prognosis." Carcinogenesis 30.5 (2009): 793-98.
- Brown, C. E., et al. "Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells." Cancer Research 69.23 (2009): 8886-93.
- 40 Bruckdorfer, T., O. Marder, and F. Albericio. "From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future." Curr.Pharm.Biotechnol. 5.1 (2004): 29-43.
- Brunsvig, P. F., et al. "Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer." Cancer Immunol.Immunother. 55.12 (2006): 1553-64.
- 45 Cabanes, D., et al. "Gp96 is a receptor for a novel Listeria monocytogenes virulence factor, Vip, a surface protein." EMBO J 24.15 (2005): 2827-38.
- Calzado, M. A., et al. "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." Nat.Cell Biol. 11.1 (2009): 85-91.
- Castelli, C., et al. "Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer." Cancer Immunol.Immunother. 53.3 (2004): 227-33.
- 50 Castriconi, R., et al. "Both CD133+ and C." Eur.J Immunol. 37.11 (2007): 3190-96.

- Chanock, S. J., et al. "HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA." Hum.Immunol. 65 (2004): 1211-23.
- Chen, C. H., et al. "Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 100.16 (2003): 9226-31.
- 5 Chen, Z. and J. J. O'Shea. "Regulation of IL-17 production in human lymphocytes." Cytokine 41.2 (2008): 71-78.
- Cho, S. O., et al. "Helicobacter pylori in a Korean Isolate Expressed Proteins Differentially in Human Gastric Epithelial Cells." Dig.Dis.Sci. (2009).
- Christianson, J. C., et al. "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." Nat.Cell Biol. 10.3 (2008): 272-82.
- 10 Cisek, L. J. and J. L. Corden. "Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2." Nature 339.6227 (1989): 679-84.
- Colombetti, S., et al. "Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin." J Immunol. 176.5 (2006): 2730-38.
- Confalonieri, S., et al. "Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor." Oncogene 28.33 (2009): 2959-68.
- 15 Corso, S., et al. "Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases." Oncogene 27.5 (2008): 684-93.
- Cox, C. V., et al. "Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL." Blood 113.14 (2009): 3287-96.
- 20 Cunha-Ferreira, I., et al. "The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4." Curr.Biol. 19.1 (2009): 43-49.
- DeLuca, J. G., et al. "Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites." Mol.Biol.Cell 16.2 (2005): 519-31.
- Deng, H., et al. "Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells." Biochem.Biophys.Res Commun. 326.2 (2005): 274-81.
- 25 Dengjel, J., et al. "Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas." Clin Cancer Res. 12.14 (2006): 4163-70.
- Deremer, D. L., C. Ustun, and K. Natarajan. "Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia." Clin Ther. 30.11 (2008): 1956-75.
- 30 Di Renzo, M. F., et al. "Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer." Clin.Cancer Res. 1.2 (1995): 147-54.
- Dong, G., et al. "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Res. 61.15 (2001): 5911-18.
- 35 Dudley, M. E., et al. "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science 298.5594 (2002): 850-54.
- Dudley, M. E., et al. "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." J.Clin.Oncol. 23.10 (2005): 2346-57.
- 40 Duong, C., et al. "Pretreatment gene expression profiles can be used to predict response to neoadjuvant chemoradiotherapy in esophageal cancer." Ann Surg Oncol 14.12 (2007): 3602-09.
- Egland, K. A., et al. "High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 103.15 (2006): 5929-34.
- 45 Eramo, A., et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." Cell Death Differ 15.3 (2008): 504-14.
- Esashi, F., et al. "CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair." Nature 434.7033 (2005): 598-604.
- Escobar, M. A., et al. "Profiling of nuclear extract proteins from human neuroblastoma cell lines: the search for fingerprints." J Pediatr.Surg 40.2 (2005): 349-58.
- 50 Ferracini, R., et al. "The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit." Oncogene 10.4 (1995): 739-49.
- Fischer, J., et al. "Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours." Oncogene 17.6 (1998): 733-39.
- 55 Flanagan, J. M., et al. "Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets." Mol.Cancer Ther. 8.1 (2009): 249-60.
- Fong, L., et al. "Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.15 (2001): 8809-14.
- Frasor, J., et al. "Estrogen down-regulation of the corepressor N-CoR: mechanism and implications for estrogen derepression of N-CoR-regulated genes." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 102.37 (2005): 13153-57.
- 60 Frew, I. J., et al. "Generation and analysis of Siah2 mutant mice." Mol.Cell Biol. 23.24 (2003): 9150-61.
- Fu, Y. and A. S. Lee. "Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy." Cancer Biol.Theor. 5.7 (2006): 741-44.
- Furge, K. A., et al. "Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98.19 (2001): 10722-27.
- 65 Furge, K. A., Y. W. Zhang, and G. F. Vande Woude. "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins." Oncogene 19.49 (2000): 5582-89.

- Gattinoni, L., et al. "Adoptive immunotherapy for cancer: building on success." Nat.Rev.Immunol. 6.5 (2006): 383-93.
- Gherardi, E. and M. Stoker. "Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met." Cancer Cells 3.6 (1991): 227-32.
- 5 Glen, A., et al. "TRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression." J Proteome.Res 7.3 (2008): 897-907.
- Gnjatic, S., et al. "NY-CO-58/KIF2C is overexpressed in a variety of solid tumors and induces frequent T cell responses in patients with colorectal cancer." Int J Cancer (2009).
- 10 Guo, W. C., et al. "Expression and its clinical significance of heat shock protein gp96 in human osteosarcoma." Neoplasma 57.1 (2010): 62-67.
- Habelhah, H., et al. "Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2." EMBO J 21.21 (2002): 5756-65.
- Hamamoto, A., et al. "Aberrant expression of the gastric mucin MUC6 in human pulmonary adenocarcinoma xenografts." Int J Oncol 26.4 (2005): 891-96.
- 15 Harada, T., et al. "Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques." Pancreatolgy. 9.1-2 (2009): 13-24.
- Harper, L. J., et al. "Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma." J Oral Pathol.Med 36.10 (2007): 594-603.
- Hayama, S., et al. "Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis." Cancer Research 66.21 (2006): 10339-48.
- 20 Hayashi, M., et al. "High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer." Clinical Cancer Research 14.23 (2008): 7843-49.
- Heike, M., et al. "Expression of stress protein gp96, a tumor rejection antigen, in human colorectal cancer." Int J Cancer 86.4 (2000): 489-93.
- 25 Hodorova, I., et al. "Gp96 and its different expression in breast carcinomas." Neoplasma 55.1 (2008): 31-35.
- Horton, R. A., et al. "A substrate for deubiquitinating enzymes based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein." Anal.Biochem. 360.1 (2007): 138-43.
- House, C. M., A. Moller, and D. D. Bowtell. "Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways." Cancer Research 69.23 (2009): 8835-38.
- 30 Howard, E. W., et al. "Decreased adhesiveness, resistance to anoikis and suppression of GRP94 are integral to the survival of circulating tumor cells in prostate cancer." Clin Exp.Metastasis 25.5 (2008): 497-508.
- Hu, G. and E. R. Fearon. "Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins." Mol.Cell Biol. 19.1 (1999): 724-32.
- 35 Huang, Y., et al. "Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells." Mol.Cell Biochem. 308.1-2 (2008): 133-39.
- Jansen, M. P., et al. "Downregulation of SIAH2, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer." Breast Cancer Res Treat. 116.2 (2009): 263-71.
- Jia, H. L., et al. "Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma." Clinical Cancer Research 13.4 (2007): 1133-39.
- 40 Jucker, M., et al. "The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma." Leuk.Res. 18.1 (1994): 7-16.
- Jung, G., J. A. Ledbetter, and H. J. Muller-Eberhard. "Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates." Proc Natl Acad Sci U S A 84.13 (1987): 4611-15.
- 45 Jung, H. M., S. J. Choi, and J. K. Kim. "Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers." J Cell Biochem. 106.4 (2009): 703-13.
- Kaneko, N., et al. "siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis." Biochem.Biophys.Res Commun. 390.4 (2009): 1235-40.
- 50 Kang, H. M., et al. "Effects of Helicobacter pylori Infection on gastric mucin expression." J Clin Gastroenterol. 42.1 (2008): 29-35.
- Ko, M. A., et al. "Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis." Nat.Genet. 37.8 (2005): 883-88.
- Kobayashi, M., et al. "Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas." Oncogene 22.9 (2003): 1294-301.
- 55 Koochekpour, S., et al. "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas." Cancer Res. 57.23 (1997): 5391-98.
- Korzeniewski, N., et al. "Cullin 1 functions as a centrosomal suppressor of centriole multiplication by regulating polo-like kinase 4 protein levels." Cancer Research 69.16 (2009): 6668-75.
- 60 Krieg, A. M. "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." Nat.Rev.Drug Discov. 5.6 (2006): 471-84.
- Kunimoto, K., et al. "Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development." J Cell Physiol 220.3 (2009): 621-31.
- Kuriyama, R., et al. "Gamma-tubulin-containing abnormal centrioles are induced by insufficient Plk4 in human HCT116 colorectal cancer cells." J Cell Sci. 122.Pt 12 (2009): 2014-23.
- 65 Lee, H. S., et al. "MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators." Cancer 92.6 (2001): 1427-34.
- Leivo, I., et al. "Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial

- differentiation." *Cancer Genet.Cytogenet.* 156.2 (2005): 104-13.
- Lemmel, C., et al. "Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling." *Nat.Biotechnol.* 22.4 (2004): 450-54.
- 5 Li, G., et al. "Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development." *Oncogene* 20.56 (2001): 8125-35.
- Lim, S. O., et al. "Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules." *World J Gastroenterol.* 11.14 (2005): 2072-79.
- Lin, W., et al. "Tyrosine kinases and gastric cancer." *Oncogene* 19.49 (2000): 5680-89.
- 10 Liu, B. and Z. Li. "Endoplasmic reticulum HSP90b1 (gp96, grp94) optimizes B-cell function via chaperoning integrin and TLR but not immunoglobulin." *Blood* 112.4 (2008): 1223-30.
- Liu, S. Y., et al. "Requirement of MMP-3 in anchorage-independent growth of oral squamous cell carcinomas." *J Oral Pathol.Med* 36.7 (2007): 430-35.
- 15 Lochter, A., et al. "The significance of matrix metalloproteinases during early stages of tumor progression." *Ann N.Y.Acad.Sci.* 857 (1998): 180-93.
- Lund, C. V., et al. "Zinc finger transcription factors designed for bispecific coregulation of ErbB2 and ErbB3 receptors: insights into ErbB receptor biology." *Mol.Cell Biol.* 25.20 (2005): 9082-91.
- Ma, S., et al. "Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells." *Gastroenterology* 132.7 (2007): 2542-56.
- 20 MacLeod, R. J., M. Hayes, and I. Pacheco. "Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells." *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 293.1 (2007): G403-G411.
- Macmillan, J. C., et al. "Comparative expression of the mitotic regulators SAK and PLK in colorectal cancer." *Ann Surg Oncol* 8.9 (2001): 729-40.
- 25 Maney, T., et al. "The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view." *Int Rev.Cytol.* 194 (2000): 67-131.
- Martin, C. M., et al. "Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy." *Methods Mol.Biol.* 511 (2009): 333-59.
- Matsukita, S., et al. "Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma." *Histopathology* 42.1 (2003): 26-36.
- 30 Maulik, G., et al. "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." *Cytokine Growth Factor Rev.* 13.1 (2002): 41-59.
- Mizrak, D., M. Brittan, and M. Alison. "CD133: molecule of the moment." *J.Pathol.* 214.1 (2008): 3-9.
- Montesano, R., et al. "Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis." *Cell Growth Differ.* 9.5 (1998): 355-65.
- 35 Monzani, E., et al. "Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential." *Eur.J Cancer* 43.5 (2007): 935-46.
- Moore, A. and L. Wordeman. "The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis." *Trends Cell Biol.* 14.10 (2004): 537-46.
- Morgan, R. A., et al. "Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes." *Science* (2006).
- 40 Mori, M., et al. "HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry." *Transplantation* 64.7 (1997): 1017-27.
- Murray, G. I., et al. "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer." *Gut* 43.6 (1998): 791-97.
- 45 Murshid, A., J. Gong, and S. K. Calderwood. "Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation." *Expert.Rev.Vaccines.* 7.7 (2008): 1019-30.
- Nakaigawa, N., et al. "Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma." *Cancer Res.* 66.7 (2006): 3699-705.
- Nakamura, Y., et al. "Clinicopathological and biological significance of mitotic centromere-associated kinesin overexpression in human gastric cancer." *Br.J Cancer* 97.4 (2007): 543-49.
- 50 Nakayama, K., J. Qi, and Z. Ronai. "The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response." *Mol.Cancer Res* 7.4 (2009): 443-51.
- Naldini, L., et al. "Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET." *Oncogene* 6.4 (1991): 501-04.
- 55 Nguyen, Q. N., et al. "Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells." *Biochim.Biophys.Acta* 1758.3 (2006): 394-403.
- Nishio, K., et al. "Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 390.3 (2009): 855-60.
- Nojima, H., et al. "IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade." *Nat.Cell Biol.* 10.8 (2008): 971-78.
- 60 Nomura, H., et al. "Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas." *Int J Cancer* 69.1 (1996): 9-16.
- Nomura, H., et al. "Network-based analysis of calcium-binding protein genes identifies Grp94 as a target in human oral carcinogenesis." *Br.J Cancer* 97.6 (2007): 792-801.
- Ohnuma, S., et al. "Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSMB genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues." *Surgery* 145.1 (2009): 57-68.
- 65 Park, Y. H., et al. "Capecitabine in combination with Oxaliplatin (XELOX) as a first-line therapy for advanced

- gastric cancer." Cancer Chemother.Pharmacol. (2007).
- Pascolo, S., et al. "The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells." Int.Immunol. 17.2 (2005): 117-22.
- 5 Peel, N., et al. "Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation." Curr.Biol. 17.10 (2007): 834-43.
- Pereira, M. B., et al. "Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues." J Clin Pathol. 54.3 (2001): 210-13.
- Pietra, G., et al. "Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells." Int Immunol. 21.7 (2009): 793-801.
- 10 Poller, D. N., et al. "Production and characterization of a polyclonal antibody to the c-erbB-3 protein: examination of c-erbB-3 protein expression in adenocarcinomas." J Pathol. 168.3 (1992): 275-80.
- Pons, E., C. C. Uphoff, and H. G. Drexler. "Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines." Leuk.Res. 22.9 (1998): 797-804.
- Ponzetto, C., et al. "A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor." Mol.Cell Biol. 13.8 (1993): 4600-08.
- 15 Poppe, M., et al. "Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility." Oncogene 26.24 (2007): 3462-72.
- Pytel, D., et al. "Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy." Anticancer Agents Med Chem. 9.1 (2009): 66-76.
- 20 Qi, J., et al. "The ubiquitin ligase Siah2 regulates tumorigenesis and metastasis by HIF-dependent and -independent pathways." Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A 105.43 (2008): 16713-18.
- Qian, C. N., et al. "Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma." Cancer Res. 62.2 (2002): 589-96.
- Qian, Z., et al. "Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia." Chem.Biol.Interact. (2009).
- 25 Ramirez, R., et al. "Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma." Clin Endocrinol.(Oxf) 53.5 (2000): 635-44.
- Rammensee, H. G., et al. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." Immunogenetics 50.3-4 (1999): 213-19.
- 30 Rammensee, H. G., J. Bachmann, and S. Stevanovic. MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1997.
- Rappa, G., O. Fodstad, and A. Lorico. "The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma." Stem Cells 26.12 (2008): 3008-17.
- 35 Richardson, G. D., et al. "CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells." J Cell Sci. 117.Pt 16 (2004): 3539-45.
- Rini, B. I., et al. "Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy." Cancer 107.1 (2006): 67-74.
- 40 Rodrigues-Martins, A., et al. "Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis." Science 316.5827 (2007): 1046-50.
- Rosenberg, S. A., et al. "A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone." N.Engl.J.Med. 316.15 (1987): 889-97.
- 45 Rosenberg, S. A., et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." N.Engl.J Med 319.25 (1988): 1676-80.
- Rott, R., et al. "Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells." J Biol.Chem. 283.6 (2008): 3316-28.
- Rutella, S., et al. "Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors." Clinical Cancer Research 15.13 (2009): 4299-311.
- 50 Saiki, R. K., et al. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239.4839 (1988): 487-91.
- Samant, G. V. and P. W. Sylvester. "gamma-Tocotrienol inhibits ErbB3-dependent PI3K/Akt mitogenic signalling in neoplastic mammary epithelial cells." Cell Prolif. 39.6 (2006): 563-74.
- 55 Sanidas, E. E., et al. "Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer." Int J Cancer 54.6 (1993): 935-40.
- Scott, G. K., et al. "Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b." J Biol.Chem. 282.2 (2007): 1479-86.
- Sergina, N. V., et al. "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3." Nature 445.7126 (2007): 437-41.
- 60 Shah, M., et al. "Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis." Pigment Cell Melanoma Res 22.6 (2009): 799-808.
- Shapiro, G. I. "Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment." J Clin Oncol 24.11 (2006): 1770-83.
- 65 Sherman-Baust, C. A., et al. "Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells." Cancer Cell 3.4 (2003): 377-86.

- Sheu, M. L., S. H. Liu, and K. H. Lan. "Honokiol induces calpain-mediated glucose-regulated protein-94 cleavage and apoptosis in human gastric cancer cells and reduces tumor growth." PLoS. ONE. 2.10 (2007): e1096.
- Shimo, A., et al. "Involvement of kinesin family member 2C/mitotic centromere-associated kinesin overexpression in mammary carcinogenesis." Cancer Sci. 99.1 (2008): 62-70.
- Singh, S. K., et al. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res. 63.18 (2003): 5821-28.
- Singh, S. K., et al. "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature 432.7015 (2004): 396-401.
- Sithanandam, G. and L. M. Anderson. "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy." Cancer Gene Ther. 15.7 (2008): 413-48.
- Sithanandam, G., et al. "Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549." Oncogene 24.11 (2005): 1847-59.
- Skawran, B., et al. "Gene expression profiling in hepatocellular carcinoma: upregulation of genes in amplified chromosome regions." Mod.Pathol. 21.5 (2008): 505-16.
- Slesak, B., et al. "Expression of epidermal growth factor receptor family proteins (EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3) in gastric cancer and chronic gastritis." Anticancer Res 18.4A (1998): 2727-32.
- Small, E. J., et al. "Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer." J Clin Oncol. 24.19 (2006): 3089-94.
- Smith, L. M., et al. "CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers." Br.J Cancer 99.1 (2008): 100-09.
- Smith, M. J., et al. "Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification." Br.J Cancer 100.9 (2009): 1452-64.
- Smogorzewska, A., et al. "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." Cell 129.2 (2007): 289-301.
- Staeher, M., Stenzl, A., Dietrich, P. Y., Eisen, T., Haferkamp, A., Beck, J., Mayer, A., Walter, S., Singh-Jasuja, H., and Stief, C. A phase I study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine IMA901 in renal cell carcinoma patients (RCC). Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1 Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5098. 6-20-2007.
Ref Type: Abstract
- Stemmann, O., et al. "Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase." Cell 107.6 (2001): 715-26.
- Suetsugu, A., et al. "Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells." Biochem.Biophys.Res.Commun. 351.4 (2006): 820-24.
- Suva, M. L., et al. "Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma." Cancer Research (2009).
- Swallow, C. J., et al. "Sak/Plk4 and mitotic fidelity." Oncogene 24.2 (2005): 306-12.
- Szczepanowski, M., et al. "Regulation of repp86 stability by human Siah2." Biochem.Biophys.Res Commun. 362.2 (2007): 485-90.
- Tajima, Y., et al. "Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significance and genetic background." Clinical Cancer Research 12.21 (2006): 6469-79.
- Takaishi, S., et al. "Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44." Stem Cells 27.5 (2009): 1006-20.
- Takayama, H., et al. "Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94.2 (1997): 701-06.
- Teofili, L., et al. "Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease." Blood 97.4 (2001): 1063-69.
- Thorsen, K., et al. "Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis." Mol.Cell Proteomics. 7.7 (2008): 1214-24.
- Tirino, V., et al. "The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer." Eur.J Cardiothorac.Surg 36.3 (2009): 446-53.
- Todaro, M., et al. "Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4." Cell Stem Cell 1.4 (2007): 389-402.
- Topol, L., et al. "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol. 162.5 (2003): 899-908.
- Toribara, N. W., et al. "Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning." J Biol.Chem. 268.8 (1993): 5879-85.
- Tsan, M. F. and B. Gao. "Heat shock protein and innate immunity." Cell Mol.Immunol. 1.4 (2004): 274-79.
- Tuck, A. B., et al. "Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma." Am.J.Pathol. 148.1 (1996): 225-32.
- Vairaktaris, E., et al. "Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer." Anticancer Res 27.6B (2007): 4095-100.
- Vandenbroeck, K., E. Martens, and I. Alloza. "Multi-chaperone complexes regulate the folding of interferon-gamma in the endoplasmic reticulum." Cytokine 33.5 (2006): 264-73.
- Walter, S., et al. "Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres." J.Immunol. 171.10 (2003): 4974-78.
- Wang, Q., et al. "Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human

- lung cancer tissues and its significance." *Cancer Detect.Prev.* 29.6 (2005): 544-51.
- Wang, R., et al. "Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice." *J.Cell Biol.* 153.5 (2001): 1023-34.
- Wang, R. Q. and D. C. Fang. "Effects of Helicobacter pylori infection on mucin expression in gastric carcinoma and pericancerous tissues." *J Gastroenterol.Hepatol.* 21.2 (2006): 425-31.
- 5 Wang, S., et al. "IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth." *J Cell Sci.* 120.Pt 4 (2007): 567-77.
- Wang, X., et al. "Immunolocalisation of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in colonic adenocarcinoma." *Acta Histochem.* 110.2 (2008): 117-23.
- 10 Wang, X. P., et al. "Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma." *World J Gastroenterol.* 11.3 (2005): 429-32.
- Wang, X. P., et al. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma." *World J Gastroenterol.* 11.7 (2005): 1056-59.
- Wang, X. P., Q. X. Wang, and X. P. Ying. "Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human gastric adenocarcinoma." *Tohoku J Exp.Med* 212.1 (2007): 35-41.
- 15 Weinschenk, T., et al. "Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines." *Cancer Res.* 62.20 (2002): 5818-27.
- White, C. D., M. D. Brown, and D. B. Sacks. "IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis." *FEBS Lett.* 583.12 (2009): 1817-24.
- 20 Wicks, S. J., et al. "Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway." *Biochem.Soc Trans.* 34.Pt 5 (2006): 761-63.
- Wicks, S. J., et al. "The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling." *Oncogene* 24.54 (2005): 8080-84.
- Yajima, S., et al. "Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer." *Int J Oncol* 31.5 (2007): 1029-37.
- 25 Yang, L., et al. "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." *Nature* (2008).
- Yang, S., et al. "Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer." *Biochim.Biophys.Acta* 1772.9 (2007): 1033-40.
- Yao, D. F., et al. "Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma." *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int* 5.3 (2006): 381-86.
- 30 Yasui, W., et al. "Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas." *Int J Cancer* 53.1 (1993): 36-41.
- Yee, C., et al. "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99.25 (2002): 16168-73.
- 35 Yin, S., et al. "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." *Int.J Cancer* 120.7 (2007): 1444-50.
- Yokozaki, H., W. Yasui, and E. Tahara. "Genetic and epigenetic changes in stomach cancer." *Int Rev.Cytol.* 204 (2001): 49-95.
- 40 Yuan, W., et al. "Expression of EphA2 and E-cadherin in gastric cancer: correlated with tumor progression and lymphogenous metastasis." *Pathol.Oncol Res* 15.3 (2009): 473-78.
- Yuan, W. J., et al. "Over-expression of EphA2 and EphrinA-1 in human gastric adenocarcinoma and its prognostic value for postoperative patients." *Dig.Dis.Sci.* 54.11 (2009): 2410-17.
- Zaremba, S., et al. "Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen." *Cancer Res.* 57.20 (1997): 4570-77.
- 45 Zhang, X., R. M. Kedl, and J. Xiang. "CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8- dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones." *Biochem.Biophys.Res Commun.* 379.4 (2009): 954-58.
- Zhang, X. L., et al. "Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer." *World J Surg* 33.10 (2009): 2112-18.
- 50 Zhao, C., et al. "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." *Nature* (2009).
- Zheng, H., et al. "Cell surface targeting of heat shock protein gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity." *J Immunol.* 167.12 (2001): 6731-35.
- Zheng, H., et al. "MUC6 down-regulation correlates with gastric carcinoma progression and a poor prognosis: an immunohistochemical study with tissue microarrays." *J Cancer Res Clin Oncol* 132.12 (2006): 817-23.
- 55 Zheng, H. C., et al. "Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas." *Hum.Pathol.* 39.7 (2008): 1042-49.
- Zhou, G., et al. "2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers." *Mol.Cell Proteomics.* 1.2 (2002): 117-24.
- 60 Zhou, L., et al. "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function." *Nature* 453.7192 (2008): 236-40.
- Zhu, K. J., et al. "Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells." *Int Immunopharmacol.* 9.4 (2009): 412-17.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

5 <120> NUEVA INMUNOTERAPIA CONTRA DIVERSOS TUMORES COMO EL CÁNCER GASTROINTESTINAL Y GÁSTRICO

<130> I31890EP

<150> GB1004551.6

<151> 29-03-2010

10 <150> US 61/315,704

<151> 19-03-2010

<160> 95

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe
1 5 10

20 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile
1 5

25

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 3

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe
1 5

<210> 5

<211> 9

ES 2 544 529 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu
1 5

5 <210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Thr Phe
1 5 10

10 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 7

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Val Tyr Thr Thr Ser Tyr Gln Gln Ile
1 5

25 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe
1 5

30 <210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu
1 5 10

35 <210> 11
<211> 9

ES 2 544 529 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu
1 5

5 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu

10 1 5
<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 13

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 14

Thr Tyr Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu
1 5

<210> 15
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Asn Tyr Glu Glu Thr Phe Pro His Ile
1 5

<210> 16
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Tyr Leu Trp Ala Thr Val Thr Ile
1 5

35 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 544 529 T3

<400> 17

Val Tyr Phe Ser Lys Ser Glu Gln Leu
1 5

<210> 18

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Phe Ile Phe Lys Gly Asn Gln Phe
1 5

10 <210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe
1 5

15

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 20

Gln Tyr Ala Ser Arg Phe Val Gln Leu
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 21

Lys Tyr Leu Thr Val Lys Asp Tyr Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 22

Val Tyr Asn Pro Thr Pro Asn Ser Leu
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

ES 2 544 529 T3

<400> 23

Ser Tyr Leu Gln Ala Ala Asn Ala Leu
1 5

<210> 24

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Phe Tyr Gln Pro Lys Ile Gln Gln Phe
1 5

<210> 25

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Tyr Tyr Lys Asn Ile Gly Leu Gly Phe
1 5

15 <210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Tyr Ala Ile Ile Lys Glu Glu Leu
1 5

20

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 27

Leu Tyr Pro Glu Val Phe Glu Lys Phe
1 5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 28

Lys Tyr Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe
1 5 10

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

ES 2 544 529 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Tyr Met Thr Val Ser Ile Ile Asp Arg Phe
1 5 10

5 <210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Tyr Leu Pro Gln Cys Ser Tyr Phe
1 5

10 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 37

Ile Tyr Ala Pro Lys Leu Gln Glu Phe
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 38

Ile Tyr Pro Asp Ala Ser Leu Leu Ile
1 5

<210> 39
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Val Tyr Leu Leu Asn Ser Thr Thr Leu
1 5

<210> 40
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Ile Tyr Leu Glu Val Ile His Asn Leu
1 5

ES 2 544 529 T3

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 41

Ala Tyr Pro Thr Val Lys Phe Tyr Phe
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 42

Ile Phe Ser Lys Ile Val Ser Leu Phe
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 43

Tyr Tyr Tyr Val Gly Phe Ala Tyr Leu
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 44

Arg Tyr Leu Glu Gly Thr Ser Cys Ile
1 5

<210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25

<400> 45

Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe
1 5 10

30

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35

<400> 46

ES 2 544 529 T3

Ser Tyr Ala Thr Leu Leu His Val Leu
1 5

5 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 47

Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Gly Lys Phe
1 5

10 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 48

Ser Tyr Asn Val Thr Ser Val Leu Phe
1 5

15 <210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49

Ser Tyr Leu Glu Leu Val Lys Ser Leu
1 5

20 <210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 50

Ser Tyr Gln Lys Val Ile Glu Leu Phe
1 5

25 <210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 51

Leu Tyr Leu Glu Asn Ile Asp Glu Phe
1 5

35 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 52

ES 2 544 529 T3

Val Tyr Ile Ser Ser Leu Ala Leu Leu
1 5

5 <210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 53

Arg Tyr Leu Pro Lys Gly Phe Leu Asn Gln Phe
1 5 10

10 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 54

Tyr Tyr Lys Asn Ile Gly Leu Gly Phe
1 5

15 <210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 55

Val Tyr Thr Thr Met Ala Glu His Phe
1 5

20 <210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 56

Asp Tyr Ala Tyr Leu Arg Glu His Phe
1 5

25 <210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 57

Leu Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe
1 5 10

35 <210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 58

ES 2 544 529 T3

Thr Tyr Lys Tyr Val Asp Ile Asn Thr Phe
1 5 10

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 59

Tyr Phe Ile Ser His Val Leu Ala Phe
1 5

<210> 60

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Tyr Thr Lys Val Ser Ala Tyr Leu
1 5

<210> 61

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Val Tyr Lys Glu Thr Cys Ile Ser Phe
1 5

20 <210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu
1 5

25

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 63

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

ES 2 544 529 T3

<400> 64

Leu Ala Asp Glu Thr Leu Leu Lys Val
1 5

<210> 65

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
1 5

<210> 66

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5

15 <210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Val Leu Glu Asp Leu Glu Val Thr Val
1 5

20

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 68

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 69

Asn Leu Leu Asp Leu Asp Tyr Glu Leu
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

ES 2 544 529 T3

<400> 70

Phe Leu Ile Asp Ser Ser Glu Gly Val
1 5

<210> 71

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Ala Leu Asp Glu Gly Asp Ile Ala Leu
1 5

<210> 72

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Ala Leu Asn Glu Glu Ala Gly Arg Leu Leu Leu
1 5 10

15 <210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Ile Leu Ser Pro Thr Val Val Ser Ile
1 5

20

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 74

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Leu Val Gln Asp Leu Ala Lys Ala
1 5

<210> 76

<211> 9

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 544 529 T3

<400> 76

Ile Leu Gln Asp Arg Leu Asn Gln Val
1 5

<210> 77

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu
1 5

<210> 78

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile
1 5

15 <210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Leu Leu Ala Gln Asn Thr Ser Trp Leu Leu
1 5 10

20

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 80

Ser Leu Ala Glu Val Asn Thr Gln Leu
1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Leu Asp Gly Phe Val Met Val Leu
1 5

<210> 82

<211> 9

ES 2 544 529 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu
1 5

5 <210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
1 5

10 <210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 84

Tyr Leu Leu Ser Tyr Ile Gln Ser Ile
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 85

Gln Ile Asp Asp Val Thr Ile Lys Ile
1 5

<210> 86
<211> 10
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Tyr Leu Tyr Gly Gln Thr Thr Thr Tyr Leu
1 5 10

<210> 87
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Ser Leu
1 5

ES 2 544 529 T3

<210> 88
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 88

Arg Leu Asp Asp Leu Lys Met Thr Val
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 89

Leu Thr Asp Glu Ile Leu Thr Tyr Val
 1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 90

Ile Leu Ile Asp Trp Leu Val Gln Val
 1 5

<210> 91
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 91

Val Leu Tyr Gly Pro Asp Val Pro Thr Ile
 1 5 10

<210> 92
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 92

Ser Ile Phe Gly Glu Asp Ala Leu Ala Asn Val
 1 5 10

30 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 93

Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Glu Glu Ile
 1 5

ES 2 544 529 T3

<210> 94
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 94

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val
1 5

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

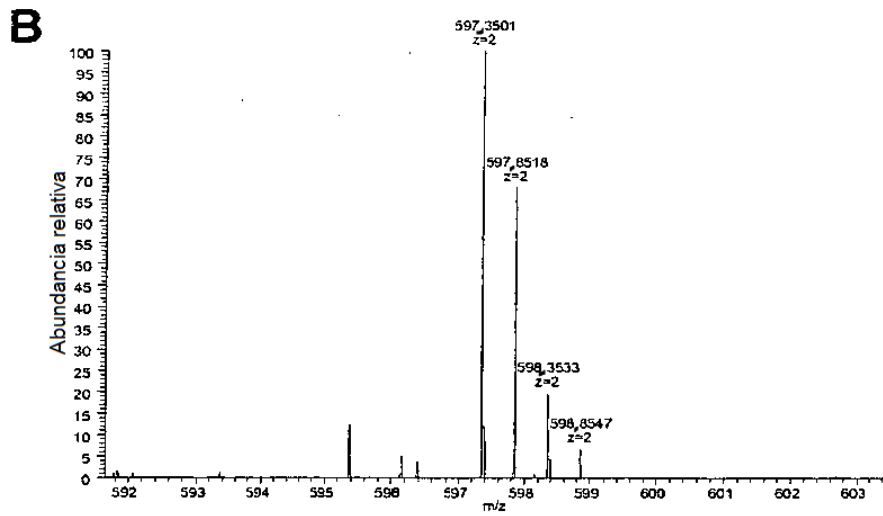
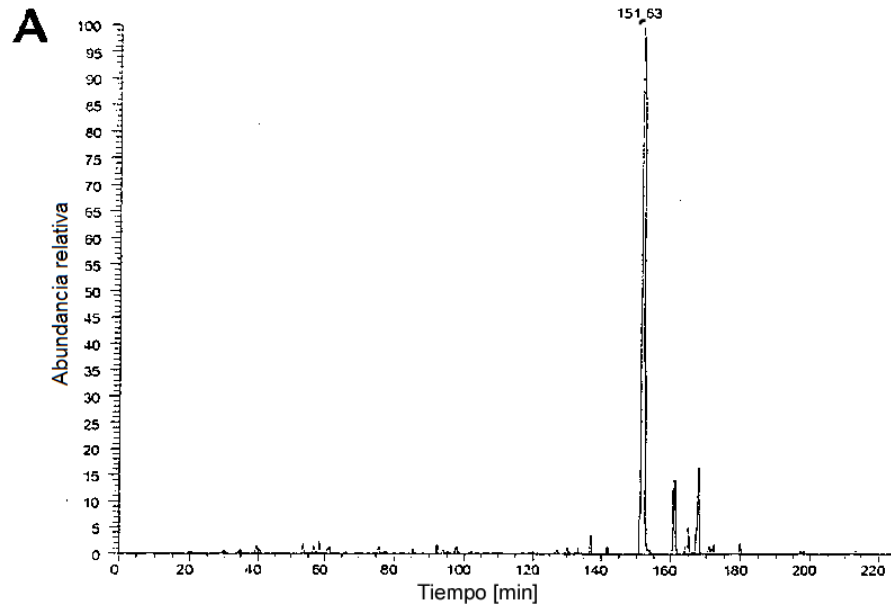
<400> 95

Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala
1 5 10

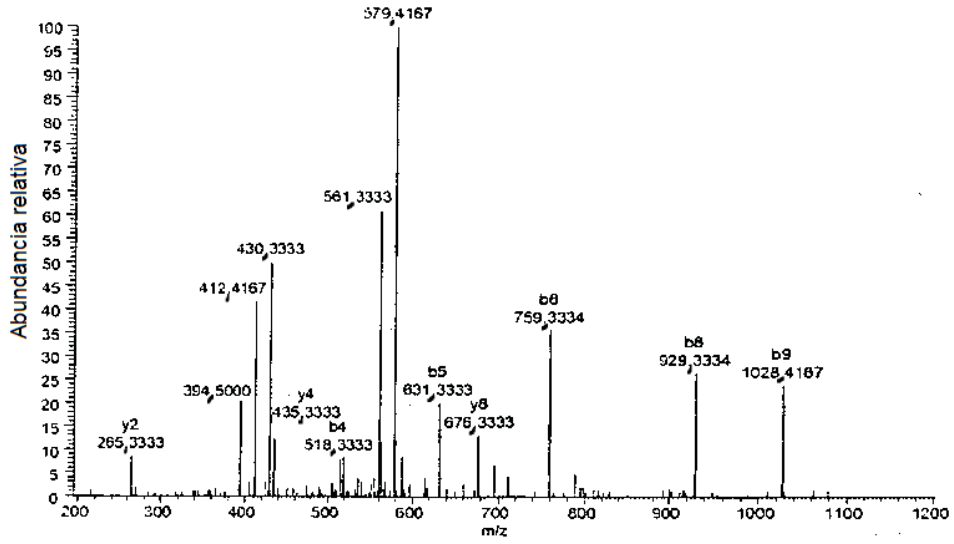
REIVINDICACIONES

1. Péptido con una longitud total de entre 10 y 14 aminoácidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo siguiente:
- a) una secuencia consistente en la SEQ ID N. ° 1
- 5 b) una variante de la SEQ ID N. °1 que induce que linfocitos T reaccionen con dicho péptido, siendo dicha variante seleccionada entre el grupo de las secuencias LFQILQGIVF, LYQILQGIVL, LYQILQGIVI, LFQILQGIVL y LFQILQGIVI.
2. El péptido conforme a la reivindicación 1, dotado de la capacidad de unión a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.
- 10 3. El péptido conforme a la reivindicación 1 o 2, en la que el péptido incluye enlaces no peptídicos.
4. El péptido conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en concreto que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.
- 15 5. Ácido nucleico que codifica un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siempre que el péptido no sea una proteína humana entera, y preferiblemente dicho ácido nucleico es ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los anteriores, o un vector de expresión que exprese dicho ácido nucleico.
6. Péptido conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un ácido nucleico o un vector de expresión acorde con la reivindicación 5 para el uso en medicina.
- 20 7. Célula hospedadora, que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la reivindicación 5, que es una célula presentadora de antígeno.
8. Método para producir un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método el cultivo de la célula hospedadora conforme con la reivindicación 7, y el aislamiento del péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
- 25 9. Método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, comprendiendo el método la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno cualquier péptido acorde con la reivindicación 1 o 2.
10. El método conforme a la reivindicación 9, en que dicha célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión capaz de expresar dicho péptido acorde con la reivindicación 1 o 2.
- 30 11. Linfocito T citotóxico (CTL) activado, producido mediante el método conforme a la reivindicación 9 o 10, que reconoce selectivamente un péptido conforme a la reivindicación 1 o 2.
12. Linfocito T citotóxico (CTL) conforme a la reivindicación 11 para el uso en el tratamiento del cáncer consistente en la destrucción de las células diana de un paciente, en el que dichas células diana presentan de forma aberrante un péptido conforme a la reivindicación 1 o 2.
- 35 13. El péptido conforme a la reivindicación 1 o 2, el ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la reivindicación 5, la célula conforme a la reivindicación 7, o el linfocito T citotóxico activado conforme a la reivindicación 12 para el uso en el tratamiento del cáncer, como el cáncer gástrico, gastrointestinal, colorrectal, pancreático, de pulmón o renal.
- 40 14. El péptido, el ácido nucleico o un vector de expresión, la célula, o el linfocito T citotóxico activado para el uso conforme a la reivindicación 13, en que dicho medicamento es una vacuna.
15. Uso no terapéutico del péptido conforme a la reivindicación 1 o 2, para la generación y el desarrollo de anticuerpos que sean específicos contra un complejo de MHC/péptido que comprende dicho péptido.

Figura 1:



C



D

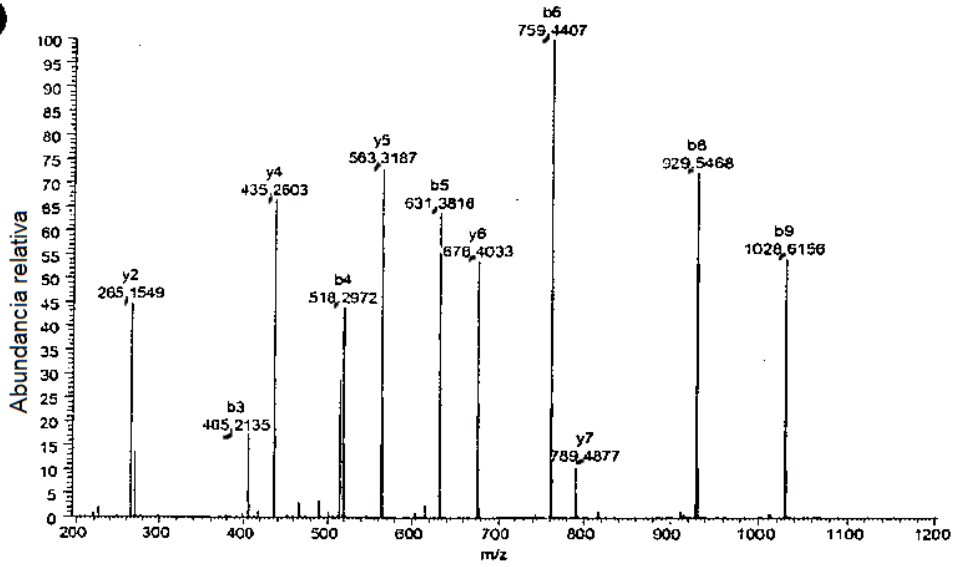
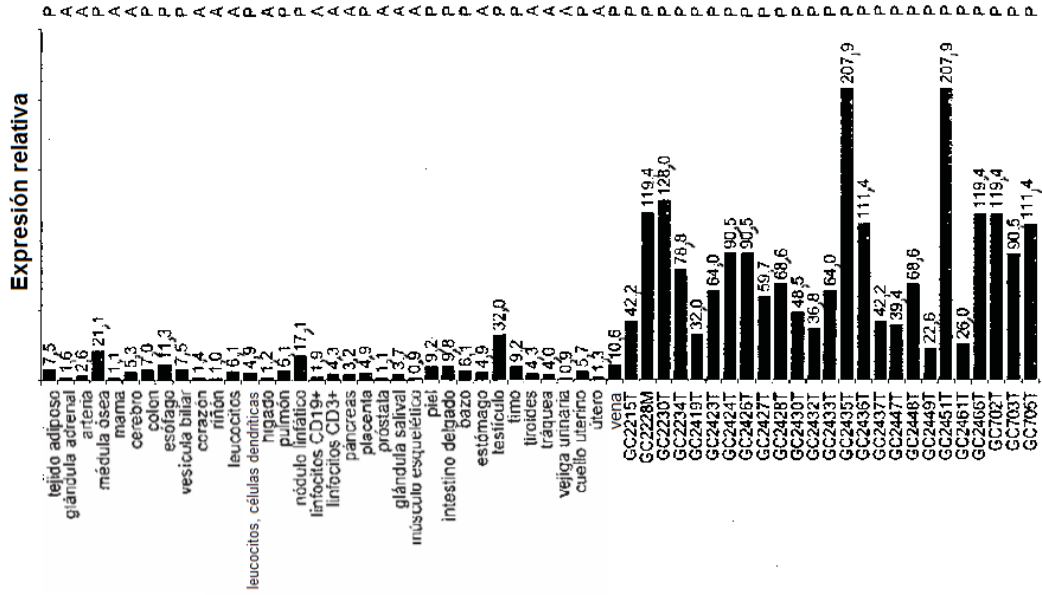


Figura 2

a)



b)

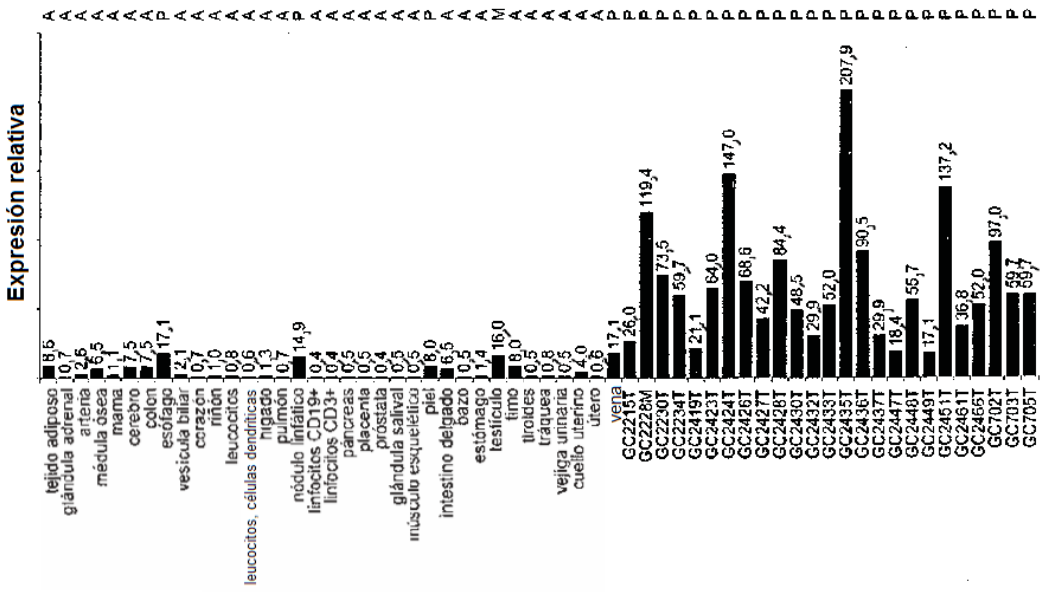


Figura 3

