

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 460**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2008 E 08017921 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2172212**

54 Título: **Nueva inmunoterapia contra varios tumores incluidos tumores neuronales y cerebrales**

30 Prioridad:

01.10.2008 EP 08017305

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

31.03.2017

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
PAUL-EHRLICH-STRASSE 15
72076 TÜBINGEN, DE**

72 Inventor/es:

**SCHOOR, OLIVER;
HILF, NORBERT;
WEINSCHENK, TONI;
TRAUTWEIN, CLAUDIA;
WALTER, STEFFEN y
SINGH, HARPREET**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 607 460 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 varios tumores incluidos tumores neuronales y cerebrales

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 para linfocitos T citotóxicos (CTL) asociados a tumores, 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 concierne a 25 nuevas secuencias peptídicas y sus variantes derivadas de moléculas HLA de clase I y clase II de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales.

Antecedentes de la invención

Los gliomas son tumores cerebrales originados en las células gliales del sistema nervioso. Las células gliales, llamadas por lo común neuroglía o simplemente glía, son células no neuronales que proporcionan soporte y nutrición, mantienen la homeostasia, forman la mielina e intervienen en la transmisión de señales en el sistema nervioso. Los dos tipos más importantes de glioma son el astrocitoma y el oligodendroglioma, llamados así por el tipo de célula glial que los origina, esto es, astrocitos y oligodendrocitos. En el grupo de los astrocitomas se encuentra el glioblastoma multiforme (denominado en lo sucesivo glioblastoma) que es el tumor cerebral maligno más frecuente en adultos pues supone alrededor del 40% de los tumores cerebrales malignos y alrededor del 50% de los gliomas (CBTRUS, 2006). El glioblastoma invade con agresividad el sistema nervioso central y entre todos los gliomas es el que ostenta el nivel más alto de malignidad (grado IV). Pese a los avances en el tratamiento logrados merced a mejoras en las técnicas de neuroimagen, la microcirugía y las opciones terapéuticas como la temozolomida o la radiación, el glioblastoma sigue siendo incurable (Macdonald, 2001; Burton and Prados, 2000; Prados and Levin, 2000). La tasa de letalidad de este tumor cerebral es muy alta: la esperanza de vida media varía entre 9 y 12 meses desde el diagnóstico. La supervivencia a 5 años durante el periodo de observación comprendido entre 1986 y 1990 fue del 8,0%. Hasta la fecha, la supervivencia a cinco años después del tratamiento agresivo que incluye la resección macroscópica del tumor sigue siendo inferior al 10% (Burton and Prados, 2000; Nieder et al., 2000; Napolitano et al., 1999; Dazzi et al., 2000). A tenor de lo anterior, queda patente la necesidad de nuevos métodos terapéuticos eficaces.

El grado de indiferenciación de las células tumorales del glioblastoma es el más elevado de todos los tumores cerebrales, lo que explica su alto potencial de migración y proliferación y su elevada invasividad y, por ende, su pronóstico funesto. Los glioblastomas provocan la muerte por el crecimiento rápido, agresivo e infiltrante que demuestran en el cerebro. El crecimiento infiltrante es el responsable del carácter inoperable de estos tumores. Los glioblastomas también son relativamente resistentes a la radioterapia y la quimioterapia, por lo que la recurrencia postratamiento es elevada. Además, la respuesta inmunitaria contra las células neoplásicas resulta claramente ineficaz a la hora de lograr su erradicación total después de la resección y la radioterapia (Roth and Weller, 1999; Dix et al., 1999; Sablotzki et al., 2000).

El glioblastoma se clasifica en primario (*de novo*) y secundario dependiendo de las diferencias en el mecanismo génico de la transformación maligna que experimentan los astrocitos indiferenciados o las células precursoras gliales. El glioblastoma secundario afecta a personas jóvenes menores de 45 años. A lo largo de 4 o 5 años, en promedio, el glioblastoma secundario evoluciona de un astrocitoma de bajo grado a un astrocitoma indiferenciado. Por el contrario, el glioblastoma primario afecta sobre todo a personas más mayores, con una media de edad de 55 años. Por norma general, el glioblastoma primario aparece como un glioblastoma fulminante caracterizado por la progresión del tumor en 3 meses desde el estado sin anomalías clínicas ni patológicas (Pathology and Genetics of the Nervous Systems, 29-39 (IARC Press, Lyon, Francia, 2000)).

El glioblastoma migra a lo largo de los nervios mielinizados y se disemina ampliamente por el sistema nervioso central. En la mayoría de casos, el tratamiento quirúrgico solo consigue un limitado efecto terapéutico sostenible (Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 34, 91-94, 1994; Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 33, 425-458, 1993; Neuropathology 17, 186-188, 1997) (Macdonald, 2001; Prados and Levin, 2000). Las células del glioma maligno eluden la detección por el sistema inmunitario del anfitrión mediante la producción de agentes inmunodepresores que alteran la proliferación de los linfocitos T y la producción por parte de estos de la citocina inmunoestimulante IL-2 (Dix et al., 1999).

Las neoplasias intracraneales pueden surgir en cualquiera de las estructuras o tipos celulares del SNC: encéfalo, meninges, glándula pituitaria, cráneo, e incluso tejido embrionario residual. La incidencia anual total de tumores cerebrales primarios en Estados Unidos es de 14 casos por 100.000. Los tumores cerebrales primarios más frecuentes son los meningiomas, que representan el 27% de los tumores cerebrales primarios, y los glioblastomas, que suponen otro 23% (los glioblastomas suponen el 40% de los tumores cerebrales malignos en los adultos). Muchos de esos tumores son agresivos y presentan un alto grado. En la población pediátrica los tumores cerebrales primarios son los tumores sólidos más frecuentes y la segunda causa de muerte por cáncer después de la leucemia.

A día de hoy prosigue la búsqueda de un tratamiento eficaz contra el glioblastoma. Para combatir tales células

neoplásicas se está estudiando la inmunoterapia, o el tratamiento basado en el reclutamiento del sistema inmunitario. Los primeros resultados alentadores en el tratamiento con inmunoterapia de los pacientes aquejados por el glioblastoma los obtuvo Northwest Biotherapeutics con «DCVax Brain», una vacuna celular que emplea células dendríticas procedentes del paciente cargadas con lisados de células tumorales autólogas, y con Celldex, a base de un péptido del EGFRvIII destinado a estimular respuestas de CTL específicos de antígeno; con ambos se apreció una mediana del tiempo de supervivencia más prolongada que las medianas de supervivencia obtenidas con el tratamiento convencional (Heimberger et al., 2006).

Carcinoma colorrectal

Según la Sociedad Americana contra el Cáncer (*American Cancer Society*), el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más habitual en Estados Unidos puesto que afecta a más de 175.000 nuevos pacientes cada año. En Estados Unidos, Japón, Francia, Alemania, Italia, España y Reino Unido el número de pacientes afectados supera los 480.000. Ello lo convierte en una de las principales causas de muerte por cáncer en los países industrializados. La supervivencia relativa a 1 y 5 años de los enfermos de cáncer colorrectal asciende al 84% y el 64%. Pasados los cinco años, la supervivencia sigue descendiendo hasta el 57% al cabo de diez años del diagnóstico. Cuando el cáncer colorrectal se detecta en un estadio inicial y localizado la supervivencia a 5 años es del 90%, pero sólo el 39% de los casos se detectan en ese estadio, principalmente por el escaso alcance de los programas de detección sistemática. Cuando el cáncer alcanza dimensiones regionales y afecta ya a órganos adyacentes o ganglios linfáticos la supervivencia a 5 años disminuye hasta el 68%. Y en el caso de las personas con metástasis a distancia la supervivencia a 5 años vista se reduce al 10%.

Las investigaciones sugieren que el cáncer colorrectal tiene su origen en la interacción entre factores hereditarios y ambientales. En la mayor parte de los casos los pólipos adenomatosos parecen ser los precursores de los tumores colorrectales, aunque el proceso de transición puede durar muchos años. El principal factor de riesgo del cáncer colorrectal es la edad, ya que el 90% de los casos se diagnostica a partir de los 50 años. Otros factores de riesgo referidos por la *American Cancer Society* son el consumo de alcohol, la alimentación rica en grasas o carnes rojas y una ingesta insuficiente de frutas y verduras. La incidencia sigue aumentando especialmente en zonas como Japón, donde como posibles causas se barajan la adopción de la alimentación de estilo occidental, con la ingesta excesiva de grasas y carne y la reducción del consumo de fibra. Con todo, la incidencia no aumenta al mismo ritmo que en el pasado, lo cual se atribuye al aumento de las exploraciones preventivas y a la extirpación de los pólipos, que de lo contrario se habrían convertido en tumores malignos.

A semejanza de la mayoría de los tumores sólidos el tratamiento de primera línea consiste en cirugía, aunque sus ventajas siguen estando limitadas a los pacientes en fase inicial y una parte importante de los casos se diagnostica cuando la enfermedad ya se encuentra en fases avanzadas. El tratamiento de referencia contra el cáncer colorrectal avanzado consiste en regímenes de quimioterapia basados en el fluorouracilo. Los protocolos denominados FOLFOX (leucovorina/5-FU más oxaliplatino en infusión) y FOLFIRI (irinotecán y leucovorina en bolo y 5-FU en infusión continua) constituyen la mayor parte de tales regímenes.

La introducción de los citotóxicos de tercera generación como el irinotecán y el oxaliplatino ha renovado las esperanzas de lograr mayor eficacia, pero el pronóstico sigue siendo relativamente malo y el índice de supervivencia suele rondar generalmente los 20 meses cuando la enfermedad es metastásica. Por tanto, sigue existiendo una importante necesidad de mejorar los resultados contra la enfermedad.

Recientemente ha aparecido una nueva generación de medicamentos, agentes dirigidos contra moléculas, como por ejemplo Avastin® (bevacizumab) y Erbitux® (cetuximab), y cerca de 40 compuestos contra diferentes estadios del cáncer colorrectal se hallan en las últimas etapas de desarrollo clínico. Las combinaciones de varios de estos compuestos aumentan las posibles opciones de tratamiento que cabe esperar en el futuro. La gran mayoría de las sustancias se encuentra en la fase II de desarrollo clínico, siendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) la diana de la mayor parte de ellos, puesto que alrededor del 80% de los pacientes afectados por el cáncer colorrectal presentan regulada al alza la expresión de dicho receptor.

En la actualidad se están efectuando ensayos clínicos con pacientes en estadio II que combinan la quimioterapia con los anticuerpos monoclonales (AcM) recientemente autorizados (cetuximab + irinotecán o FOLFOX4; bevacizumab en monoterapia o con FOLFOX4). Se prevén periodos de observación de tres o cuatro años para disponer de resultados estadísticamente significativos de dichos ensayos.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) que actualmente se utilizan en oncología ofrecen en general buenas garantías de no interferir con la inmunoterapia activa. De hecho, existen datos preclínicos (GABRILOVICH 1999) y clínicos que apuntan a que la eliminación del VEGF (mediante el bevacizumab) contribuye de modo positivo a la activación de los linfocitos T por medio de las células dendríticas (Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, Nixon AB, Lyerly HK, Clay T, Morse MA. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Jan 10).

Carcinoma de próstata y otros tumores

Con una cifra estimada de 27.050 fallecimientos en 2007, el cáncer de próstata es la principal causa de muerte por

cáncer en varones. Aunque los índices de deceso se han reducido entre la población blanca y afroamericana desde principios de los 90, el nivel registrado entre los varones afroamericanos duplica con creces el de los hombres de raza blanca. El cáncer de próstata es el más diagnosticado en los varones. Por motivos que siguen sin estar claros, la incidencia es significativamente mayor entre los varones afroamericanos que entre los de raza blanca. La incidencia del cáncer de próstata ha cambiado notablemente durante los últimos 20 años: experimentó un rápido incremento entre 1988 y 1992 para reducirse drásticamente entre 1992 y 1995 y volvió a repuntar ligeramente desde 1995. Estas tendencias reflejan en gran parte el aumento de los programas de detección del cáncer de próstata mediante el análisis sanguíneo del antígeno específico de la próstata (PSA). El moderado incremento de la incidencia acaecido durante la última década probablemente pueda atribuirse a la generalización del reconocimiento preventivo del PSA entre los varones menores de 65 años. La incidencia del cáncer de próstata se ha estabilizado entre los mayores de 65 años. Los índices marcaron su máximo entre los hombres de raza blanca en 1992 (237,6 por cada 100.000 varones) y en 1993 entre los varones afroamericanos (342,8 por cada 100.000 varones).

El tratamiento del cáncer de próstata puede implicar la espera en observación, cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, hormonoterapia o cierta combinación de los anteriores. La mejor opción depende de la fase de la enfermedad, de la escala Gleason y del nivel de PSA. Otros factores importantes incluyen la edad del varón, el estado general de salud y su actitud frente a los posibles tratamientos y los posibles efectos secundarios. Puesto que todos los tratamientos pueden provocar importantes efectos secundarios, como por ejemplo disfunción eréctil e incontinencia urinaria, los debates sobre dichos tratamientos suelen centrarse en equilibrar los objetivos de la terapia y las posibles alteraciones en el estilo de vida.

Cuando el cáncer se ha extendido fuera de la glándula prostática, las opciones de tratamiento cambian significativamente, por lo que la mayor parte de los médicos que tratan el cáncer de próstata utiliza una serie de nomogramas para pronosticar la probabilidad de la propagación. Los tratamientos consistentes en la espera en observación, HIFU, radioterapia, criocirugía y cirugía suelen ofrecerse a los varones cuyo cáncer permanece confinado en la próstata. La terapia hormonal y la quimioterapia suelen reservarse para los casos en que la enfermedad se ha extendido fuera de la próstata, aunque hay excepciones: la radioterapia puede utilizarse para algunos tumores avanzados y la terapia hormonal se emplea para algunos tumores en fase inicial. La crioterapia, la terapia hormonal y la quimioterapia también pueden ofrecerse si el tratamiento inicial falla y el cáncer avanza.

En un número importante de pacientes con carcinoma de próstata que son sometidos a prostatectomía radical por la sospecha clínica de que el crecimiento sigue limitado al órgano, el análisis histológico confirmatorio de la preparación quirúrgica revela que el tumor está extendido a nivel local y se propaga fuera de los límites del órgano. Estos pacientes presentan un elevado riesgo de recidiva local precoz, normalmente detectable por un incremento de los niveles de PSA que se traduce en una recaída bioquímica. Las opciones terapéuticas en esta situación incluyen la radioterapia externa y la ablación hormonal. No obstante, el valor de estos enfoques terapéuticos, especialmente en lo que concierne a prolongar la supervivencia del paciente a largo plazo, no deben considerarse como probados. Además, deben tenerse en cuenta posibles complicaciones asociadas con el tratamiento, como, por ejemplo, el desarrollo de estenosis uretral (radioterapia), la pérdida de libido y la impotencia, el riesgo de reducción de las sales cálcicas del esqueleto que puede acarrear o agravar la osteoporosis y el notable incremento del riesgo de fracturas óseas patológicas (ablación hormonal).

Más del 90% de los casos de cáncer de próstata se descubren en los estadios local y regional. El índice de supervivencia relativa a 5 años de los pacientes diagnosticados en dichos estadios se aproxima al 100%. Durante los últimos 25 años, el índice de supervivencia a 5 años de todos los estadios combinados ha pasado del 69% a casi el 90%. Según los datos más recientes, la supervivencia relativa a 10 años es del 93%, mientras que a los 15 años es del 77%. Las espectaculares mejoras de la supervivencia, especialmente a 5 años, son atribuibles en parte a la mayor precocidad de los diagnósticos y a las mejoras del tratamiento. Con todo, la supervivencia desciende notablemente cuando el cáncer se ha extendido a otros tejidos y órganos.

Cáncer de pulmón

Se calcula que en 2007 se diagnosticarán 210.000 nuevos casos en Estados Unidos, cifra que supone en torno al 15% de los diagnósticos de cáncer. La incidencia está cayendo notablemente entre los hombres, desde un máximo de 102 casos por cada 100.000 varones en 1984 hasta 78,5 en 2003. En las mujeres está estabilizándose tras un largo período de incremento. Clínicamente el cáncer de pulmón se divide, a efectos de tratamiento, en dos grupos: el carcinoma microcítico de pulmón (13%) y el no microcítico (87%).

El cáncer de pulmón aúna la mayor parte de fallecimientos relacionados con el cáncer, tanto en hombres como en mujeres. Las previsiones para 2007 cifraban el número de fallecimientos en 160.390, lo cual supone en torno al 29% de todas las muertes causadas por el cáncer.

Desde 1987 mueren cada año más mujeres por el cáncer de pulmón que por el cáncer de mama. La tasa de mortalidad en la población masculina ha seguido cayendo notablemente entre 1991 y 2003, a un ritmo aproximado del 1,9% por año. La mortalidad por cáncer de pulmón entre las mujeres está estabilizándose, tras haber experimentado un aumento incesante durante varias décadas. Estas tendencias en la mortalidad por cáncer de pulmón reflejan el descenso del tabaquismo durante los últimos 30 años.

Las opciones de tratamiento vienen determinadas por el tipo (microcítico o no) y la fase del cáncer, e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias biológicas dirigidas, como bevacizumab (Avastin®) y erlotinib (Tarceva®). La cirugía suele ser el tratamiento de elección para los cánceres localizados. Algunos estudios recientes indican que la tasa de supervivencia del cáncer de pulmón no microcítico en fase inicial mejora si se aplica quimioterapia tras la cirugía. Como la enfermedad acostumbra a estar extendida cuando se descubre, suele recurrirse a la radioterapia y la quimioterapia, a veces en combinación con la cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento elegido habitualmente para el carcinoma microcítico de pulmón. Con este régimen un alto porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es duradera.

El índice de supervivencia relativa para el cáncer de pulmón después de 1 año se ha incrementado ligeramente desde el 37% en 1975-1979 hasta el 42% en 2002, en gran medida gracias a las mejoras en las técnicas quirúrgicas y las terapias combinadas. No obstante, el índice combinado de supervivencia a 5 años para todos los estadios es tan solo del 16%. El índice de supervivencia es del 49% en los casos que son detectados cuando la enfermedad aún está localizada. Pero solo el 16% de los cánceres de pulmón se diagnostica en este estadio inicial.

Así pues, sigue existiendo la necesidad de nuevas opciones terapéuticas eficaces y seguras para el glioblastoma, el tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales claras, cáncer de pulmón, del SNC, cáncer de ovario, melanoma (Tamm et al. 1998), cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia y meduloblastoma, así como para otros tumores que muestran una sobreexpresión de survivina, de forma que se mejore el bienestar de los pacientes sin utilizar quimioterapia u otros fármacos que puedan provocar efectos secundarios graves.

WO 2008/109757 da a conocer una proteína de fusión que comprende la proteína completa FABP7 en un polipéptido dotado de una estructura de inmunoglobulina.

WO 2005/116051 da a conocer 577 péptidos asociados a tumor capaces de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y los usos respectivos de los mismos en el tratamiento del cáncer.

Resumen de la invención

Breve descripción de los dibujos

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra los espectros de masas obtenidos en tándem con la cromatografía de líquidos-ESI que identifican a los péptidos asociados a tumor (TUMAP) IGF2BP3-001 de la muestra de glioblastoma GB6010 que fueron presentados por una molécula MHC de clase I de manera restringida.

La **Figura 2** muestra el perfil de expresión de los ARNm de los genes de interés de la invención que aparecen fuertemente sobreexpresados en muestras de glioblastoma. La expresión de estos genes es nula o ínfima en los tejidos normales pero es muy elevada en muestras de glioblastoma. Se expone la expresión relativa del ARNm en varios tejidos normales y en muestras individuales de glioblastoma multiforme (GBM) medidas con un análisis con micromatrices de ADN («chips génicos»). Los valores son relativos con respecto a los niveles de expresión en el riñón normal (valores siempre ajustados arbitrariamente a 1,0). Los valores correspondientes a los tejidos normales se obtuvieron con conjuntos de ARNm comerciales. Las letras entre corchetes son los «indicadores de detección» dados por el software de análisis. El «indicador de detección» señala si un transcrito se ha detectado específicamente en la muestra o si no se ha podido observar ninguna detección significativa. Puede tener los valores «P» (presente), «A» (ausente) o «M» (detección marginal).

La **Figura 3** expone el análisis de los tetrámeros resultantes de la proliferación estimulada con microesferas de linfocitos CD8+ específicos de CSP-001 y de NLGN4X-001 obtenidos de la sangre periférica de un donante sano. 1×10^5 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas con CD8+ por pocillo se estimularon semanalmente con microesferas acopladas con anti-CD28 más antígeno tumoral A*0201/CSP-001 en alta densidad (panel izquierdo) o anti-CD28 más antígeno tumoral A*0201/NLGN4X-001 en alta densidad (panel derecho). Después de tres estimulaciones *in vitro*, todas las células se tiñeron con anticuerpo CD8 FITC, y con tetrámeros de A*0201/CSP-001 y A*0201/NLGN4X-001 marcados por fluorescencia. Las células se seleccionan entre los linfocitos CD8+; las cifras representan el porcentaje de células hallado en el cuadrante indicado entre los linfocitos CD8+.

La **Figura 4** muestra la afinidad de los péptidos de HLA de clase I de la invención hacia la molécula del MHC codificada por el alelo HLA-A*0201. Las constantes de disociación (K_D) de los TUMAP de HLA de clase I de la invención y el péptido de control HBV-001 (con potente afinidad hacia el alelo A*02) se midieron con un ensayo de repliegamiento del MHC basado en un ELISA.

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria todos los términos corresponden a la definición indicada a continuación, salvo en los casos

en que se indique otra cosa.

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 normalmente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud o hasta 16, o bien 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de largo.

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 epítipo o epítipos 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 para la invención siempre que se mantengan los epítipos correctos. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que 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 «epítipo» de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I o clase II, 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. Los epítipos de linfocitos T que se unen a moléculas MHC de clase II suelen tener una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos. En el caso de los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II, el mismo péptido y el epítipo del linfocito T correspondiente pueden compartir un segmento central común pero en cambio diferir en la longitud total como consecuencia de secuencias de flaqueo de diferentes longitudes en dirección ascendente del extremo amino de la secuencia central y descendente con respecto a su terminal carboxílico, respectivamente. Los receptores MHC de clase II presentan una conformación más abierta; de la misma manera, los péptidos unidos a receptores MHC de clase II no se enclavan completamente en la estructura de la hendidura de unión al péptido de la molécula MHC de clase II, como ocurre con la hendidura de unión del péptido de la molécula MHC de clase I. Es de notar que éste no es el caso para el péptido con arreglo a la SEQ ID n.º 1, puesto que pequeñas variaciones en la longitud del péptido ocasionan un gran descenso de la actividad (véase más abajo).

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*11 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos *locus*.

Tres *locus* diferentes del genoma humano albergan los genes MHC de clase II: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Los receptores MHC de clase II son heterodímeros que constan de una cadena alfa y una beta, las cuales se enclavan en la membrana celular a través de una región transmembrana. HLA-DRB1*04 y HLA-DRB1*07 son dos ejemplos de diferentes alelos beta MHC de clase II que se sabe que están codificados en estos *locus*. Los alelos de clase II son muy polimorfos: por ejemplo, se han descrito varios cientos de alelos HLA-DRB1 distintos. Por tanto, a efectos terapéuticos y de diagnóstico sería muy deseable contar con un péptido que se uniese, con la afinidad adecuada, a varios receptores HLA de clase II distintos. Un péptido que se une a varias moléculas HLA de clase II distintas recibe el nombre de ligando promiscuo.

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 normal, mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para 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 esta invención se ensamblan con fragmentos de ADNc y oligonucleótidos cortos de enlace, o con una serie de oligonucleótidos, que dan como resultado un gen sintético capaz de expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores procedentes de un operón microbiano o vírico.

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

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

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 «marco de lectura abierto (ORF)» designa una serie de tripletes que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación y que forman una secuencia (potencialmente) traducible en proteína.

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 del 0,01% en peso, y preferiblemente de al menos 0,1% aproximadamente en peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% en peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente 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 26, que corresponde a la estructura natural, o a las proteínas «precursoras» de las SEQ ID n.º 1 a 26. Utilizados en relación con los polinucleótidos, dichos términos se refieren a los productos generados por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

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

$$\text{Identidad porcentual} = 100 [I - (C/R)]$$

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

- (I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
- (II) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y
- (iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia;

y 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, el reemplazo de una leucina por una isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

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 acorde con la presente invención.

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. En lo que respecta a los linfocitos T cooperadores restringidos a las MHC de clase II, las funciones efectoras pueden consistir en la secreción inducida por el péptido de citocinas, preferiblemente de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4, IL-5, IL-10 o IL-2, o la desgranulación inducida por el péptido. Las posibles funciones efectoras de los CTL y de los linfocitos T cooperadores no se limitan a esta lista.

Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido de las SEQ ID N.º 1 a 25 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 µM, 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 epítomos de la presente invención pueden ser idénticos a epítomos asociados a tumor que aparecen de forma natural o a epítomos específicos de tumor.

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 abierto la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para desencadenar una respuesta inmunitaria que es específica contra los antígenos expresados en la superficie de células tumorales y que a través de este mecanismo de acción sea capaz de inducir la regresión, paralice o frene el crecimiento del tumor. 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 de 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 (Cheever et al., 1993; Zeh, III et al., 1999). A partir del análisis de 415 especímenes de pacientes aquejados de cáncer colorrectal, Galon et al. fueron capaces de demostrar que el tipo, la densidad y la localización de las células inmunitarias en el tejido tumoral son realmente mejores predictores de la supervivencia del paciente que la ampliamente utilizada estadificación TNM de los tumores (Galon et al., 2006).

Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRiP y péptidos grandes. Las moléculas de MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan predominantemente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después son procesadas por las mismas (Cresswell, 1994). 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 colaboradores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos (Wang and Livingstone, 2003; Sun and Bevan, 2003; Shedlock and Shen, 2003). Inicialmente, la sensibilización y la expansión de los CTL en los ganglios linfáticos está sustentada por los linfocitos T CD4+ (Schoenberger et al., 1998). Así pues, un mecanismo podría ser el direccionamiento de los linfocitos CD8+ vírgenes hacia el lugar donde tiene lugar la interacción funcional entre los linfocitos T CD4+ y las APC (Castellino et al., 2006). Por último, la generación de los linfocitos CD8+ de memoria funcionales depende casi siempre de la asistencia de los linfocitos T CD4+ (Sun and Bevan, 2003; Janssen et al., 2003). Por todas esas razones, la identificación de epítomos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de medicamentos que estimulen una respuesta inmunitaria antitumoral (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003).

Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los CTL

(Qin and Blankenstein, 2000; Mortara et al., 2006) y que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos y granulocitos (Marzo et al., 2000; Hwang et al., 2007).

5 En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto con sorpresa que las células tumorales expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel et al., 2006).

10 En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores sin el concurso de las células efectoras CTL (los linfocitos T CD8-positivos) a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ) (Qin and Blankenstein, 2000). También ha sido propuesta la destrucción directa de las células tumorales por los linfocitos T CD4+ citotóxicos a través de linfotoxinas y granzima B (Penna et al., 1992; Littau et al., 1992).

Además se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden contrarrestar la progresión tumoral mediante la inducción de respuestas de anticuerpos al reconocer péptidos de antígenos asociados a tumor presentados por moléculas HLA de clase II (Kennedy et al., 2003).

15 A diferencia de lo que sucede con los péptidos asociados a tumor reconocidos por moléculas HLA de clase I, hasta la fecha el número descrito de ligandos de clase II derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) es pequeño.

20 Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células del sistema inmunitario (Mach et al., 1996), la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel et al. descubrieron varios epítomos de MHC de clase II en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006).

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.

25 La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales (Novellino et al., 2005):

30 1. Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase (van der Bruggen et al., 1991), que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatoцитos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

35 2. 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.

40 3. 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.

45 4. 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.

50 5. 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 MUC1 o fenómenos como el ajuste de proteínas durante la degradación que en algunos casos pueden ser específicos de tumor (Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004).

55 6. 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.

5 Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como parte de un 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 posteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). 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.

20 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., 2004; Weinschenk et al., 2002).

25 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 inmunotolerancia 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»).

30 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-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los 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.

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

40 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 glioblastoma en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados en el tratamiento contra el cáncer en general y contra el glioblastoma en particular.

45 Y es más, no existe ninguna pauta terapéutica pensada para los pacientes con cáncer de próstata 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 da a conocer péptidos que son útiles para el tratamiento del glioblastoma, el cáncer de próstata y de otros tumores que sobreexpresan la survivina y/o el CSP y/u otros péptidos de la invención. De los péptidos descritos en la presente memoria se ha demostrado en parte directamente con técnicas de espectrometría

de masas que son presentados de forma natural por moléculas HLA en muestras de glioblastoma humano primario (véanse ejemplo 1 y figura 1), o en el caso de la SEQ ID N.º 26 predicha conforme al algoritmo de predicción SYFPEITHI (Rammensee et al., 1995) son ligandos promiscuos de los alelos HLA-DR HLA-DRB1*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*11 y DRB1*15 (véase anexo). A tenor de los datos anteriores y de las frecuencias de dichos alelos DRB1 (Mori et al., 1995; Chanock et al., 2004) frecuentes, se puede suponer que el 92% de las personas de raza blanca A*02-positivas expresan como mínimo un alelo DRB1 que se une al péptido acorde con la SEQ ID N.º 26.

Se ha demostrado que el gen originario del cual deriva la SEQ ID N.º 26 – survivina – está altamente sobreexpresado en el glioblastoma, el tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales claras, cáncer de pulmón, del SNC, de ovario, melanoma (Tamm et al. 1998), cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia y meduloblastoma en comparación con los tejidos normales (véanse el ejemplo 2 y la figura 2) demostrando un alto grado de asociación del péptido con el tumor, es decir, que dichos péptidos aparecen claramente en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales.

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células tumorales de glioblastoma que presenten los péptidos derivados. Los linfocitos T colaboradores activados por los péptidos derivados de la survivina pueden inhibir la vascularización del tumor, pueden atraer a las células efectoras del sistema inmunitario y facilitar la sensibilización y la proliferación de los CTL, así como la respuesta sostenida de los linfocitos T CD8+.

Todos los péptidos descritos en la presente memoria han demostrado ser capaces de estimular las respuestas de los linfocitos T (véanse el ejemplo 3 y la figura 3). Así pues, los péptidos 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 cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como p. ej. 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 el glioblastoma 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

5 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.

Además se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

15 La Tabla 1 muestra los péptidos descritos, de las cuales la SEQ ID N.º 10 es acorde con la presente invención, sus respectivas SEQ ID N.º, los alelos HLA a los que se unen cada uno de ellos y las proteínas originarias de las que pueden surgir tales péptidos. Reviste especial interés que el péptido conforme a la SEQ ID N.º 1 se una tanto a HLA-DR como a HLA-A*02, con lo que puede desencadenar dos respuestas distintas.

Tabla 1: Péptidos (SEQ ID N.º 10 acorde con la presente invención)

| SEQ ID N.º | Código del péptido | Secuencia | Alelos HLA | Proteína(s) originaria(s) |
|------------|--------------------|----------------|-------------------|---------------------------|
| 1 | CSP-001 | TMLARLASA | HLA-A*02 | CSPG4 |
| 2 | ACS-001 | KIMERIQEV | HLA-A*02 | ACSBG1 |
| 3 | BCA-001 | FLGDPPEKL | HLA-A*02 | BCAN |
| 4 | BCA-002 | ALWAWPSEL | HLA-A*02 | BCAN |
| 5 | CHI3L1-010 | TLYGMLNTL | HLA-A*02 | CHI3L1 |
| 6 | CLIP2-001 | SLNELRVLL | HLA-A*02 | CLIP2 |
| 7 | SLCO1C1-001 | YLIAGIISL | HLA-A*02 | SLCO1C1 |
| 8 | DTNA-001 | KLQDEAYQV | HLA-A*02 | DTNA |
| 9 | EGFR-007 | ALAVLSNYDA | HLA-A*02 | EGFR |
| 10 | FABP7-001 | LTFGDVVAV | HLA-A*02 | FABP7 |
| 11 | GFAP-001 | NLAQDLATV | HLA-A*02 | GFAP |
| 12 | GPR56-002 | FLLSEPVAL | HLA-A*02 | GPR56 |
| 13 | GRI-001 | NILEQIVSV | HLA-A*02 | GRIA4 |
| 14 | IGF2BP3-001 | KIQEILTQV | HLA-A*02 | IGF2BP3 |
| 15 | MLC-001 | SVVEVIAGI | HLA-A*02 | MLC1 |
| 16 | NES-001 | GLQSQIAQV | HLA-A*02 | NES |
| 17 | NES-002 | SLQENLESL | HLA-A*02 | NES |
| 18 | NES-003 | FLFPGTENQEL | HLA-A*02 | NES |
| 19 | NES-004 | NLAEELGV | HLA-A*02 | NES |
| 20 | NLGN4X-001 | NLDTLMTYV | HLA-A*02 | NLGN4X |
| 21 | NR2E1-001 | KIISEIQAL | HLA-A*02 | NR2E1 |
| 22 | NRCAM-001 | GLWHHQTEV | HLA-A*02 | NRCAM |
| 23 | PDPN-001 | TLVGIIVGV | HLA-A*02 | PDPN |
| 24 | TNC-001 | AMTQLLAGV | HLA-A*02 | TNC |
| 25 | TNC-002 | QLLAGVFLA | HLA-A*02 | TNC |
| 26 | BIR-002 | TLGEFLKDRERAKN | HLA-DR y HLA-A*02 | BIRC5 |

Proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4)

El CSPG4 (proteoglicano sulfato de condroitina) es un proteoglicano integral de membrana presente en los pericitos nacientes que cumple un papel funcional en la neovascularización (Ozerdem, 2006). Durante la embriogenia, el proteoglicano CSPG4 se expresa en los capilares inmaduros, pero a medida que estos vasos maduran la expresión se pierde. Es conocido por ser un marcador superficial de progresión precoz del melanoma, implicado en la estimulación de la proliferación, la migración y la invasión de las células tumorales. El CSPG4 se expresa intensamente en >90% de las lesiones de melanoma humano. Aunque el CSPG4 no es estrictamente específico de tumor, las respuestas de los linfocitos T CD4+ reactivos a tumores en pacientes con melanoma y en individuos sanos reconocen el CSPG4⁶⁹³⁻⁷⁰⁹ en células de melanoma que expresan el HLA-DR11 en ausencia de autoinmunidad (Erfurt et al., 2007).

La expresión del CSPG4 potencia la diseminación de las células mediada por integrinas, la fosforilación de FAK (cinasa de adhesión focal) y la activación de ERK1/2 (cinasa regulada por señal extracelular) (Yang et al., 2004). Asimismo, existen cada vez más indicios procedentes de datos *in vitro* de que el CSPG4 desempeña un importante papel en la angiogenia tumoral. Así pues, en los tumores positivos para CSPG4 se ha observado una tasa de neovascularización y volúmenes vasculares notablemente elevados, y se ha comprobado que el CSPG4 secuestra la angiostatina, cosa que normalmente inhibe la proliferación de las células endoteliales y la angiogenia. Los vasos inmaduros también contienen pericitos positivos para CSPG4, lo cual apunta a la intervención de esta población celular en la modulación de la proliferación de las células endoteliales por medio del bloqueo de los efectos inhibitorios de la angiostatina durante el desarrollo de los vasos (Chekenya et al., 2002b).

La expresión de CSPG4 también ha sido descrita en otros tejidos normales aparte de los pericitos activados, tales como las células endoteliales, condrocitos, miocitos lisos, ciertos queratinocitos basales de la epidermis, así como en células del folículo piloso (Campoli et al., 2004).

En el curso de la angiogenia y como respuesta a patologías del SNC, las células de alta motilidad que expresan el CSPG4 sufren rápidos cambios morfológicos y son reclutadas en puntos donde está teniendo lugar crecimiento y reparación vascular. El CSPG4 se sobreexpresa tanto en las células tumorales como en los pericitos de los vasos sanguíneos de tumores cerebrales malignos (Chekenya and Pilkington, 2001). Con la implantación de células procedentes de una estirpe celular humana de glioma positiva para CSPG4 en cerebros de ratas atímicas inmunodeficientes se pudo demostrar que estos tumores presentan una densidad microvascular superior a la de las ratas control, lo cual implica que la expresión del CSPG4 regula tanto la función como la estructura de la vasculatura tumoral derivada del hospedador (Brekke et al., 2006). En un experimento de xenoinjerto consistente en implantar material biopsico de glioblastoma a ratas atímicas, el CSPG4 se identificó como asociado principalmente a los vasos sanguíneos tanto en los pericitos como en los componentes de la membrana basal de la vasculatura tumoral y su expresión también estuvo asociada con zonas de elevada proliferación celular (Chekenya et al., 2002a). Además, la expresión del CSPG4 corrió paralela a la progresión del tumor en un modelo de implantación de glioma (Wiranowska et al., 2006). La progresión maligna se mantiene por la intercomunicación entre el tumor y su estroma, por la cual el estroma activado nutre a las células neoplásicas proliferativas e invasivas, aportando nueva vasculatura, componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento estimuladores. En ese contexto, el CSPG4 desempeña un papel importante en la activación del tumor-estroma a través de alteraciones en la adhesión, migración y proliferación celulares y en la morfogenia vascular (Chekenya and Immervoll, 2007).

El CSPG4 se expresa diferencialmente en los gliomas humanos, con mayor expresión en los gliomas de alto grado que en los de bajo (Chekenya et al., 1999). La elevada expresión del CSPG4 aparece correlacionada con la multirresistencia farmacológica mediada por el aumento de la activación de la vía de señalización de la $\alpha 3\beta 1$ -integrina/PI3K y sus dianas ulteriores, que promueve la supervivencia de la célula (Chekenya et al., 2008).

CSP-001 ha sido hallado en los siguientes órganos y tejidos y tipos de cáncer:

Cerebro: - glioblastoma;

- glioblastoma secundario (derivado de astrocitoma)

Colon: - adenocarcinoma (excluido el tipo mucinoso), primario;

Recto: - adenocarcinoma, metástasis

Estómago: - adenocarcinoma (excluido el tipo con células en anillo de sello), primario

Riñón: - carcinoma de células renales, estirpe celular;

- carcinoma de células renales, tipo de células claras, metástasis, todos los focos secundarios;

- carcinoma de células renales, tipo de células claras, primario; carcinoma de células renales, primario

Pulmón: -adenocarcinoma, primario:

- carcinoma adenoescamoso, primario;

- cáncer primario;

- carcinoma microcítico, primario;

- carcinoma epidermoide, primario;

Páncreas: - adenocarcinoma, primario;

- tumor de células de los islotes, maligno, metástasis

Próstata: - adenocarcinoma, primario

5 Piel: - melanoma maligno metastásico, metástasis ganglionar

Por consiguiente, se prefiere en particular una composición farmacéutica que comprende un péptido acorde con la SEQ ID N.º 1 para el tratamiento de:

Cerebro:

10 - glioblastoma;
- glioblastoma secundario (derivado de astrocitoma)

Colon: - adenocarcinoma (excluido el tipo mucinoso), primario;

Recto: - adenocarcinoma, metástasis

Estómago: - adenocarcinoma (excluido el tipo con células en anillo de sello), primario

Riñón: - carcinoma de células renales, estirpe celular;

15 - carcinoma de células renales, tipo de células claras, metástasis, todos los focos secundarios;
- carcinoma de células renales, tipo de células claras, primario;
- carcinoma de células renales, primario

Pulmón:- adenocarcinoma, primario; estadio I,

20 - carcinoma adenoescamoso, primario;
- cáncer primario;
- carcinoma microcítico, primario;
- carcinoma epidermoide, primario;

Páncreas:

25 - adenocarcinoma, primario;
- tumor de células de los islotes, maligno, metástasis

Próstata: - adenocarcinoma, primario

Piel: - melanoma maligno metastásico, metástasis ganglionar

Acil-CoA sintetasa miembro 1 de la familia *bubblegum* (ACSBG1)

30 La proteína codificada por este gen posee actividad acil-CoA sintetasa de cadena larga. Se cree que juega un papel central en el cerebro en la activación del metabolismo de los ácidos grasos de cadena muy larga y de la mielinogénesis. La activación de los ácidos grasos mediante la tioesterificación a acetil-CoA es un requisito necesario en la mayoría de las reacciones en que intervienen esta clase de moléculas. Aún no se han descrito en la bibliografía funciones que sean específicas del cáncer ni su sobreexpresión. El patrón de expresión de la proteína ACSBG1 en el cerebro, las glándulas suprarrenales, los testículos y los ovarios, así como su función, apuntan a su implicación en la patología bioquímica de la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (XALD). XALD es un trastorno neurodegenerativo grave, a menudo mortal, que se caracteriza por la acumulación en el plasma y en los tejidos de altos niveles de ácidos grasos saturados de cadena muy larga (Asheuer et al., 2005; Pei et al., 2003).

Brevicán (BCAN)

40 El brevicán es una proteína de la matriz extracelular que se expresa con profusión desde el nacimiento hasta los 8 años de edad y que llegada la veintena es regulada a la baja hasta alcanzar niveles bajos que se mantienen en la corteza adulta normal. La isoforma con GPI se expresa en niveles uniformemente bajos a lo largo del desarrollo (Gary et al., 2000). Los gliomas malignos invaden agresivamente el cerebro normal circundante, fenómeno que podría ser facilitado por proteínas extracelulares específicas de tejido o de tumor. Así pues, la matriz extracelular puede modular, en parte, la permisividad del tejido al movimiento celular. En consecuencia, la capacidad de los gliomas para modificar la matriz extracelular del SNC podría potenciar la invasividad de dichas células. Una molécula de la matriz extracelular que sufre una drástica regulación al alza en los gliomas es el BCAN, un proteoglicano de sulfato de condroitina propio del cerebro. La expresión del BCAN también aparece regulada al alza durante los períodos de elevada motilidad de las células gliales, que tienen lugar durante el desarrollo y a consecuencia de lesiones cerebrales. En el glioma se puede detectar un incremento de la expresión de en torno a siete veces con respecto a los niveles normales (Gary et al., 2000; Gary et al., 1998). Además de la regulación al alza del BCAN en el glioma, es posible que el procesamiento proteolítico de la proteína entera también contribuya a la invasión (Gary et al., 1998; Nutt et al., 2001). El procesamiento por medio de la escisión proteolítica del BCAN por

parte de metaloproteasas de la familia ADAMTS es un paso necesario para que inicie su efecto favorecedor de la invasividad en el glioma. La forma mutante del BCAN que «no es susceptible de proteólisis» es incapaz de potenciar la invasión de las células del glioma *in vitro* y la progresión del tumor *in vivo* (Viapiano et al., 2008). El ARNm del BCAN no se detecta en la corteza humana adulta normal ni en ningún otro tumor que no sea el glioma, por lo que el BCAN se considera un marcador único y selectivo del glioma (Jaworski et al., 1996). Asimismo, el análisis de proteínas ha revelado no solo el aumento de la expresión del BCAN entero sino la presencia de otras isoformas y exclusivas del glioma. A este respecto, B/b_{Δg} es un producto entero del ARNm del BCAN que surge como resultado de la glucosilación incompleta o reducida de la proteína central. B/b_{Δg} está ausente en el cerebro adulto normal pero sí se halla en muestras de glioma de alto grado (Viapiano et al., 2005).

Se ha descrito la sobreexpresión selectiva del BCAN en un tipo de célula tumoral similar a un citoblasto derivada del glioblastoma (Gunther et al., 2008). Este subtipo de células similares a citoblastos han manifestado la máxima pluripotencia y oncogenicidad *in vivo*.

Similar a quitinasa 3, tipo 1 (glucoproteína del cartílago-39) (CHI3L1)

La CHI3L1 es un miembro de las «proteínas similares a la quitinasa de mamífero» que se expresa y es segregada en diversos tipos de tumores sólidos. Producida por las células cancerosas y por los macrófagos asociados al tumor, muestra actividad de factor de crecimiento en las células implicadas en los procesos de remodelación de los tejidos y podría intervenir en la proliferación, la diferenciación, la supervivencia, la invasividad y la metástasis de las células tumorales, así como en la angiogenia, la inflamación y la remodelación de la matriz extracelular que envuelve el tumor (Johansen et al., 2006; Johansen et al., 2007; Ringsholt et al., 2007). Aparte, CHI3L1 es un autoantígeno candidato en la artritis reumatoide. Estirpes de linfocitos T CD4 procedentes de donantes sanos que reconocían a CHI3L1 expresaron el CD25, el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides, y moléculas Foxp3, y fueron capaces de suprimir la respuestas de linfocitos T específicos del antígeno. Las respuestas en el 50% de los pacientes con artritis reumatoide revelan una polarización hacia el fenotipo proinflamatorio de linfocito T cooperador de tipo 1 (Th1) y son sensiblemente menos capaces de suprimir las respuestas de memoria específicas de antígeno (van Bilsen et al., 2004).

El CHI3L1 es regulado al alza por la oncostatina M, de la cual se sabe que es inducida por el sistema nervioso como resultado del estrés celular, que se expresa en la mayoría de los tumores cerebrales humanos y activa la vía de señalización de JAK/STAT (Krona et al., 2007). La expresión de CHI3L1 también ha sido vinculada con la expresión de p-MAPK, p-mTOR y p-p70S6K en el glioblastoma (Pelloski et al., 2006).

En varios estudios de expresión génica, el CHI3L1 ha aparecido expresado con mayor profusión en el glioblastoma que en el cerebro normal, en concreto entre 3 y 62 veces más que en este último (Saidi et al., 2007; Kroes et al., 2007; Shostak et al., 2003; Tanwar et al., 2002). Los estudios de inmunohistoquímica han revelado que todas las células dotadas de un núcleo funcional son capaces de expresar la CHI3L1 en su citoplasma, si bien la intensidad de dicha expresión depende de la actividad celular. Por ello, las células que poseen una gran actividad metabólica tienden a mostrar una tinción más intensa en su citoplasma (Ringsholt et al., 2007). Asimismo, se ha podido demostrar por medio de técnicas de inmunohistoquímica que los glioblastomas expresan la CHI3L1 en mayor medida que los oligodendrogliomas anaplásicos (Nutt et al., 2005). El análisis por inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) de muestras de glioma para determinar los niveles de la proteína CHI3L1 ha revelado una elevación sustancial en el 65% de los glioblastomas multiformes y niveles indetectables en los gliomas de bajo grado (grado II y III) en el tejido cerebral normal (Tanwar et al., 2002). En contraste con el astrocitoma pilocítico, que no disemina y es posible curar con cirugía, solo el glioblastoma expresa CHI3L1 (Colin et al., 2006).

Los niveles de CHI3L1 en suero aparecen elevados en diversos tipos de neoplasias malignas, circunstancia que ha sido vinculada con una supervivencia peor. Los niveles séricos más elevados se han hallado en los pacientes con cáncer metastásico que presentaban el intervalo sin recurrencia más corto y la supervivencia global más breve. En concreto, en el suero de pacientes con glioblastoma se ha detectado una elevada expresión de la CHI3L1 (Kim et al., 2007; Johansen et al., 2007; Johansen et al., 2006; Junker et al., 2005; Tanwar et al., 2002). Los pacientes con glioblastoma multiforme cuyo tumor está activo presentan una concentración notablemente mayor de CHI3L1 que aquellos que no presentan ningún indicio radiológico de la enfermedad. Asimismo existe una significativa relación inversa entre el CHI3L1 y la supervivencia al glioblastoma multiforme (Hormigo et al., 2006; Pelloski et al., 2005).

La expresión elevada de CHI3L1 también se observa en el cáncer mama, donde aparece relacionada con un mayor tamaño del tumor, menor diferenciación tumoral y peor supervivencia sin enfermedad (Kim et al., 2007; Coskun et al., 2007). Asimismo, en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello se han detectado niveles elevados de la CHI3L1 en el suero en el 53% de los casos estudiados. Los pacientes que presentan un nivel sérico elevado de CHI3L1 presentan una supervivencia menor que aquellos cuyo nivel en suero es normal (33 frente a 84 meses) (Roslind et al., 2008).

Pacientes aquejados de cáncer de próstata presentaron niveles séricos de CHI3L1 significativamente mayores que los pacientes con HBP o personas sanas (Kucur et al., 2008).

Proteína de enlace portadora de dominio CAP-GLY 2 (CLIP2)

La proteína codificada por CLIP2 pertenece a la familia de las proteínas de enlace citoplasmáticas, que han sido propuestas como mediadoras de la interacción entre ciertos orgánulos membranosos y los microtúbulos. CLIP2 ha sido hallada tanto en relación con los microtúbulos como con un orgánulo denominado el cuerpo lamelar dendrítico (información general de la página web del NCBI).

A CLIP2 se la encuentra en los extremos de los microtúbulos tirosinados, pero no en los de los microtúbulos destirosinados. La tirosina ligasa de tubulina (TTL), la enzima que cataliza la adición de un residuo de tirosina C-terminal a la alfa-tubulina en el ciclo de tirosinación de la tubulina, interviene en la progresión tumoral y desempeña un papel vital en la organización neuronal (Peris et al., 2006). Un estudio del ADN genómico procedente de secciones congeladas de 30 casos de glioblastoma primario llevado a cabo con GenoSensor Array 300 caracterizó amplificaciones y deleciones génicas, así como información cromosómica en el genoma entero. Entre los genes que aparecieron amplificados con frecuencia se hallaban: =CLIP2 (63,3%), EGFR (53,3%), IL6 (53,3%), ABCB1 (MDR1) (36,7%) y PDGFRA (26,7%) (Suzuki et al., 2004).

Transportador de aniones orgánicos de la familia de transportadores de solutos (SLC), miembro 1C1 (SLCO1C1)

SLCO1C1 se expresa selectivamente en la barrera hematoencefálica (Chu et al., 2008). SLCO1C1 presenta preferencia selectiva por los sustratos y podría desempeñar un papel importante en la disposición de las hormonas tiroideas en el cerebro y en los testículos (Pizzagalli et al., 2002). SLCO1C1 no se ha detectado específicamente con inmunofluorescencia. SLCO1A2 y SLCO2B1 se han detectado con microscopía de inmunofluorescencia en la membrana luminal de las células endoteliales que conforman la barrera hematoencefálica y en la barrera hematotumoral, pero no en las células de glioma (Bronger et al., 2005).

Distrobrevina, alfa (DTNA)

La alfa-distrobrevina ha sido descrita principalmente como un componente citoplasmático del complejo de distrofina-glicoproteína en los miocitos esqueléticos. Las isoformas de la DTNA presentan localización dispar en las células y los tejidos; en las membranas basolaterales de las células epiteliales, las distrobrevinas median en el contacto con la matriz extracelular, las proteínas periféricas y transmembrana y el citoesqueleto de filamentos de actina. Aparte de su papel estructural, se supone que las DTNA son importantes para la señalización y la diferenciación celulares y están vinculadas con las zonas de oclusión durante sus reorganización (Sjo et al., 2005). La DTNA podría estar implicada en la formación y la estabilidad de las sinapsis, así como en el agrupamiento de los receptores colinérgicos nicotínicos.

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (homólogo del oncogén de la leucemia viral eritroblástica (v-erb-b), aviar) (EGFR)

Un ámbito de interés novedoso es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuyas anomalías constituyen una de las aberraciones moleculares más frecuentes en el glioblastoma. En concreto el EGFRvIII (receptor del factor de crecimiento epidérmico, variante III) es una forma mutante del EGFR oncogénica y activa constitutivamente que se suele expresar con frecuencia en el glioblastoma (Zawrocki and Biernat, 2005). El EGFR está implicado en la activación de diversas vías que regulan el fenotipo de las células progenitoras. La actividad de la cinasa de tirosina del EGFR potencia la migración, la proliferación y la supervivencia de los neurocitoblastos. Puesto que es sabido que la señalización del EGFR también interviene en el glioblastoma, se puede concluir que el glioblastoma deriva de oncocitoblastos y que las señales del EGFR se alteran habitualmente en esas células precursoras (Yuso-Sacido et al., 2006).

Los glioblastomas primarios surgen *de novo* en pacientes de edad avanzada y con frecuencia sobreexpresan el EGFR. La sobreexpresión del EGFR aparece correlacionada con el incremento de la angiogenia, el edema y la invasión (Aghi et al., 2005). Asimismo, los glioblastomas que presentan amplificación del EGFR son radorresistentes (Barker et al., 2001) y recidivan con más rapidez tras el tratamiento (Schlegel et al., 1994).

El glioblastoma es el único tumor humano no epitelial en que la activación excesiva del EGFR ha sido vinculada con el crecimiento tumoral y con la supervivencia del paciente, y en que la activación del EGFR promueve la infiltración tumoral en condiciones *in vitro* (Penar et al., 1997).

El EGFR es el protoncogén del erbB. La sobreexpresión del EGFR potencia el crecimiento celular estimulando la formación de complejos ligando:receptor activos. La amplificación génica es el mecanismo que se esconde tras la sobreexpresión de los receptores del EGF en los tumores de glioblastoma (Thompson and Gill, 1985). El gen EGFR radicado en el cromosoma 7 multiplica con frecuencia su número de copias en los gliomas de alto grado (Okada et al., 2007). La neutralización del EGFR mediante ARN de interferencia cortos anula la oncogenia de las células de glioblastoma (Huang et al., 2007).

La sobreexpresión del EGFR se detecta entre el 40% y el 70% de los glioblastomas, mientras que los astrocitomas anaplásicos, pilocíticos o de bajo grado son invariablemente negativos para dicho receptor. Los niveles elevados de

EGFR en suero indican una supervivencia reducida (Quaranta et al., 2007). Asimismo, se ha demostrado que las personas afectadas por astrocitomas de alto grado que disfrutaban de una supervivencia dilatada son negativas para el EGFRvIII (Liang et al., 2008).

5 Notch-1 regula al alza la expresión del EGFR y se hallan correlaciones entre los niveles de EGFR y el ARNm de Notch-1 en el glioma de alto grado primario humano (Purow et al., 2008).

El EGFR en sí mismo está implicado en la activación constitutiva de la cinasa de NH₂-terminal c-Jun (JNK), que contribuye a la proliferación, la supervivencia y la oncogenia en algunos tumores, entre ellos los gliomas (Li et al., 2008).

10 Aunque el EGFRvIII se expresa únicamente en un pequeño porcentaje de las células del glioma, la mayoría de las células exhiben un fenotipo transformado. Se ha demostrado que la expresión del EGFRvIII en células de glioma indolentes estimula la formación de microvesículas relacionadas con las balsas lipídicas que contienen EGFRvIII, las cuales son liberadas en el entorno de la células y pueden fusionarse con las membranas plasmáticas de las células cancerosas que carecen del EGFRvIII causando la transferencia de la actividad oncogena (Al-Nedawi et al., 2008).

Proteína de unión a ácidos grasos 7, cerebro (FABP7)

15 Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) son proteínas citosólicas de 14-15 kDa que supuestamente intervienen en la captación, el transporte y el direccionamiento de los ácidos grasos (AG). Podrían modular la concentración de ácidos grasos y de ese modo influir en la función de enzimas, membranas, canales iónicos y receptores, así como en la expresión génica y el crecimiento y la diferenciación celular. Se pueden diferenciar nueve tipos de FABP según su distribución específica en los tejidos. Si bien la identidad de la secuencia de aminoácidos
20 varía entre el 30% y el 70%, la estructura terciaria de *beta-clamp* a la cual se une el ácido graso es similar en todas ellas. El tejido nervioso alberga cuatro tipos de FABP, con una distribución espacio-temporal distintiva (Veerkamp and Zimmerman, 2001). La FABP7 se expresa con profusión en el cerebro y en la retina en desarrollo y su expresión disminuye notablemente en el SNC adulto (Godbout et al., 1998). A raíz de resultados obtenidos *in vitro*, se ha planteado que la FABP7 sería necesaria para el establecimiento del sistema glial radial en el cerebro en desarrollo
25 (Miña et al., 2007). La proteína FABP7 del cerebro normal apenas es detectable pero presenta una expresión moderada o intensa en el núcleo y en el citoplasma en varios glioblastomas multiformes. Las células transfectadas con FABP7 presentan una migración cinco veces mayor que las células de control. Así pues, la supervivencia total más breve asociada con la sobreexpresión de FABP7, especialmente en el glioblastoma, podría deberse al aumento de la migración y la invasión de las células tumorales en el parénquima cerebral circundante (Liang et al., 2005). La translocación nuclear de FABP7 está relacionada específicamente con la amplificación del EGFR y con los tumores más invasivos (Kaloshi et al., 2007). Así pues, la activación del EGFR puede estimular a la FABP7 nuclear y promover así la migración de las células tumorales del glioblastoma (Liang et al., 2006).

35 También se ha demostrado que la expresión de FABP7 es un marcador del carcinoma de células renales. La expresión de FABP7 se detecta únicamente en los tejidos de carcinoma pero no en las partes no cancerosas de las muestras renales (Teratani et al., 2007). La expresión de FABP7 en el carcinoma de las células renales ha demostrado ser 20 veces mayor en el tumor en comparación con el tejido renal normal (Domoto et al., 2007; Buchner et al., 2007). También se ha demostrado que FABP7 se expresa con frecuencia en el melanoma, donde podría intervenir en la proliferación y la invasión celular (Goto et al., 2006).

Proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP)

40 GFAP codifica una de las principales proteínas de los filamentos intermedios de los astrocitos maduros. Se usa como marcador para distinguir los astrocitos de otras células gliales durante el desarrollo. Las mutaciones de este gen causan la enfermedad de Alexander, un raro trastorno de los astrocitos del sistema nervioso central. Se ha descrito otra variante de transcripción, pero su secuencia entera no ha sido determinada. Se han descrito niveles elevados en el cerebro de personas autistas, en tanto que el cerebro de personas con depresión grave presentó
45 niveles reducidos de GFAP.

Se analizaron los cerebros de primates que habían desarrollado tumores *de novo* diez años después de recibir radiación en todo el órgano cerebral. Las células precursoras tumorales evidenciaron atipia celular y mitosis, siendo negativas para los marcadores tumorales GFAP, EGFR y p53 (Lubensky et al., 2006).

50 En las neoplasias astrocíticas el número de células positivas para GFAP y la intensidad de la tinción fueron directamente proporcionales al grado de malignidad. Los tres casos de oligodendroglioma presentaron una reacción negativa a la GFAP (Reyaz et al., 2005). Los oligodendrogliomas puros son inmunohistológicamente negativos para la GFAP (Mokhtari et al., 2005). Las concentraciones séricas de GFAP en pacientes con glioma de alto grado presentan una correlación lineal con el volumen tumoral (Brommeland et al., 2007). Incluso en los pacientes con glioblastoma se puede detectar una correlación significativa entre el volumen tumoral, el volumen de necrosis
55 tumoral, la cantidad de células necróticas positivas para la GFAP y la concentración sérica de esta proteína (Jung et al., 2007).

Tras el tratamiento de estirpes celulares de glioblastoma con 4-fenilbutirato, un inhibidor de la histona desacetilasa,

se observaron concentraciones elevadas de la GFAP sin fosforilar, mientras que las isoformas fosforiladas permanecieron intactas (Asklund et al., 2004).

En una estirpe celular de glioblastoma tratada con TGF-alfa, la transcripción del gen GFAP, el nivel de ARNm y la síntesis de la proteína en cuestión descendieron en torno a un 50% (Zhou and Skalli, 2000).

- 5 Técnicamente, el promotor de GFAP se usa a menudo como herramienta en modelos de ratón para provocar la expresión de proteínas específicamente en el sistema nervioso.

Los islotes de Langerhans del páncreas están envueltos por células de Schwann perinsulares (pSC) que expresan la GFAP. El ataque autoinmunitario contra elementos tisulares del sistema nervioso del páncreas parece ser parte integral inicial de la diabetes de tipo 1 (Winer et al., 2003). Esta expresión en el páncreas no es reflejada por Immatics ni por los datos de expresión génica externa en la mayoría de los tejidos. Se ha publicado que la GFAP-001 es un epítipo contra el cual los diabéticos de tipo 1 y sus parientes no diabéticos que presentan una respuesta humoral contra autoantígenos de la diabetes (riesgo elevado de sufrirla) muestran una reactividad exacerbada de los CTL secretores de granzima B (ELISPOT *ex vivo*) en comparación con los donantes sanos (Standifer et al., 2006).

10 Un dato interesante es que parece existir una correlación inversa entre la manifestación de las enfermedades autoinmunitarias, sobre todo de la diabetes, y el riesgo de aparición del glioma (Aronson and Aronson, 1965; Schlehofer et al., 1999; Brenner et al., 2002; Schwartzbaum et al., 2003; Schwartzbaum et al., 2005).

Receptor acoplado a proteína G, 56 (GPR56)

GPR56 es un receptor acoplado a proteína G atípico (GPCR) por estar dotado de una región extracelular N-terminal inusualmente grande, que contiene una larga región rica en Ser/Thr que forma un pedúnculo similar al de la mucina y, debido a este rasgo, se cree que puede intervenir en las interacciones entre células y entre la célula y la matriz. Esto, sumado al elevado nivel de expresión del ARNm y a la amplia distribución de este receptor, ha llevado a plantear su posible papel en los procesos de interacción entre las células (Liu et al., 1999). GPR56 pertenece al GPCR de la familia de las secretinas que intervienen en el desarrollo de las células progenitoras neurales y ha sido vinculado con malformaciones del cerebro humano durante el desarrollo. La expresión elevada de GPR56 aparece relacionada con los fenotipos de transformación celular de varios tejidos cancerosos en contraste con sus homólogos normales, lo cual denota una función potencialmente oncogena. El silenciamiento del GPR56 mediante ARN de interferencia desencadena la apoptosis y reduce el crecimiento independiente de la fijación de las células cancerosas a través del aumento del anoikis. El silenciamiento de GPR56 también reduce la adhesión celular con la matriz extracelular (Ke et al., 2007). La regulación al alza de GPR56 ha sido demostrada en el glioblastoma multiforme con genómica funcional. Los estudios de inmunohistoquímica han confirmado la expresión de GPR56 en la mayoría de muestras tumorales de glioblastoma/astrocitoma, frente a niveles indetectables de expresión en el cerebro adulto normal (Shashidhar et al., 2005). En las células cancerosas pancreáticas, el ARNm del GPR56 se expresa con profusión mientras que la proteína homónima se halla en niveles ínfimos o es indetectable, lo cual parece indicar que su expresión queda suprimida en dichas células (Huang et al., 2008). Estudios previos sobre la metástasis habían mostrado que el GPR56 aparece notablemente regulado a la baja en variantes altamente metastásicas de una estirpe celular de melanoma humano, de lo que se deduce que su sobreexpresión suprime el crecimiento tumoral y la metástasis. Dicha supresión del crecimiento se cree mediada por la interacción del GPR56 con una transglutaminasa tisular (TG2), un componente abundante en el tejido y el estroma, que ha sido implicado en la supresión de la progresión tumoral (Xu et al., 2006; Xu and Hynes, 2007). Se ha descrito otro efecto inhibitorio de GPR56 sobre la migración de las células progenitoras neurales (NPC). GPR56 se expresa con profusión en las NPC y probablemente participe en la regulación del movimiento de las NPC a través de la vía de señalización de Rho y G alfa (12/13), lo cual apunta a un cometido importante de la misma en el desarrollo del sistema nervioso central (Iguchi et al., 2008).

Receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA 4 (GRIA4)

45 Los receptores del glutamato de tipo amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) o AMPAR intervienen en la neurotransmisión rápida en las sinapsis excitadoras del SNC y están compuestos por subunidades formadas por un conjunto de cuatro proteínas, GluR1 a GluR4 (GRIA4).

Las subunidades GRIA4 se expresan ubicuamente en las células de glioblastoma humanas, operando como AMPAR permeables al Ca²⁺. Su conversión a receptores impermeables al Ca²⁺ inhibe la locomoción celular y promueve la apoptosis, mientras que la sobreexpresión de los receptores de AMPA permeables al Ca²⁺ facilita la migración y la proliferación de las células tumorales. Por consiguiente, los receptores AMPA permeables al Ca²⁺ parecen tener un papel crucial en el crecimiento del glioblastoma (Ishiyuchi et al., 2002).

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

55 La IGF2BP3 pertenece a la familia de las proteínas de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide-II, implicada en la localización, el recambio y el control traduccional del ARNm. La proteína codificada contiene varios dominios KH, que son importantes para la unión al ARN y se sabe que intervienen en la síntesis y el metabolismo del ARN. Se expresa principalmente durante el desarrollo embrionario y en ciertos tumores. Por ello, la IGF2BP3 se

considera una proteína oncofetal (Liao et al., 2005). No se ha hallado información específica sobre la expresión de la IGF2BP3 en el glioblastoma, pero sí se ha descrito su sobreexpresión en otros tipos de neoplasias malignas. La IGF2BP3 se expresó en el 30% de un conjunto de 716 muestras analizadas de carcinoma de células renales claras. En este estudio, su expresión se relacionó con el estadio avanzado y el grado de los tumores primarios, así como con otros rasgos adversos como la necrosis coagulativa del tumor y la diferenciación sarcomatoide. Además, la expresión positiva de IGF2BP3 apareció asociada con un aumento del riesgo de 5 a 10 veces de metástasis a distancia y con un incremento del 42% al 50% en el riesgo de muerte por carcinoma de células claras, lo cual apunta a que la expresión de la IGF2BP3 representa un predictor independiente del comportamiento tumoral del carcinoma de células renales claras agresivo (Hoffmann et al., 2008; Jiang et al., 2006; Jiang et al., 2008). La expresión de la IGF2BP3 también se ha detectado en el melanoma en comparación con nevus benignos, en los que no se detectó expresión aún en presencia de rasgos displásicos (Pryor et al., 2008). En el cáncer de endometrio, la expresión de IGF2BP3 está estrechamente relacionada con el cáncer de endometrio de tipo II y con un fenotipo histológico agresivo entre las lesiones neoplásicas endometriales (Zheng et al., 2008). En 20 pacientes aquejados de carcinoma epidermoide esofágico, se pudo observar la inducción de respuestas específicas de linfocitos T en TIL, así como de linfocitos de los ganglios regionales y de la sangre periférica contra un epítipo peptídico de la IGF2BP3 restringido al HLA-A2402 en el 40% de los casos (Mizukami et al., 2008).

La IGF2BP3 también aparece expresada al alza en los carcinomas pancreáticos. En dos estudios más del 90% de las muestras de tejido tumoral pancreático presentaron expresión de la IGF2BP3 revelada por inmunotinción, mientras que los tejidos pancreáticos no neoplásicos dieron negativo. Asimismo, el ARNm de la IGF2BP3 apareció sobreexpresado en carcinomas pancreáticos en comparación con muestras de tejido no neoplásico y la expresión aumentó progresivamente con el estadio tumoral (Yantiss et al., 2005; Yantiss et al., 2008). También se ha hallado una elevación significativa de la expresión de la IGF2BP3 en tumores uroteliales de alto grado, si bien en general no se expresa en el urotelio benigno ni en los tumores uroteliales de bajo grado. Asimismo, los pacientes con tumores IGF2BP3-positivos presentan unas tasas de supervivencia sin progresión y de supervivencia sin enfermedad mucho menores que los afectados por tumores IGF2BP3-negativos. Los pacientes IGF2BP3-positivos afectados por un carcinoma urotelial invasivo superficial como diagnóstico inicial también acabaron desarrollando metástasis, mientras que en los pacientes IGF2BP3-negativos no se hallaron metástasis. Asimismo, los datos de esos estudios indican que la IGF2BP3 podría intervenir en la progresión de los tumores uroteliales de bajo a alto grado tanto en las lesiones papilares como en las planas (Li et al., 2008b; Sitnikova et al., 2008).

30 **Leucoencefalopatía megalencefálica con quistes subcorticales 1 (MLC1)**

La leucoencefalopatía megalencefálica con quistes subcorticales (MLC) es un trastorno autosómico recesivo de la sustancia blanca cerebral que afecta a los niños. La MLC está causada por mutaciones del gen MLC1 (Ilija Boor et al., 2006). Por lo que saben los inventores, en la bibliografía no existe información sobre ninguna relación entre el MLC1 con los tumores cerebrales.

35 Existe un artículo publicado referente a la distribución celular y regional del MLC1 en el cerebro de ratón (Schmitt et al., 2003). La expresión máxima del MLC1 se halló durante el período pre y perinatal en células precursoras neurales multipotenciales. En el cerebro adulto del ratón el ARNm del gen se detectó exclusivamente en las células gliales. En contraste con los astrocitos en desarrollo y maduros, los oligodendrocitos no mostraron expresión del MLC1.

40 **Nestina (NES)**

Durante el desarrollo tiene lugar una amplia expresión de la nestina en los filamentos intermedios de las células neuroepiteliales del estrato ventricular 11 semanas después de la concepción en todas las partes del SNC, mientras que la inmunorreactividad a la nestina disminuye en el transcurso del segundo y el tercer trimestre (Takano and Becker, 1997; Lendahl et al., 1990; Zimmerman et al., 1994; Tohyama et al., 1992).

45 Durante o después de la migración del estrato ventricular en proliferación, la expresión de la nestina aparece fuertemente regulada a la baja en las neuronas posmitóticas (Arnold and Trojanowski, 1996). La tinción de la nestina en tejido de cerebro adulto humano no neoplásico solo reveló una tinción débil en un muy escaso número de células endoteliales (Dahlstrand et al., 1992). La nestina se puede reexpresar durante la transformación neoplásica (Veselska et al., 2006). En los tejidos de glioma, la inmunorreactividad de la nestina solo aparece en las células tumorales y la cantidad producida de esta proteína aumenta a medida que el grado del glioma gana en malignidad hacia el glioblastoma. Los glioblastomas (grado de malignidad IV) muestran la mayor incidencia de células positivas para la nestina y, en general, los mayores niveles de tinción de dicha proteína. La expresión de la nestina se puede detectar en células tumorales de varios tipos de tumores primarios del SNC, que son de origen neuroectodérmico, pero no en las células de carcinoma en metástasis (Dahlstrand et al., 1992; Tohyama et al., 1992). La nestina casi no se expresa en los astrocitomas difusos, se expresa variablemente en los astrocitomas anaplásicos y se expresa profusa e irregularmente en los glioblastomas, donde su distribución varía de modo complementario con la de la GFAP y la vimentina (Schiffer et al., 2006). Clínicamente, los tumores de células germinales del SNC que son negativos para la nestina no exhiben diseminación, si bien todos los tumores que exhiben diseminación también la expresan con intensidad (Sakurada et al., 2007).

Las células tumorales que expresan profusamente la nestina suelen estar próximas a los vasos sanguíneos (Dahlstrand et al., 1992), (Kurihara et al., 2000; Sugawara et al., 2002; Florenes et al., 1994; Strojnik et al., 2007) y se ha sugerido que la expresión de la misma por parte del endotelio activado serviría como marcador de la angiogenia (Teranishi et al., 2007; Maderna et al., 2007; Amoh et al., 2005; Mokry et al., 2004).

5 El glioblastoma multiforme comprende precursores transformados que portan todo el complemento completo de las características funcionales que se esperan de los citoblastos, incluida la capacidad para la generación de tumores. Estas células pueden crear un glioblastoma multiforme incluso tras el trasplante seriado, por lo que se las puede considerar como neurocitoblastos tumorales (Galli et al., 2004). Pertenecen a la subpoblación de células CD133+ de los tumores cerebrales humanos y co-expresan el marcador de neurocitoblastos nestina, pero no así marcadores diferenciados de linaje neural (Singh et al., 2004b; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004a; Mao et al., 2007). La presencia de una población CD133+/nestina+ en los tumores cerebrales sugiere que la célula iniciadora de los gliomas podría ser un neurocitoblasto normal (Shiras et al., 2007). Puesto que la señalización de Notch es activa en el tumor cerebral y en los citoblastos, se ha podido probar que el promotor de la nestina es activado en condiciones de cultivo por la actividad de Notch (Shih and Holland, 2006).

15 La transfección de la estirpe celular C6 de astrocitoma de rata con un dúplex de ARNs de la nestina reveló la influencia de la supresión ejercida por dichos ARNs de la nestina sobre el crecimiento de las células de astrocitoma cultivadas de un modo dosis-dependiente (Wei et al., 2008).

También se ha descrito la expresión de la nestina en oncocitoblastos de cáncer de próstata (Gu et al., 2007; Gipp et al., 2007) y de páncreas (Carriere et al., 2007) así como en el melanoma (Klein et al., 2007). Además, la nestina también se expresa en los tumores siguientes: GIST (Tsumijura et al., 2001; Sarlomo-Rikala et al., 2002), melanomas (Florenes et al., 1994; Brychtova et al., 2007), cáncer colorrectal (Teranishi et al., 2007) y tumores pancreáticos (Ohike et al., 2007; Kleeberger et al., 2007).

25 La expresión de la nestina también se detecta en diversos tejidos normales: Se ha descrito en los podocitos de los glomérulos maduros normales del riñón humano. En condiciones normales, la nestina se expresa en varios tipos de células glomerulares en los primeros estadios del desarrollo, pero queda confinada a los podocitos en los glomérulos maduros (Ishizaki et al., 2006), lo cual indica su cometido esencial en algún aspecto de la función del podocito. Los glomérulos adultos muestran inmunorreactividad a la nestina en células que expresan la vimentina y que tienen la morfología propia del podocito (Bertelli et al., 2007). Posiblemente la interacción de la nestina con la vimentina refuerza la resistencia mecánica de los podocitos, que sufren tensiones elevadas durante la filtración glomerular (Perry et al., 2007). Así pues, en el riñón humano, la nestina se expresa desde los primeros pasos de la glomerulogenia en los podocitos, las células mesangiales y las endoteliales. Esta expresión queda posteriormente restringida a los podocitos en los glomérulos maduros, sin que se pueda detectar en otras estructuras del riñón humano adulto (Su et al., 2007). La inmunohistoquímica ha revelado la expresión constante de la nestina en la corteza de las glándulas suprarrenales humanas normales. Las células que expresan la nestina están radicadas predominantemente en la zona reticular, donde los carcinomas suprarrenales muestra un número variable de células inmunorreactivas a la nestina (Toti et al., 2005).

35 La expresión de la nestina también se ha descrito en las células intersticiales de Cajal (CIC) del tubo digestivo normal. La mayoría de las CIC intramusculares del antro y todas las CIC mientéricas del intestino delgado son inmunorreactivas a la nestina, de igual modo que algunas CIC mientéricas y la mayoría de las CIC de la musculatura circular del colon (Vanderwinden et al., 2002). En el páncreas se hallan células inmunorreactivas a la nestina en los islotes y en la fracción exocrina. En las zonas de los grandes conductos pancreáticos, las células positivas para la nestina representan pequeños capilares dispersos por el tejido conectivo que envuelven el epitelio ductal. Así pues, la nestina se expresa en las células del endotelio vascular del páncreas humano (Klein et al., 2003). En los propios islotes se pueden hallar células progenitoras de los mismos que la expresan. Se ha formulado la hipótesis de que las células progenitoras derivadas de los islotes que son positivas para la nestina constituyen una población distinta de las células que residen en los islotes pancreáticos y que podrían participar en la neogenia de las células endocrinas de los islotes (Zulewski et al., 2001). En el hígado normal adulto es posible aislar una población de citoblastos hepáticos humanos que son positivos para la vimentina y la nestina (Herrera et al., 2006). En ensayos con cultivos celulares, el análisis de la composición del citoesqueleto y de la matriz mediante inmunotinción reveló que las células medulares adultas y las pulmonares fetales expresan las proteínas vimentina y nestina en sus filamentos intermedios (Sabatini et al., 2005). En la dentición definitiva joven, la nestina se halla en los odontoblastos funcionales. Su expresión aparece regulada a la baja y la nestina no aparece en la dentición definitiva de más edad, pero en cambio aparece de nuevo regulada al alza en los dientes cariados y dañados (About et al., 2000).

55 Los citoblastos adultos que expresan la nestina también se encuentran en la región periluminal de la hipófisis anterior madura y, por medio de técnicas de mapeo del destino genético, se ha demostrado que sirven para generar subgrupos de los seis tipos de células endocrinas terminalmente diferenciadas que concurren en la glándula hipofisaria. Dichos citoblastos, si bien no desempeñan ningún papel relevante en la organogenia, sufren una expansión posnatal y comienzan a engendrar una progenie diferenciada, que coloniza el órgano que inicialmente consistía enteramente en células diferenciadas derivadas de precursores embrionarios (Gleiberman et al., 2008).

60 **Subfamilia 2 del receptor nuclear, grupo E, miembro 1 (NR2E1)**

El NR2E1 (TLX) es un factor de transcripción esencial para la proliferación y la autorrenovación de los neurocitoblastos mediante el reclutamiento de las histona desacetilasas (HDAC) hacia los genes diana situados corriente abajo con el fin de reprimir su transcripción, lo que a su vez regula la proliferación de los neurocitoblastos. El reclutamiento de las HDAC conduce a la represión de la transcripción de los genes diana TLX, el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21(CIP1/WAF1)(p21) y el gen oncosupresor PTEN (Sun et al., 2007). La subfamilia TLX/HOX11 de genes homeobox divergentes interviene en diversos aspectos de la embriogenia y, en el caso de TLX1/HOX11 y de TLX3/HOX11L2, destacan notablemente como oncogenes en la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (Dixon et al., 2007). El NR2E1 dirige un programa de desarrollo fundamental de la organización retiniana y controla la generación del número apropiado de progenies retinianas y el desarrollo de los gliocitos durante el prolongado período de la retinogenia (Miyawaki et al., 2004). No se ha hallado información específica referente al glioblastoma.

Molécula de adhesión celular neuronal (NRCAM)

La NRCAM humana (Molécula de adhesión celular relacionada con la neuroglía) aparece sobreexpresada en el tejido de glioblastoma multiforme (GMT) con respecto al tejido cerebral normal. La NRCAM es descrita como una proteína transmembrana de tipo I de un solo paso que interacciona con la anquirina. La neutralización con hNRCAM antisentido causó la reducción de la expresión de la hNRCAM natural, cambios en la morfología celular, redujo el ritmo de proliferación celular y prolongó el ciclo celular. Además, la sobreexpresión de las hNRCAM antisentido en dichas células causó un acusado descenso del número de colonias en agar blando y la invasión a través del gel de la matriz extracelular en condiciones *in vitro*. La inyección subcutánea a ratones atímicos de células de glioblastoma que sobreexpresaban las hNRCAM antisentido causó la completa inhibición de la formación de tumores en contraste con las células transfectadas únicamente con el vector. La inoculación en el seno del tumor de un plásmido que expresaba hNRCAM antisentido también ralentizó el crecimiento tumoral en ratones atímicos en condiciones *in vivo* (Sehgal et al., 1999). El análisis por RT-PCR específico del gen indicó que la hNRCAM aparece sobreexpresada en los tejidos tumorales de glioblastoma, gliomas y astrocitomas de alto grado en comparación con el tejido cerebral normal (Sehgal et al., 1998). La NRCAM, una molécula de adhesión intercelular perteneciente a la familia de las moléculas de adhesión celular similares a las inmunoglobulinas, conocida por su función en el crecimiento y la orientación de las ramificaciones neuronales, ha sido identificada recientemente como un gen diana de la señalización de la beta-catenina en células y tejidos de melanoma y de carcinoma de colon humanos. La transducción de la NRCAM en fibroblastos a través de retrovirus estimula la motilidad celular y la oncogenia (Conacci-Sorrell et al., 2005). El fomento de la transcripción de la NRCAM a través de la beta-catenina o de la plakoglobina desempeña un papel en la oncogenia del melanoma y del cáncer de colon, probablemente al promover el crecimiento y la motilidad de las células (Conacci-Sorrell et al., 2002). Otras dianas de la vía de señalización de la beta-catenina también aparecen reguladas al alza, como es el caso de MYC (Liu et al., 2008). La NRCAM aparece sobreexpresada en los carcinomas papilares de tiroides humanos a nivel del ARNm y de la proteína, en cualquiera de los estadios tumorales (Gorka et al., 2007).

La sobreexpresión del ARNm de la NRCAM en los tumores está relacionada con altos índices de proliferación y se asoció a un desenlace negativo en ependimomas (Zangen et al., 2007).

Podoplanina (PDPN)

La PDPN es una glucoproteína integral de membrana de tipo I similar a la mucina que presenta una distribución diversa en los tejidos humanos. Interviene en la migración, la invasión y la metástasis de las células cancerosas, así como en la progresión maligna y está implicada en la agregación plaquetaria. CLEC-2 es el primer receptor fisiopatológico de la podoplanina descubierto (Kato et al., 2008). Se estudió una serie de 115 glioblastomas mediante técnicas de inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-PDPN. El 47% de ellos expresaban la PDPN en células de la superficie, sobre todo alrededor de las zonas necróticas y en las células endoteliales en proliferación. Asimismo, la expresión del ARNm y de la proteína de la PDPN resultaron notablemente superiores en el glioblastoma que en los astrocitomas anaplásicos, lo cual parece indicar que la expresión de dicha proteína podría estar relacionada con la malignidad de los astrocitos (Mishima et al., 2006). En otros análisis, la PDPN también ha sido hallada expresada en el 82,9% de una serie de glioblastomas (29/35) (Shibahara et al., 2006). En otro estudio que investigó la expresión de la PDPN y la actividad estimuladora de la agregación plaquetaria por parte de estirpes celulares de glioblastoma, la estirpe LN319 expresó con profusión la PDPN y fomentó la agregación. El NZ-1, un anticuerpo anti-PDPN altamente reactivo, neutralizó la agregación plaquetaria facilitada por la LN319, lo cual apunta a que la PDPN sería el principal determinante de la agregación estimulada por la misma (Kato et al., 2006). Los niveles de expresión génica de la PDPN fueron notablemente mayores en los glioblastomas que en la sustancia blanca no neoplásica, extremo confirmado por técnicas inmunohistoquímicas (Scrideli et al., 2008). La PDPN se expresa específicamente en las células endoteliales linfáticas pero no en las del endotelio vascular sanguíneo en cultivo y en la linfangiogenia tumoral. Si bien la PDPN parece estar básicamente ausente en la epidermis humana normal, su expresión resultó muy intensa en 22 de 28 carcinomas espinocelulares, lo cual parece indicar su implicación en la progresión tumoral (Schacht et al., 2005). La PDPN aparece regulada al alza en el frente invasor de ciertos carcinomas humanos. El análisis de la expresión de la PDPN en células de cáncer de mama humano cultivadas, en un modelo murino de carcinogenia de las células beta pancreáticas, y en biopsias tumorales humanas indica que la PDPN promueve la invasión de las células tumorales en condiciones *in vitro* e *in vivo*. La PDPN induce la migración colectiva de las células por medio de la formación de filopodios a través de la regulación a la baja de las

actividades de las GTPasas pequeñas de la familia Rho. En conclusión, la PDPN estimula una vía alternativa de invasión de las células tumorales en ausencia de la transición epitelio-mesenquimática (Wicki et al., 2006). El nivel de expresión de la PDPN apareció potenciado en una mayoría de pacientes con tumores colorrectales (Kato et al., 2003). Al TGF-beta se le atribuye la función de regulador fisiológico de la PDPN en células tumorales (Suzuki et al., 2008). La PDPN es expresada por células cancerosas procedentes del esófago, el pulmón, el hígado, el colon y la mama así como de las células endoteliales linfáticas (Kono et al., 2007).

Tenascina C (hexabraquión) (TNC)

La expresión de la glucoproteína de la matriz extracelular TNC en el glioblastoma pero no en el cerebro normal y su relación con las membranas basales del endotelio que prolifera en el marco del glioblastoma ya sugirieron en 1983 que la TNC podría servir como marcador de los gliomas (Bourdon et al., 1983). Durante la progresión tumoral, la matriz extracelular de los tejidos tumorales se remodela hasta convertirse en un entorno más propicio para la progresión del tumor, proceso en el que la angiogenia es un paso esencial (Carnemolla et al., 1999). Además, la TNC aparece sobreexpresada en vasos tumorales que muestran un elevado índice proliferativo, lo cual indica su implicación en la angiogenia neoplásica (Kim et al., 2000). En los tumores, la hipoxia puede estimular la expresión de la TNC (Lal et al., 2001). La estimulación de la TNC está mediada por el TGF-beta1, que proporciona el mecanismo para la invasión del parénquima sano por parte de los gliomas de alto grado (Hau et al., 2006). Asimismo, la sobreexpresión de la TNC es consecuencia de la activación específica del promotor del gen de la tenascina C por parte de la gastrina, que es conocida por modular notablemente la migración de las células del glioblastoma humano (Kucharczak et al., 2001). La TNC regula a la baja la tropomiosina-1 y por ello desestabiliza las fibras de estrés de actina. Además, causa la regulación a la baja del inhibidor de la ruta de Wnt Dickkopf1. Dado que el descenso de la expresión de la tropomiosina-1 y el aumento de la vía de señalización de las Wnt están vinculados estrechamente con la transformación y la oncogenia, la TNC modula específicamente estas vías de señalización potenciando la proliferación de las células de glioma (Ruiz et al., 2004).

En los tejidos de glioblastoma se observa la tinción perivascular de la TNC alrededor de los vasos sanguíneos que irrigan el tumor, mientras que ésta es menos frecuente en los gliomas de grado II y III de la OMS, lo cual indica que la intensidad de la tinción de la TNC está relacionada con el grado del tumor y que a mayor intensidad, peor pronóstico (Herold-Mende et al., 2002; Zukiel et al., 2006). La expresión máxima de la TNC se observa en el tejido conectivo que rodea los tumores (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004). La TNC también contribuye a generar un nicho de citoblastos en la zona subventricular (ZSV), interviniendo en la orquestación de la señalización de los factores de crecimiento para acelerar el desarrollo de los neurocitoblastos. La TNC es esencial para la expresión oportuna del EGFR en los neurocitoblastos y potencia la señalización del FGF2. El efecto predominante de la TNC sobre las células situadas en la ZSV consiste en la regulación de la progresión del desarrollo (Garcion et al., 2004). La TNC es el inductor más potente de la migración dirigida de los neurocitoblastos humanos (haptotaxia). La matriz extracelular producida por el tumor ofrece, pues, un entorno permisivo para el tropismo de los neurocitoblastos en células tumorales diseminadas (Ziu et al., 2006).

La vía de la TNC también desempeña un papel destacado en el crecimiento y la metástasis de los tumores mamarios. Así pues, el bloqueo de la señalización o la reducción de la expresión de la TNC en células MDA-MB-435 derivó en una alteración sustancial de la migración celular y en la proliferación celular independiente de la fijación. Ratones a los que se inyectaron clones de células MDA-MB-435 que presentaban una expresión reducida de la TNC manifestaron un descenso sustancial del crecimiento del tumor primario así como de las recidivas tumorales tras la extirpación quirúrgica de dicho tumor y un descenso de la incidencia de las metástasis pulmonares (Calvo et al., 2008).

Survivina (BIRC5)

La expresión de BIRC5 (survivina), un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), es elevada en tejidos fetales y en diversos cánceres humanos mientras que su expresión está enormemente reducida en los tejidos diferenciados normales del adulto, sobre todo en aquellos cuyo índice de proliferación es bajo. La survivina parece ser capaz de regular tanto la proliferación celular como la muerte celular apoptótica. Aunque la survivina se localiza normalmente en la región citoplasmática de la célula donde está asociada con un mal pronóstico en el cáncer, también se ha descrito en el núcleo, localización donde indica un pronóstico favorable (O'Driscoll et al., 2003). Se han descrito varios mecanismos de regulación a través de la survivina y de ella misma. La survivina parece estar relacionada con la chaperona molecular Hsp60. En condiciones *in vivo*, la Hsp60 aparece abundantemente expresada en los tumores humanos primarios en comparación con los correspondientes tejidos normales. El silenciamiento agudo de la Hsp60 con ARN pequeños de interferencia desestabiliza la reserva mitocondrial de survivina, induce la disfunción mitocondrial y activa la apoptosis dependiente de caspasas (Ghosh et al., 2008). Además, la inhibición de Ras libera el «freno» que ejerce la survivina sobre la apoptosis y provoca la activación de la vía apoptótica mitocondrial. Especialmente en el glioblastoma, la resistencia a la apoptosis se puede neutralizar con un inhibidor de Ras dirigido contra la survivina (Blum et al., 2006). Asimismo parece haber una correlación entre la hiperactividad del NF-kappaB en los gliomas y la hiperexpresión de la survivina, uno de los genes diana del factor NF-kappaB. En consecuencia, los genes antiapoptóticos activados por el NF-kappaB están hiperexpresados en muestras tumorales. Y especialmente en el glioblastoma se detectan niveles sumamente elevados de expresión de la survivina (Angileri et al., 2008). Se ha planteado que la sobreexpresión de la survivina

en los gliomas cerebrales podría desempeñar un papel importante en la proliferación maligna, los mecanismos anti-apoptóticos y la angiogenia (Zhen et al., 2005; Liu et al., 2006b). Se han realizado diversos análisis para estudiar la expresión de la survivina y su repercusión en la supervivencia en el marco del glioblastoma. En resumen, la expresión de la survivina, sobre todo la expresión simultánea en el núcleo y el citoplasma en los tumores astrocíticos apareció relacionada significativamente con el grado de malignidad (con la mayor expresión de survivina en el glioblastoma) y con tiempos de supervivencia global más cortos que los pacientes con tumores negativos para la survivina (Kajiwara et al., 2003; Saito et al., 2007; Uematsu et al., 2005; Mellai et al., 2008; Grunda et al., 2006; Xie et al., 2006; Sasaki et al., 2002; Chakravarti et al., 2002). La sobreexpresión de la survivina también se ha descrito en otros tipos de tumores. En el cáncer de mama, la expresión de la survivina aparece asociada con un grado mayor y menor supervivencia sin progresión (Yamashita et al., 2007; Al-Joudi et al., 2007; Span et al., 2004). En estirpes celulares de cáncer de esófago, la actividad promotora de la survivina ha resultado ser 28,5 veces más elevada que en los tejidos normales (Sato et al., 2006). La expresión de la survivina en el cáncer colorrectal también está relacionada con el grado patológico y la metástasis ganglionar (Tan et al., 2005). También se ha demostrado que la agresividad del carcinoma de células renales claras está relacionada con la expresión de la survivina. Asimismo, su expresión está inversamente relacionada con la supervivencia dependiente específicamente del cáncer (Kosari et al., 2005). La expresión de la survivina se puede detectar en un conjunto de neoplasias queratinocíticas y lesiones cutáneas hiperproliferativas pero no en la piel normal (Bowen et al., 2004). En estirpes celulares de cáncer de páncreas, la survivina aparecía amplificada en el 58% de las estirpes celulares estudiadas (Mahlamaki et al., 2002). En el carcinoma epidermoide, la expresión de la survivina puede ayudar a identificar los casos con un fenotipo clínico más agresivo e invasivo (Lo et al., 2001).

Las posibilidades que ofrece la survivina como diana en el tratamiento contra el cáncer ha propiciado la realización de estudios con péptidos derivados de la misma en los cuales ha demostrado su inmunogenicidad en pacientes oncológicos al desencadenar respuestas mediadas por los linfocitos T CD8+. Asimismo, la survivina estimuló de forma específica la reactividad de los linfocitos T CD4+ en linfocitos de sangre periférica de los mismos pacientes (Casati et al., 2003; Piesche et al., 2007).

La survivina (SVN, BIRC) se sobreexpresa en multitud de tipos de cáncer distintos. Por lo que en general su sobreexpresión se considera vinculada con una menor supervivencia global y mayor grado de malignidad.

La presente invención describe además proteínas marcadoras concretas que pueden ser utilizadas para el pronóstico del glioblastoma. Y además, el uso de estas nuevas dianas para el tratamiento del cáncer.

Tal y como se muestra en la presente memoria, las proteínas GFAP, FABP7, DTNA, NR2E1, SLCO1C1, CHI3L1, ACSBG1, IGF2BP3, NLGN4X, MLC1, NRCAM, BCAN, EGFR, PDPN, NES y CLIP2 aparecen intensamente sobreexpresadas en los glioblastomas en comparación con el cerebro normal y con otros tejidos vitales (p. ej. hígado, riñón o corazón). Se ha demostrado que las proteínas GRP56, CSPG4, NRCAM, TNC, BIRC5, CLIP2, NES, PDPN, EGFR, BCAN y GRIA4 tienen una importante función en la oncogenia puesto que intervienen en la transformación maligna, el crecimiento y la proliferación celular, la angiogenia o la invasión del tejido normal.

Las proteínas NES, TNC, BIRC5 y EGFR están relacionadas con oncocitoblastos o con nichos de citoblastos en el glioblastoma. 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 BIRC5, NRCAM y IGF2BP3 en los tumores está relacionada con estadios avanzados de la enfermedad y con un pronóstico negativo para los pacientes.

Se ha demostrado que BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN desempeñan un papel importante en la remodelación de los tejidos necesaria para el crecimiento del tumor en el sistema nervioso. Así pues, la expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN puede ser utilizada como marcador para distinguir el glioblastoma de otras formas de cáncer.

En consecuencia, se describen métodos para identificar un animal, preferentemente un ser humano que es probable que padezca un glioblastoma. En una forma de realización, la probabilidad determinada varía entre el 80% y el 100%. Tal método comprende la determinación del nivel de al menos una de las proteínas BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN en una muestra tumoral del sujeto animal. En una forma de realización, la muestra se obtiene por cirugía radical. En otra forma de realización, la muestra se obtiene mediante biopsia por punción.

Cuando el nivel determinado de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN 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 glioblastoma.

Cuanto más proteínas del grupo estén reguladas al alza, a saber, BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN, más alta será la probabilidad de que el sujeto animal esté afectado por un glioblastoma.

En una forma de realización, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN

se efectúa *in situ*. En una forma de realización, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa *in vitro*. En otra forma más de realización, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa *in vivo*. En una forma de realización preferida, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se lleva a cabo con microscopía con captura por láser combinada con electroinmunotransferencia (*Western blot*).

En una forma de realización concreta, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa con un anticuerpo específico contra BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN. En otra forma de realización concreta, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa con una PCR con un cebador específico para un ARNm que codifica BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN. En otra forma más de realización concreta, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa con una sonda nucleotídica específica para un ARNm que codifica BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN. En una forma de realización, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa con hibridación de ARN (*Northern blot*). En otra forma de realización, la determinación del nivel de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN se efectúa con un ensayo de protección frente a ribonucleasas. En otras formas de realización, pruebas inmunológicas tales como el ensayo de inmunoadsorción (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) o la inmunoelectrotransferencia pueden ser utilizadas para detectar polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN 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 sometiendo a un inmunoensayo para la detección de polipéptidos, como ELISA, RIA o inmunoelectrotransferencia (*Western blot*). 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 glioblastoma 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 BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN (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 desprovisto de marcaje con un anticuerpo secundario que lleve acoplada una molécula detectable.

Asimismo, se describen proteínas o péptidos quiméricos o de fusión que comprenden los polipéptidos BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y/o PDPN, y fragmentos de los mismos, incluidos fragmentos funcionales, proteolíticos y antigénicos.

El compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4⁺. Los epítomos que estimulan a los CD4⁺ son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en el toxoide tetánico. En otra forma de realización preferida 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 una forma de realización el péptido de la invención es 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 de la invención.

También se describen anticuerpos contra los polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN, contra las proteínas quiméricas o de fusión que comprenden los polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN, así como contra los fragmentos de los polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN, incluidos fragmentos proteolíticos y antigénicos, y contra las proteínas o péptidos quiméricos o de fusión que comprendan tales fragmentos. Además también se describen métodos para usar tales anticuerpos para el pronóstico del cáncer, en particular del glioblastoma.

Los anticuerpos de la presente invención descritos pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos quiméricos. También se describen estirpes de células inmortales que producen un anticuerpo monoclonal.

Cualquier persona con aptitudes ordinarias en la técnica entenderá que en determinadas circunstancias la expresión elevada de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN como gen marcador de tumor indicará un pronóstico peor para el sujeto con glioblastoma. Por ejemplo, niveles relativamente altos de expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN pueden indicar un tumor primario relativamente grande, una carga tumoral mayor (p. ej., más metástasis), o un fenotipo tumoral relativamente más maligno.

Cuanto mayor sea la sobreexpresión de las diferentes proteínas del grupo que comprende BCA, CLIP2, DTNA,

NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN, peor será el pronóstico para el paciente.

Los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos implican el uso de métodos conocidos, p. ej., métodos a base de anticuerpos para detectar polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN y métodos basados en la hibridación y/o la amplificación de ácidos nucleicos para detectar el ARNm de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y/o PDPN.

Además, como la destrucción rápida de las células tumorales provoca a menudo la generación de autoanticuerpos, los marcadores tumorales de glioblastoma 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 BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN en un sujeto. Los niveles de autoanticuerpos específicos contra los polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN 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 glioblastoma.

Los polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN 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 de células (incluidas células obtenidas de muestras de líquido o como el líquido de la cavidad peritoneal) para identificar una biopsia tisular o celular como portadora de células de glioblastoma. 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 entero o de las células íntegras para determinar los niveles de polipéptidos o de ARNm de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN *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 medir los niveles de expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN

La presente invención describe equipos para detectar el aumento del nivel de expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN como genes marcadores del glioblastoma en un sujeto. Un equipo para detectar un polipéptido marcador del glioblastoma contiene preferentemente un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido marcador de glioblastoma seleccionado. Un equipo para detectar el ARNm de un marcador de glioblastoma 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 hibriden específicamente con el ARNm de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN.

En concreto, el equipo con anticuerpo puede ser utilizado para detectar la presencia y/o medir el nivel de un polipéptido de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y/o PDPN 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 ELISA y puede contener un control (p. ej. una cantidad especificada de un polipéptido marcador de glioblastoma en 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.

Se puede usar un equipo de ácidos nucleicos para detectar y/o medir el nivel de expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN mediante la detección y/o la medición de la cantidad de ARNm de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN 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 BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN contiene preferentemente suficientes cebadores oligonucleotídicos para llevar a cabo la transcripción inversa del ARNm del marcador de glioblastoma 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 BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN puede servir como dianas terapéuticas para el tratamiento o la prevención del glioblastoma. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se une específicamente a polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN 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 del glioblastoma se traduce en la administración dirigida del compuesto terapéutico en las células de glioblastoma, 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 BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN. Esta inmunotoxina puede ser administrada a una célula y tras su unión al polipéptido marcador del glioblastoma localizado en la superficie celular, la toxina conjugada con el anticuerpo específico del marcador de glioblastoma entrará en contacto con la célula.

Además, con cualquier polipéptido de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN para el cual exista un ligando específico (p. ej., un ligando que se une a una proteína localizada en la superficie celular), el ligando se puede usar en lugar de un anticuerpo para introducir de forma dirigida un compuesto tóxico en una célula de glioblastoma, 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., la unión específica de un polipéptido marcador del glioblastoma, la administración de una toxina contra una célula de glioblastoma que exprese un gen marcador de glioblastoma con un nivel elevado, y/o inhibición de la actividad de un polipéptido marcador del glioblastoma) 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 entiende que para generar los anticuerpos se pueden emplear tanto los polipéptidos marcadores del glioblastoma enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo 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 BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN, o un fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariontas (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 de glioblastoma 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, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de glioblastoma congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.

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

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

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 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).

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 22.12.1994 y en la Pat. de EE. UU. N.º 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.

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 de sulfuro para aumentar la biolonegividad, 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 mutagenia de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos 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 todas de al menos uno, y normalmente de dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, a un anticuerpo humanizado se le introducen uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo la o las secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. EE.UU. N.º 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.

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.

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 Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución oscile aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, 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 el anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al, eds. Raven Press, New York (1977) pp. 365-389. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo como tratamiento contra el glioblastoma, 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 glioblastoma 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 glioblastoma.

Puesto que los marcadores tumorales del glioblastoma BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN de la invención se expresan con profusión en las células del glioblastoma pero en cambio lo hacen extremadamente poco en las células normales, la inhibición de la expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN o de la actividad de sus polipéptidos puede formar parte de una estrategia terapéutica para tratar o prevenir el glioblastoma.

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/diana del glioblastoma con terapia génica antisentido se puede lograr con la administración directa de ARN antisentido del marcador del glioblastoma 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.

Un estrategia alternativa para inhibir la función de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN con terapia génica implica la expresión intracelular de un anticuerpo anti-BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN o de una porción de un anticuerpo anti-BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN. Por ejemplo, el gen (o fragmento de gen) que codifica un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN 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. A continuación el vector se administra al sujeto de tal modo que es captado por las células del glioblastomas u otras células, que después segregarán el anticuerpo anti-BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN y de ese modo bloquearán la actividad biológica del polipéptido de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN. Preferentemente, los polipéptidos de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN estarán presentes en la superficie externa de las células de glioblastoma.

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 marcadora del glioblastoma. El vector puede estar disponible en una preparación comercial, como un vector adenovírico (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, Maryland, EE.UU.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wisconsin, 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 de SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona, EE.UU.).

5 Como ejemplo, el vector puede ser un sistema viral, como un sistema de vector retroviral que puede encapsidar un genoma retroviral recombinante. El retrovirus recombinante infecta las células y con ello inocula un ácido nucleico antisentido que inhibe la expresión de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM o PDPN. El método exacto para introducir el ácido nucleico alterado en células de mamífero no se limita al uso de vectores retrovirales. Existen otras técnicas comunes para llevar a cabo este procedimiento, tales como vectores adenovirales, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores lentivirales o vectores retrovirales 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.

15 Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1×10^{-6} M.

20 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* o *in vitro* de las proteínas BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN.

35 La presente invención proporciona un péptido que consiste en una secuencia LTFGDVVAV acorde con la SEQ ID N.º 10. El péptido de la invención tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

40 En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad 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 delección (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 (Nucleic Acid Res., 22(22): 4673 4680 (1994)). Bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras herramientas de análisis.

45 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., 2001); (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

50 Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos indicada en las SEQ ID N.º 1 a 25. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al menos mantenga la capacidad para interactuar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de CTL activados. Estos CTL pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía (Rammensee et al., 1997) y de las bases de datos científicas (Rammensee et al., 1999), ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Así pues, una persona versada en la técnica será capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestos en las

60

SEQ ID N.º 1 a 25, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. 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.

Aquellos residuos de aminoácido que no contribuyan sustancialmente a las interacciones con el receptor del linfocito T se pueden modificar mediante el reemplazo con otro aminoácido cuya incorporación no altere sustancialmente la reactividad del linfocito T y no suprima la unión al MHC. Así pues, aparte de la salvedad dada, el péptido de la invención puede ser cualquier péptido (término en el que los inventores incluyen oligopéptido o polipéptido), que incluye las secuencias de aminoácidos o una porción o variante de las mismas como se indica.

Tabla 2: Variantes y motivos de los péptidos acordes con las SEQ ID N.º 1 a 25

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------|--------------------|----------|---|----------|---|---|---|---|---|---|----------|
| CSP-001 | Código del péptido | | T | M | L | A | R | L | A | S | A |
| SEQ ID 1 | Variantes | | | | | | | | | | L |
| | | | | L | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| ACS-001 | Código del péptido | | K | I | M | E | R | I | Q | E | V |
| SEQ ID 2 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | L | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | | A | | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | | | P | | N | | | | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | M | | | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| BCA-001 | Código del péptido | | F | L | G | D | P | P | E | K | L |
| SEQ ID 3 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| BCA-002 | Código del péptido | A | L | W | A | W | P | S | E | L | |
| SEQ ID 4 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| CHI3L1-010 | Código del péptido | T | L | Y | G | M | L | N | T | L | |
| SEQ ID 5 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | | I | I | A | E | |
| | | | L | | | P | K | | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| CLIP2-001 | Código péptido del | S | L | N | E | L | R | V | L | L | |
| SEQ ID 3 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| BCA-002 | Código péptido del | A | L | W | A | W | P | S | E | L | |
| SEQ ID 4 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| CHI3L1-010 | Código péptido del | T | L | Y | G | M | L | N | T | L | |
| SEQ ID 5 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | | I | I | A | E | |
| | | | L | | | P | K | | Y | | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | | | | | | | | | | |
|-------------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| CLIP2-001 | Código del péptido | S | L | N | E | L | R | V | L | L | |
| SEQ ID 6 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | | | | | | | | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| SLCO1C1-001 | Código del péptido | Y | L | I | A | G | I | I | S | | L |
| SEQ ID 7 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| DTNA-001 | Código del péptido | K | L | Q | D | E | A | Y | Q | | V |
| SEQ ID 8 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
|-----------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | | |
| | | | L | | Y | P | K | L | | | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | | |
| | | | | | P | | N | | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| EGFR-007 | Código del péptido | | A | L | A | V | L | S | N | Y | D | A |
| SEQ ID 9 | Variantes | | | M | | | | | | | L | |
| | | | | | | | | | | | L | |
| | | | | | | E | | | | K | | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | | |
| | | | K | | P | | N | | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| FABP7-001 | Código del péptido | | L | T | F | G | D | V | V | A | V | |
| SEQ ID 10 | Variantes | | | M | | | | | | | L | |
| | | | | L | | | | | | | L | |
| | | | | | | E | | | | K | | |
| | | | I | | A | | I | I | A | E | | |
| | | | | | Y | P | K | L | Y | | | |
| | | | F | | | T | Y | T | H | | | |
| | | | K | | P | | N | | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| GFAP-001 | Código del péptido | | N | L | A | Q | D | L | A | T | V | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SEQ ID 11 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | | G | I | I | | E | |
| | | | L | | Y | P | K | | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| GPR56-002 | Código del péptido | | F | L | L | S | E | P | V | A | L |
| SEQ ID 12 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| GRI-001 | Código del péptido | | N | I | L | E | Q | I | V | S | V |
| SEQ ID 13 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | L | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IGF2BP3-001 | Código del péptido | | K | I | Q | E | I | L | T | Q | V |
| SEQ ID 14 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | L | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | K | |
| | | | I | | A | G | | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| MLC-001 | Código del péptido | | S | V | V | E | V | I | A | G | I |
| SEQ ID 15 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | L | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | | | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| NES-001 | Código del péptido | | G | L | Q | S | Q | I | A | Q | V |
| SEQ ID 16 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | | | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | | |
|-----------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | | | Y | | S | | V | | | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | | |
| NES-002 | Código del péptido | | S | L | Q | E | N | L | E | S | L | | | |
| SEQ ID 17 | Variantes | | | M | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | K | | | | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | | | | |
| | | | L | | Y | P | K | | Y | | | | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | | | | |
| | | | K | | P | | | | | | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| NES-003 | Código del péptido | | F | L | F | P | G | T | E | N | Q | | | |
| SEQ ID 18 | Variantes | | | M | | | | | | | L | | | |
| | | | | | | | | | | | L | | | |
| | | | | | | E | | | | K | | | | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | | | | |
| | | | L | | Y | | K | L | Y | | | | | |
| | | | | | | T | Y | | H | | | | | |
| | | | K | | P | | N | | | | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | | |
| NES-004 | Código del péptido | | N | L | A | E | E | L | E | G | V | | | |
| SEQ ID 19 | Variantes | | | M | | | | | | | L | | | |
| | | | | | | | | | | | L | | | |
| | | | | | | | | | | K | | | | |
| | | | I | | | G | I | I | A | E | | | | |
| | | | L | | Y | P | K | | Y | | | | | |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------|--------------------|----------|----------|----------|---|---|---|---|---|---|----------|
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| NLGN4X-001 | Código del péptido | | N | L | D | T | L | M | T | Y | V |
| SEQ ID 20 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| NR2E1-001 | Código del péptido | | K | I | I | S | E | I | Q | A | L |
| SEQ ID 21 | Variantes | | | M | | | | | | | |
| | | | | L | | | | | | | |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| NRCAM-001 | Código del péptido | | G | L | W | H | H | Q | T | E | V |
| SEQ ID 22 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |

ES 2 607 460 T3

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| PDPN-001 | Código del péptido | | T | L | V | G | I | I | V | G | V |
| SEQ ID 23 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | | | | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| TNC-001 | Código del péptido | | A | M | T | Q | L | L | A | G | V |
| SEQ ID 24 | Variantes | | | | | | | | | | L |
| | | | | L | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | | E | |
| | | | L | | Y | P | K | | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |
| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |

(cont.)

| | | Posición | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------|--------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TNC-002 | Código del péptido | | Q | L | L | A | G | V | F | L | A |
| SEQ ID 25 | Variantes | | | M | | | | | | | L |
| | | | | | | | | | | | L |
| | | | | | | E | | | | K | |
| | | | I | | A | G | I | I | A | E | |
| | | | L | | Y | P | K | L | Y | | |
| | | | F | | F | T | Y | T | H | | |
| | | | K | | P | | N | | | | |
| | | | M | | M | | F | | | | |
| | | | Y | | S | | V | | | | |
| | | | V | | R | | | | | | |

Es sabido que los péptidos que son presentados por MHC de clase II están compuestos por una «secuencia central» dotada de un secuencia de aminoácidos que se ajusta a cierto motivo específico del alelo de HLA y, opcionalmente, de extensiones N- y/o C-terminales que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, que se consideran irrelevantes para la interacción del péptido y todos o una parte de los clones de linfocitos T que reconocen la contrapartida natural). Las extensiones N y/o C-terminales pueden, por ejemplo, tener entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, respectivamente. Estos péptidos se pueden utilizar directamente para cargar las moléculas MHC de clase II o bien la secuencia se puede clonar en vectores de acuerdo con la descripción ofrecida abajo en la presente memoria. Dado que estos péptidos constituyen el producto final del procesamiento de péptidos más grandes en el interior de la célula, también pueden utilizarse péptidos más largos. Los péptidos descritos pueden tener cualquier tamaño, pero normalmente suelen tener un peso molecular inferior a 100.000, preferiblemente inferior a 50.000, más preferiblemente inferior a 10.000 y normalmente unos 5.000. En cuanto al número de residuos de aminoácidos, los péptidos descritos pueden tener menos de 1.000 residuos, preferiblemente menos de 500 residuos, más preferiblemente menos de 100, más preferiblemente menos de 100 y aún más preferiblemente entre 30 y 8 residuos.

También pueden resultar adecuados péptidos más largos, ya que péptidos 9-ámeros o 10-ámeros como los descritos en la anterior Tabla 2 adjuntas son preferidos para los péptidos de MHC de clase I, mientras que para los péptidos de MHC de clase II se prefieren 12-ámeros a 15-ámeros.

En el caso de los péptidos restringidos a MHC de clase II, la molécula MHC puede presentar varios péptidos distintos dotados de la misma secuencia central. Como la interacción con el linfocito T reconocedor (cooperador) depende de la secuencia central de 9 a 11 aminoácidos, el mismo clon de linfocito T (cooperador) puede reconocer varias variantes de longitud. Así pues para la carga directa de moléculas MHC de clase II se pueden usar diversas variantes de longitud de una secuencia de unión central sin necesidad de ningún procesamiento adicional ni recortes en los extremos N y C-terminal. En consecuencia, las variantes naturales o artificiales que estimulan la reacción cruzada de los linfocitos T con un péptido de la invención son a menudo variantes de longitud.

Si un péptido más largo de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos se utiliza directamente para unirse a una molécula MHC de clase II, es preferible que los residuos que flanquean la región de unión a HLA central sean residuos que no afecten sustancialmente a la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula MHC de clase II o presentar el péptido al linfocito T (cooperador). No obstante, como se ha indicado arriba, se apreciará que es posible usar péptidos más grandes, p. ej. los codificados por un polipéptido, ya que estos péptidos más grandes pueden ser fragmentados por células presentadoras de antígeno adecuadas. No obstante, en algunos casos se ha demostrado que las regiones que flanquean la secuencia central pueden influir en la unión del péptido a la molécula MHC de clase II o en la interacción del complejo dimérico MHC:péptido con el TCR en ambas direcciones en comparación con un péptido de referencia dotado de la misma secuencia central. Las estructuras terciarias intramoleculares del péptido (p. ej. bucles) normalmente reduce la afinidad hacia el MHC o el TCR. Las interacciones intermoleculares de las regiones flanqueantes con otras partes del MHC o del TCR aparte de la misma hendidura de unión al péptido pueden estabilizar la interacción. Esos cambios de afinidad pueden ser determinantes para que el péptido de MHC de clase II estimule de forma efectiva la respuesta de los linfocitos T

(cooperadores).

También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 10 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos o proteínas más largos 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.

El péptido 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 a un complejo MHC puede ser analizada mediante métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos en la bibliografía para diferentes alelos de MHC de clase II (p. ej. (Vogt et al., 1994; Malcherek et al., 1994; Manici et al., 1999; Hammer et al., 1995; Tompkins et al., 1993; Boyton et al., 1998)).

El péptido de la invención consiste de una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 10.

En una forma de realización de la presente invención, el péptido es 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 (Strubin, M. et al 1984).

Además, el péptido puede ser modificado aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas de MHC con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria más potentes. Los métodos para esa optimización de una secuencia de péptidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de 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.

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 NaCNBH₃.

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.

Adicionalmente, los péptidos descritos 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 descritos 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 descritos.

De manera similar, un péptido descrito puede ser modificado 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, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perfórmico 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 & Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

La modificación de proteínas y péptidos terapéuticos 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

fin de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

Se describe un péptido o variante, en que el péptido es modificado o incluye enlaces no peptídicos. En general, los péptidos y variantes (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando 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-fluorenilmetiloxycarbonilo (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 butiloxycarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en el de 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), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina 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 et al., 2004, 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 de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ACN, 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, Connecticut, 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., 1988). 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 retrovéricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido 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.º 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovéricos) 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.

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.

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.

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

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (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.

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 b-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos ANTI-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, Maryland, EE.UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, Maryland, EE.UU. (N.º 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.

5 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.

10 La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consume 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 la transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

20 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.

25 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.

30 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) (Small EJ et al 2006; Rini et al 2006).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un péptido, 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 puede ser preparado 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 en ensayos anteriores (Brunsvig et al 2006; Staehler et al 2007).

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 de clase I o II 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 Cuando se esté utilizando como antígeno un epítipo de MHC de clase II, los linfocitos T serán linfocitos cooperadores CD4-positivos, preferiblemente del tipo T_{H1}. Las moléculas MHC de clase II se pueden expresar en la superficie de cualquier célula adecuada. Preferiblemente la célula no debe expresar de forma natural moléculas MHC de clase II (de ser así, la célula tendrá que ser transfectada para que exprese dicha molécula). Si, en cambio, la célula expresa de forma natural moléculas MHC de clase II es preferible que sea defectuosa en los mecanismos de procesamiento o presentación de antígenos. De ese modo será posible que la célula que expresa la molécula MHC de clase II quede completamente cargada con el antígeno peptídico escogido antes de activar el linfocito T.

50 La célula presentadora de antígeno (o célula estimuladora) normalmente posee moléculas MHC de clase II en su superficie y es preferible que sea básicamente incapaz de cargar dicha molécula de MHC de clase II con el antígeno seleccionado. La molécula MHC de clase II puede cargarse fácilmente *in vitro* con el antígeno seleccionado.

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.

5 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.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Karre et al 1985.

10 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.

15 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 las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 25.

20 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 adhiriendo 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 avidéz 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.

35 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 chicharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

40 Los linfocitos T activados que están dirigidos contra los péptidos de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T activados obtenibles por 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.º 10.

45 Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interactuando 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.

55 En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD4-positivos conformes con la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales circundantes al tumor (células tumorales) (que en ocasiones también expresan MHC de clase II; (Dengjel et al., 2006)).

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.

5 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.

10 Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos en la materia y se pueden encontrar por ejemplo en (Rosenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1988; Dudley et al., 2002; Yee et al., 2002; Dudley et al., 2005); revisados en (Gattinoni et al., 2006) y (Morgan et al., 2006).

15 El péptido de la invención es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, puede ser utilizado como medicamento o en la fabricación de un medicamento. El péptido puede ser utilizado solo o combinado con otra molécula o moléculas descritas o con cualquier o cualesquier moléculas conocidas.

20 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
25 adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un portador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véanse WO 95/18145 y Longenecker et al. (1993)). El péptido también se puede etiquetar, o puede 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 CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los CTL CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así
30 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 los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

35 En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.º 10 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 y/o II. Preferentemente, al menos un péptido adicional tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID N.º 2 a 19 y las SEQ ID N.º 21 a 26.

40 El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en 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 en Pascolo S. 2006; Stan R. 2006, o A Mahdavi 2006. Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce
45 con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN 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 péptidos codificados por el ácido nucleico pueden
50 ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítomo que estimule los linfocitos T para el respectivo 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, ISCOMs, JuvImmune, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide

ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel[®], micropartículas de dextrano y PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribi, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej. MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Dupuis M et al 1998; Allison 1998). También se pueden usar citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF- α), 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.º 5.849.589, incorporada específicamente a la presente memoria en su integridad 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 et al. 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema 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 et al. 2006). 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 ARNdc como poli(I:C) y AmpliGen, ARN o ADN bacteriano sin CpG así como anticuerpos y moléculas pequeñas inactivoas como ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4 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 dSLIM, interferones alfa o beta, CpG7909, IC31, imiquimod, resiquimod, PeviT_{er}, ARN, tadalafilo, temozolomida y JuvImmune.

Los adyuvantes preferidos son dSLIM, BCG, OK432, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, interferón alfa, PeviT_{er} y JuvImmune o combinaciones de los anteriores.

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 la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en los factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), imiquimod y resiquimod.

En una 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.

5 La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del glioma y del cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de páncreas, carcinomas espinocelulares y neoplasias queratinocíticas de la piel, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y melanoma.

La presente invención incluye un equipo, que comprende:

(a) un envase que contiene una composición farmacéutica como el descrito arriba, en forma de solución o liofilizado;

10 (b) opcionalmente un segundo envase que contiene un diluyente o una solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y (c) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) 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.

15 Los equipos de la presente invención 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 kit y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto
20 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).
25

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.
30

Los equipos de la presente invención 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.

35 Preferiblemente, los equipos de la invención 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-angiogenia, 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
40 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.

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.
45

50 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 (entérica), 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.

55 Puesto que los péptidos derivados de BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM y PDPN se aislaron del glioblastoma, el medicamento de la invención debe utilizarse preferentemente para tratar ese tipo de cáncer.

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

Figura 1: Ejemplo de espectro de masas de IGF2BP3-001 que demuestra su presentación en la muestra GB6010 de tumor primario. Se llevó a cabo una cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas nanoESI con una mezcla de péptidos eluida de la muestra de glioblastoma GB6010. El cromatograma de masas de m/z 536,3238 \pm 0,001 Da, $z = 2$ muestra un pico de péptido en el tiempo de retención 49,89 min. B) El pico detectado en el cromatograma de masa a los 48,76 min reveló una señal de m/z 536,3239 en el espectro de EM. C) El espectro de masas resultante de la desintegración inducida por colisiones del precursor seleccionado m/z 536,3239 registrado en el experimento de CL-EM nanoESI en el tiempo de retención indicado confirmó la presencia de IGF2BP3-001 en la muestra tumoral GB6010. D) Para verificar la secuencia se registró el patrón de fragmentación del péptido de referencia sintético IGF2BP3-001 y se comparó con el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural mostrado en C.

La Figura 2a muestra los perfiles de expresión de ARNm de proteínas seleccionadas en muestras de tejidos normales y en 19 muestras de glioblastoma.

La Figura 2b muestra los perfiles de expresión de ARNm de proteínas seleccionadas en muestras de tejidos normales y en 19 muestras de glioblastoma.

La Figura 3 expone la inmunogenicidad *in vitro* de ejemplo de los TUMAP de clase I de IMA950

La Figura 4 muestra a título de ejemplo las afinidades de péptidos de HLA de clase I de la invención hacia el HLA-A*02.

20 Ejemplos

Ejemplo 1:

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

Muestras de tejido

Las muestras de tejido tumoral de pacientes fueron facilitadas por el Hôpital Cantonal Universitaire de Genève (Oncología Médica, Laboratorio de inmunología tumoral) y la Neurochirurgische Universitäts-Klinik de Heidelberg (Laboratorio de biología molecular). 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

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*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarsa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Métodos:

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase invertida (sistema Acquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido ($75\ \mu\text{m}$ de d.i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de $1,7\ \mu\text{m}$ (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 micro-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 preseleccionados 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 IGF2BP3-001 y su perfil de elución en el sistema UPLC.

Ejemplo 2

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

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.

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

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por dos centros clínicos (véase Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

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, California, EE.UU.). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. Cuatro voluntarios sanos donaron sangre de la que se extrajeron los leucocitos.

La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoraron con un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y con el RNA RNA6000 Pico Lab Chip 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, California, 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 de la presente invención que aparecen altamente sobreexpresados en el glioblastoma de la presente invención se muestran en la Fig. 2.

Ejemplo 3:

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I de IMA950

Para obtener información relativa a la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, llevamos a cabo análisis con una conocida plataforma de estimulación *in vitro* descrita por (Walter S., Herrgen L., Schoor O., Jung G., Wernet D., Buhning H.J., Rammensee H.G., 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). De este modo pudimos descubrir la inmunogenicidad notablemente elevada de 13 TUMAP restringidos por HLA-A*201 de la invención (detección en ≥ 50% de los CTL específicos de TUMAP de donantes analizados), lo cual demuestra que dichos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los que existen linfocitos T precursores CD8+ en el ser humano (Tabla 3).

Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con un complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos células mononucleares de sangre

periférica (PBMC) de capas leucocíticas HLA-A*02+ frescas por medio de un medio de separación en gradiente de densidad ordinario (PAA, Cölbe, Alemania). Las capas leucocíticas procedían del banco de sangre de Tubinga y del Katharinen hospital de Stuttgart. Las PBMC aisladas se incubaron hasta el día siguiente con medio para linfocitos T (TCM) para la sensibilización humana *in vitro*. El medio consistía en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAA, Cölbe, Alemania), penicilina 100 U/ml/estreptomina 100 µg/ml (Cambrex, Verviers, Bélgica), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Neustadt, Alemania) y gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Los linfocitos CD8+ se aislaron con un kit de selección positiva MACS para CD8+ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8+ obtenidos se incubaron hasta su uso en TCM suplementado con IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Chiron, Munich, 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., 2003) con pequeñas modificaciones. En suma, con el método descrito por (Altman et al., 1996) se sintetizaron moléculas recombinantes y biotiniladas de HLA-A*0201 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 et al., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,60 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los complejos pMHC usados como controles positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5) o A*0201/HBV-001 (FLPSDFPSV), 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 del pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad) o de 2 ng del relevante más 200 ng de MHC irrelevante (biblioteca de pMHC) (microperlas de baja 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 o 4 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3 o 4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, se llevarán a cabo análisis tetraméricos de los tetrameros de MHC fluorescentes (producidos del modo descrito por (Altman et al., 1996) más anticuerpo CD8-FITC del clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) en un citómetro FACSCalibur de cuatro colores (BD). Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis tetramérico se hizo con el programa FCS Express (De Novo Software). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ tetramero+ 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 por lo menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una estirpe de linfocitos T CD8+ específica después tras la estimulación (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetramero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetramero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de IMA950

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede 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 multímeros específicos de TUMAP. Los resultados de 13 péptidos de la invención se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de HLA clase I altamente inmunogénicos de la invención

| Antígeno | Donantes positivos / donantes analizados | Pocillos positivos / pocillos analizados |
|-------------|--|--|
| BCA-001 | 60% | 5% |
| BCA-002 | 75% | 35% |
| CLIP2-001 | 75% | 6% |
| CSP-001 | 100% | 57% |
| FABP7-001 | 100% | 27% |
| IGF2BP3-001 | 50% | 21% |

(cont.)

| Antígeno | Donantes positivos / donantes analizados | Pocillos positivos / pocillos analizados |
|-------------|--|--|
| NES-001 | 75% | 38% |
| NLGN4X-001 | 100% | 62% |
| NRCAM-001 | 86% | 39% |
| PDPN-001 | 60% | 11% |
| SLCO1C1-001 | 60% | 7% |
| TNC-001 | 60% | 30% |
| TNC-002 | 50% | 14% |

Ejemplo 4**Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I de la invención a HLA-A*0201**5 *Objetivo y resumen*

El objetivo del análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos de HLA de clase I a la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A*0201 ya que este es un importante parámetro del mecanismo de acción de los péptidos como parte de la inmunoterapia contra el cáncer. Las afinidades hacia el HLA-A*0201 variaron entre medias y altas en todos los péptidos restringidos a HLA de clase I de la invención analizados; las constantes de disociación se hallaron en el orden de las del péptido usado como control positivo HBV-001, un derivado del antígeno central del virus de la hepatitis B que posee una fuerte afinidad de unión por el alelo A*02. Estos resultados confirman la potente afinidad de unión de todos los péptidos de HLA de clase I de la presente invención.

Principio de la prueba

Los complejos estables de HLA/péptido constan de tres moléculas: cadena pesada de HLA, beta-2 microglobulina (b2m) y el ligando peptídico. La actividad de las moléculas de cadena pesada recombinantes y desnaturalizadas del HLA-A*0201 solas se puede conservar convirtiéndolas en equivalentes funcionales de «moléculas HLA-A*0201 vacías». Cuando se diluyen en un tampón acuoso que contiene b2m y un péptido adecuado, estas moléculas se pliegan con rapidez y con eficacia de un modo que depende totalmente del péptido. La disponibilidad de estas moléculas se utiliza en un ensayo ELISA para medir la afinidad de la interacción entre el péptido y la molécula HLA de clase I (Sylvester-Hvid et al., 2002).

Moléculas recombinantes y purificadas de HLA-A*0201 se incubaron con b2m y dosis escalonadas del péptido de interés. La cantidad de complejos de HLA plegados de novo/péptido se determinó con un ELISA cuantitativo. Las constantes de disociación (valores KD) se calcularon con una curva patrón trazada con disoluciones de un complejo HLA/péptido de calibración.

25 *Resultados*

Los resultados se muestran en la Figura 4. Cuanto más bajo es el valor de KD mayor es la afinidad hacia el HLA-A*0201. Todos los péptidos de la invención analizados mostraron afinidades potentes hacia el HLA-A*0201 que rondaron el valor de la KD del péptido de control positivo HBV-001, poseedor de una potente afinidad de unión para con el alelo A*02. Por tanto, todos los TUMAP de clase I de la invención tienen una afinidad de unión alta por las moléculas del MHC A*02.

Lista de referencias bibliográficas

- Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Imran AK (2007). Survivin expression correlates with unfavourable prognoses in invasive ductal carcinoma of the breast. *Med J Malaysia* 62, 6-8.
- al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J, Jothy S (1993). Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 71, 1954-1959.
- Angileri FF, Aguenouz M, Conti A, La TD, Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008). Nuclear factor-kappaB activation and differential expression of survivin and Bcl-2 in human grade 2-4 astrocytomas. *Cancer*.
- Apostolopoulos V, McKenzie IF (1994). Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev. Immunol.* 14, 293-309.
- Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini JC, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P (2006). Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur. J Immunol.* 36, 1805-1814.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000). Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci.* 20, 2427-2438.

- Bamias A, Chorti M, Deliveliotis C, Trakas N, Skolarikos A, Protogerou B, Legaki S, Tsakalou G, Tamvakis N, Dimopoulos MA (2003). Prognostic significance of CA 125, CD44, and epithelial membrane antigen in renal cell carcinoma. *Urology* 62, 368-373.
- 5 Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ (1989). Specific, Major Histocompatibility Complex-Unrestricted Recognition of Tumor-Associated Mucins by Human Cytotoxic T Cells. *PNAS* 86, 7159-7163.
- Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9, 71-79.
- Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P (2000). Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95, 3964-3969.
- 10 Berger M, Bergers G, Arnold B, Hammerling GJ, Ganss R (2005). Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 105, 1094-1101.
- Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC, . (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67, 2376-2380.
- 15 Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Kloog Y (2006). Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2337-2347.
- 20 Borset M, Seidel C, Hjorth-Hansen H, Waage A, Sundan A (1999). The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leuk. Lymphoma* 32, 249-256.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.
- Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D (2004). Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol.* 26, 177-181.
- 25 Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM (1998). Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice. *Int. Immunol.* 10, 1765-1776.
- 30 Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR (1997). Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol.* 182, 347-355.
- Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W (1999a). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
- 35 Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W (1999b). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W (2000). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96, 3102-3108.
- 40 Browner MF, Smith WW, Castelhana AL (1995). Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry* 34, 6602-6610.
- Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol* 1, 459-468.
- Cao Y, Karsten U, Zerban H, Bannasch P (2000). Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. *Virchows Arch.* 436, 119-126.
- 45 Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F, Belli F, Mezzanzanica D, Costa A, Andreola S, Leo E, Parmiani G, Castelli C (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 63, 4507-4515.
- Castellino F, Huang AY, tan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890-895.

- CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006.
Ref Type: Internet Communication
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002). Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20, 1063-1068.
- 5 Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, O'Hanlon TP (2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. *Hum. Immunol.* 65, 1211-1223.
- Cheever MA, Chen W, Disis ML, Takahashi M, Peace DJ (1993). T-cell immunity to oncogenic proteins including mutated ras and chimeric bcr-abl. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 690, 101-112.
- 10 Chen X, Higgins J, Cheung ST, Li R, Mason V, Montgomery K, Fan ST, van de RM, So S (2004). Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod. Pathol.* 17, 1198-1210.
- Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A (2006). Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol.* 176, 2730-2738.
- Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- 15 Dazzi C, Cariello A, Giannini M, Del DM, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De GU, Marangolo M (2000). A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.
- De VL, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 235-271.
- 20 Delsol G, Al ST, Gatter KC, Gerdes J, Schwarting R, Caveriviere P, Rigal-Huguet F, Robert A, Stein H, Mason DY (1988). Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas. Diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am. J. Pathol.* 130, 59-70.
- Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S (2006). Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 12, 4163-4170.
- 25 Denys H, De WO, Nusgens B, Kong Y, Sciot R, Le AT, Van DK, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, Cassiman JJ (2004). Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br. J Cancer* 90, 1443-1449.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909-2915.
- 30 Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, . (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147-154.
- Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.
- 35 Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van WC (2001). 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, 5911-5918.
- Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C, Kane JP (2001). Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J. Lipid Res.* 42, 620-630.
- 40 Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, Kunitake ST, Naya-Vigne J, O'Connor PM, Malloy MJ, Kane JP (1997). Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J. Biol. Chem.* 272, 25576-25582.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- 45 Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 2346-2357.
- 50

- Duperray C, Klein B, Durie BG, Zhang X, Jourdan M, Poncelet P, Favier F, Vincent C, Brochier J, Lenoir G, . (1989). Phenotypic analysis of human myeloma cell lines. *Blood* 73, 566-572.
- Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 366, 34-43.
- 5 Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-749.
- Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM (1995). MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 145, 61-89.
- 10 Fischer J, Palmedo G, von KR, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
- Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8809-8814.
- 15 Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 125, 669-680.
- Fujita K, Denda K, Yamamoto M, Matsumoto T, Fujime M, Irimura T (1999). Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 80, 301-308.
- 20 Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GF, Webb CP (2001). Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10722-10727.
- Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-5589.
- 25 Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, Suyama T, Naya Y, Ito H, Nikaido T, Ishikura H (2004). Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J. Pathol.* 203, 551-558.
- Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, Matrisian LM (1994). Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J Biol Chem.* 269, 2032-2040.
- 30 Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393.
- 35 Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell J (1988). A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263, 12820-12823.
- Gerner EW, Meyskens FL, Jr. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4, 781-792.
- 40 Gherardi E, Stoker M (1991). Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells* 3, 227-232.
- Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol. Chem.* 283, 5188-5194.
- 45 Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, Taylor-Papadimitriou J (1989). A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer* 43, 1072-1076.
- Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8862-8867.
- 50

- Gong L, Jiang C, Zhang B, Hu H, Wang W, Liu X (2006). Adenovirus-mediated Expression of Both Antisense Ornithine Decarboxylase and S-adenosylmethionine Decarboxylase Induces G(1) Arrest in HT-29 Cells. *J Biochem. Mol. Biol* 39, 730-736.
- 5 Grumet M, Friedlander DR, Sakurai T (1996). Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 319-330.
- Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU (1994). Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol. Chem.* 269, 12142-12146.
- 10 Grunda JM, Nabors LB, Palmer CA, Chhieng DC, Steg A, Mikkelsen T, Diasio RB, Zhang K, Allison D, Grizzle WE, Wang W, Gillespie GY, Johnson MR (2006). Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol.* 80, 261-274.
- Gursky S, Olopade OI, Rowley JD (2001). Identification of a 1.2 Kb cDNA fragment from a region on 9p21 commonly deleted in multiple tumor types. *Cancer Genet. Cytogenet.* 129, 93-101.
- 15 Halaban R (1999). Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 333-343.
- Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasini P, Nagy ZA, Sinigaglia F (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp. Med* 181, 1847-1855.
- Hanada K, Yewdell JW, Yang JC (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.
- 20 Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, Landberg G (1999). Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 84, 268-272.
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW (1998). Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294, 309-321.
- 25 Heimberger AB, Hussain SF, Aldape K, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, Sampson JH. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529.* 20-6-2006.
- Herz C, Aumailley M, Schulte C, Schlotzer-Schrehardt U, Bruckner-Tuderman L, Has C (2006). Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281, 36082-36090.
- 30 Hwang ML, Lukens JR, Bullock TN (2007). Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. *J Immunol.* 179, 5829-5838.
- Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK (2003). Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int. J. Cancer* 106, 496-504.
- 35 Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Jarvinen TA, Liu ET (2006). Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 6, 579-602.
- 40 Jones LL, Margolis RU, Tuszyński MH (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevicin, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 182, 399-411.
- Jucker M, Gunther A, Gradl G, Fonatsch C, Krueger G, Diehl V, Tesch H (1994). The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma. *Leuk. Res.* 18, 7-16.
- 45 Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2003). Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 97, 1077-1083.
- Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P (2002). Culprit and victim -- DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol.* 3, 235-243.
- 50 Kennedy RC, Shearer MH, Watts AM, Bright RK (2003). CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 63, 1040-1045.

- Kloeker S, Major MB, Calderwood DA, Ginsberg MH, Jones DA, Beckerle MC (2004). The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 279, 6824-6833.
- 5 Kobayashi H, Omiya R, Ruiz M, Huarte E, Sarobe P, Lasarte JJ, Herraiz M, Sangro B, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Celis E (2002). Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 8, 3219-3225.
- Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57, 5391-5398.
- 10 Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Vasmataz G (2005). Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res.* 11, 5128-5139.
- Kraus S, Abel PD, Nachtmann C, Linsenmann HJ, Weidner W, Stamp GW, Chaudhary KS, Mitchell SE, Franke FE, Lalani e (2002). MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum. Pathol.* 33, 60-67.
- 15 Kurokawa Y, Matoba R, Nakamori S, Takemasa I, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M, Kato K (2004). PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 23, 135-141.
- Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, Stevanovic S (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* 22, 450-454.
- 20 Leontiou C, Lightowers R, Lakey JH, Austin CA (2003). Kinetic analysis of human topoisomerase IIalpha and beta DNA binding by surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* 554, 206-210.
- Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N (2002). Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 40, 450-457.
- 25 Lew DJ, Dulic V, Reed SI (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-1206.
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20, 8125-8135.
- Li H, Leung TC, Hoffman S, Balsamo J, Lilien J (2000). Coordinate regulation of cadherin and integrin function by the chondroitin sulfate proteoglycan neurocan. *J Cell Biol.* 149, 1275-1288.
- 30 Lin TS, Chiou SH, Wang LS, Huang HH, Chiang SF, Shih AY, Chen YL, Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Chou MC, Kuo SJ, Chow KC (2004). Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 12, 717-723.
- Littaua RA, Takeda A, Cruz J, Ennis FA (1992). Vaccinia virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.* 66, 2274-2280.
- 35 Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q (2006). Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 905-913.
- Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, Sette A (1997). The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159, 1383-1392.
- 40 Lo ML, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De RG, Altieri DC (2001). Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 249-254.
- Loden M, Stighall M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Ostlund H, Landberg G (2002). The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene* 21, 4680-4690.
- 45 Louhelainen J, Wijkstrom H, Hemminki K (2000). Initiation-development modelling of allelic losses on chromosome 9 in multifocal bladder cancer. *Eur. J. Cancer* 36, 1441-1451.
- Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.
- 50 Mach B, Steimle V, Martínez-Soria E, Reith W (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.

- Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, Gorunova L, Høglund M, Karhu R, Kallioniemi A (2002). Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 35, 353-358.
- Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A (1994). Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands. *J Immunol.* 153, 1141-1149.
- 5 Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp. Med* 189, 871-876.
- Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU (1996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 273-290.
- 10 Mark AS, Mangkornkanok M (1989). B-cell lymphoma marking only with anti-epithelial membrane antigen. *Cancer* 63, 2152-2155.
- Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B (2000). Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol.* 165, 6047-6055.
- Maulik G, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, Lin J, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, Salgia R (2002). Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 620-627.
- 15 Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 71, 2454-2460.
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci.* 19, 10778-10788.
- Mellai M, Caldera V, Patrucco A, Annovazzi L, Schiffer D (2008). Survivin expression in glioblastomas correlates with proliferation, but not with apoptosis. *Anticancer Res.* 28, 109-118.
- Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 366, 44-54.
- 25 Miyazaki K, Hattori Y, Umenishi F, Yasumitsu H, Umeda M (1990). Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* 50, 7758-7764.
- Mizuno K, Higuchi O, Ihle JN, Nakamura T (1993). Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 178-186.
- 30 Molenkamp BG, Vuylsteke RJ, van Leeuwen PA, Meijer S, Vos W, Wijnands PG, Scheper RJ, de Gruijl TD (2005). Matched skin and sentinel lymph node samples of melanoma patients reveal exclusive migration of mature dendritic cells. *Am. J Pathol.* 167, 1301-1307.
- Monajemi H, Fontijn RD, Pannekoek H, Horrevoets AJ (2002). The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 79, 539-546.
- Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, Aaronson SA (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ.* 9, 355-365.
- 40 Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science.*
- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog. Brain Res.* 137, 313-332.
- 45 Mori M, Barnard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K (1995). Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. *Cancer* 75, 1516-1519.
- Mortara L, Castellani P, Meazza R, Tosi G, De Lerma BA, Procopio FA, Comes A, Zardi L, Ferrini S, Accolla RS (2006). CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. *Clin Cancer Res.* 12, 3435-3443.
- Mott JD, Werb Z (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol* 16, 558-564.

- Nakamura T, Tabuchi Y, Nakae S, Ohno M, Saitoh Y (1996). Serum carcinoembryonic antigen levels and proliferating cell nuclear antigen labeling index for patients with colorectal carcinoma. Correlation with tumor progression and survival. *Cancer* 77, 1741-1746.
- 5 Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501-504.
- Napolitano M, Keime-Guibert F, Monjour A, Lafitte C, Ameri A, Cornu P, Broet P, Delattre JY (1999). Treatment of supratentorial glioblastoma multiforme with radiotherapy and a combination of BCNU and tamoxifen: a phase II study. *J Neurooncol.* 45, 229-235.
- 10 Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.
- Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, Hayashi T, Hinoda Y, Imai K (1997). Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int. Immunol.* 9, 791-798.
- 15 Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 187-207.
- O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M (2003). Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr. Cancer Drug Targets.* 3, 131-152.
- 20 Ohara O, Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D, Ohira M, Seki N, Nomura N (1997). Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins. *DNA Res.* 4, 53-59.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Udaka K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13885-13890.
- 25 Penna A, Fowler P, Bertoletti A, Guilhot S, Moss B, Margolske RF, Cavalli A, Valli A, Fiaccadori F, Chisari FV, . (1992). Hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T-cell (CTL) response in humans: characterization of HLA class II-restricted CTLs that recognize endogenously synthesized HBV envelope antigens. *J Virol.* 66, 1193-1198.
- 30 Piesche M, Hildebrandt Y, Zettl F, Chapuy B, Schmitz M, Wulf G, Trumper L, Schroers R (2007). Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Hum. Immunol.* 68, 572-576.
- Pons E, Uphoff CC, Drexler HG (1998). Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk. Res.* 22, 797-804.
- 35 Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, Comoglio PM (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 13, 4600-4608.
- Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol* 27, 1-10.
- 40 Previsani N, Lavanchy D (2002). Hepatitis B. World Health Organization Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. 2002 WHO/CDS/CSR/LYO/2002. 2:Hepatitis B.
- Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT (2002). Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62, 589-596.
- 45 Qin Z, Blankenstein T (2000). CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 12, 677-686.
- Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T (2003). A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* 63, 4095-4100.
- 50 Quantin B, Murphy G, Breathnach R (1989). Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28, 5327-5334.

- Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int. J. Cancer* *88*, 726-732.
- 5 Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL (2000). 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*, 635-644.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* *50*, 213-219.
- Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- 10 Rammensee HG, Friede T, Stevanoviic S (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* *41*, 178-228.
- Rauch U, Feng K, Zhou XH (2001). Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol. Life Sci.* *58*, 1842-1856.
- 15 Rehermann B, Nascimbeni M (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 215-229.
- Retzler C, Gohring W, Rauch U (1996). Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Biol. Chem.* *271*, 27304-27310.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, . (1987). 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*, 889-897.
- 20 Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J Med* *319*, 1676-1680.
- Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* *56*, 481-506.
- 25 Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* *1155*, 357-371.
- Ruiz M, Kobayashi H, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Celis E, Sarobe P (2004). Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* *10*, 2860-2867.
- 30 Sablotzki A, Ebel H, Muhling J, Dehne MG, Nopens H, Giesselmann H, Hempelmann G (2000). Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.* *44*, 82-87.
- Sadler E, Klausegger A, Muss W, Deinsberger U, Pohla-Gubo G, Laimer M, Lanschuetzer C, Bauer JW, Hintner H (2006). Novel KIND1 gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement. *Arch. Dermatol.* *142*, 1619-1624.
- 35 Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St CB, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (2001). A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* *294*, 1343-1346.
- Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, Murakami Y (2004). Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol. Rep.* *12*, 47-52.
- 40 Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K (2007). Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol.* *82*, 193-198.
- Sakaguchi A, Kikuchi A (2004). Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci.* *117*, 1047-1054.
- 45 Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA (2002). Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* *104*, 105-109.
- Sato F, Abraham JM, Yin J, Kan T, Ito T, Mori Y, Hamilton JP, Jin Z, Cheng Y, Paun B, Berki AT, Wang S, Shimada Y, Meltzer SJ (2006). Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specific promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 465-471.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995). Scatter

- factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, Rammensee HG, Rieber EP (2000). Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60, 4845-4849.
- 5 Schoenberger SP, Toes RE, van de V, Offringa R, Melief CJ (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- 10 Shedlock DJ, Shen H (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D (1988). Isolation and Sequencing of a cDNA Coding for the Human DF3 Breast Carcinoma-Associated Antigen. *PNAS* 85, 2320-2323.
- Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187-195.
- 15 Smith GM, Strunz C (2005). Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. *Glia* 52, 209-218.
- Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB (2004). Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem.* 50, 1986-1993.
- 20 Sun JC, Bevan MJ (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.
- Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A (1994). Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J. Immunol.* 153, 2102-2109.
- 25 Takayama H, Larochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 701-706.
- Takayama H, LaRochelle WJ, Anver M, Bockman DE, Merlino G (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *PNAS* 93, 5866-5871.
- 30 Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS (2005). Expression of a novel apoptosis inhibitor-survivin in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 11, 4689-4692.
- Ten KM, van der Wal JB, Sluiter W, Hofland LJ, Jeekel J, Sonneveld P, van Eijck CH (2006). The role of superoxide anions in the development of distant tumour recurrence. *Br. J Cancer.*
- 35 Teofili L, Di Febo AL, Pierconti F, Maggiano N, Bendandi M, Rutella S, Cingolani A, Di RN, Musto P, Pileri S, Leone G, Larocca LM (2001). Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease. *Blood* 97, 1063-1069.
- Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE (1993). A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins. *J Immunol. Methods* 163, 209-216.
- 40 Tripathi A, Dasgupta S, Roy A, Sengupta A, Roy B, Roychowdhury S, Panda CK (2003). Sequential deletions in both arms of chromosome 9 are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22, 289-297.
- Troussard X, vet-Loiseau H, Macro M, Mellerin MP, Malet M, Roussel M, Sola B (2000). Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. *Hematol. J.* 1, 181-185.
- Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148, 225-232.
- 45 Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.
- Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S (2005). Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J Neurooncol.* 72, 231-238.

- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den EB, Knuth A, Boon T (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- van d, V, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M, Pals ST (1997). Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J. Exp. Med.* 185, 2121-2131.
- 5 Vasef MA, Brynes RK, Sturm M, Bromley C, Robinson RA (1999). Expression of cyclin D1 in parathyroid carcinomas, adenomas, and hyperplasias: a paraffin immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* 12, 412-416.
- Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der BP, Boon T, Van Den Eynde BJ (2004). An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 304, 587-590.
- 10 Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R (1994). Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol.* 153, 1665-1673.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, 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.
- 15 Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA (2005). Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int. J Cancer* 114, 19-31.
- Wang JC, Livingstone AM (2003). Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol.* 171, 6339-6343.
- Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 153, 1023-1034.
- 20 Weber RG, Rieger J, Naumann U, Lichter P, Weller M (2001). Chromosomal imbalances associated with response to chemotherapy and cytotoxic cytokines in human malignant glioma cell lines. *Int. J. Cancer* 91, 213-218.
- Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, Rammensee HG (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62, 5818-5827.
- 25 Weinstein EJ, Bourner M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazzarella R (2003). URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas. *Biochim. Biophys. Acta* 1637, 207-216.
- Wierecky J, Muller MR, Horger MS, Brugger W, Kanz L, Brossart P (2005). Induction of clinical and immunological responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccinations with peptide pulsed dendritic cells. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 23, 2507.
- 30 Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006). Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br. J Cancer* 94, 108-114.
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699.
- 35 Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, Haga Y, Murayama T, Ikei S, Kamei M, Takeno S, Kawahara K (2007). Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res.* 27, 2803-2808.
- Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002). 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, 16168-16173.
- 40 Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, Neish AS (2001). Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J. Pathol.* 158, 1639-1651.
- Zacharias U, Rauch U (2006). Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology. *J Cell Sci.* 119, 3456-3466.
- 45 Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J (1997). Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 57, 4570-4577.
- Zarnegar R, Michalopoulos GK (1995). The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell Biol.* 129, 1177-1180.
- Zeh HJ, III, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC (1999). High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol.* 162, 989-994.

Zhang B, Liu XX, Zhang Y, Jiang CY, Hu HY, Gong L, Liu M, Teng QS (2006). Polyamine depletion by ODC-AdoMetDC antisense adenovirus impairs human colorectal cancer growth and invasion in vitro and in vivo. *J Gene Med* 8, 980-989.

5 Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL (2005). Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* 104, 2775-2783.

Zhou YT, Guy GR, Low BC (2005). BNIP-2 induces cell elongation and membrane protrusions by interacting with Cdc42 via a unique Cdc42-binding motif within its BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. *Exp. Cell Res.* 303, 263-274.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> immatics biotechnologies GmbH
<120> Nueva inmunoterapia contra varios tumores incluidos tumores neuronales y cerebrales

<130> FB20372

<160> 26

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211>9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala
1 5

<210>2

25 <211>9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400>2

Lys Ile Met Glu Arg Ile Gln Glu Val
1 5

<210>3

30 <211>9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 3

Phe Leu Gly Asp Pro Pro Glu Lys Leu
1 5

<210>4

40 <211>9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ala Leu Trp Ala Trp Pro Ser Glu Leu
1 5

<210>5

45 <211>9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 5

ES 2 607 460 T3

Thr Leu Tyr Gly Met Leu Asn Thr Leu
 1 5
 <210>6
 <211>9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 Ser Leu Asn Glu Leu Arg Val Leu Leu
 1 5
 <210>7
 <211>9
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400>7
 Tyr Leu Ile Ala Gly Ile Ile Ser Leu
 1 5
 <210>8
 <211>9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8
 Lys Leu Gln Asp Glu Ala Tyr Gln Val
 1 5
 <210>9
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala
 1 5 10
 <210> 10
 <211>9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 Leu Thr Phe Gly Asp Val Val Ala Val
 1 5
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 Asn Leu Ala Gln Asp Leu Ala Thr Val
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

ES 2 607 460 T3

Phe Leu Leu Ser Glu Pro Val Ala Leu
 1 5
 <210> 13
 <211>9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13
 Asn Ile Leu Glu Gln Ile Val Ser Val
 1 5
 <210> 14
 <211>9
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
 1 5
 <210> 15
 <211>9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15
 Ser Val Val Glu Val Ile Ala Gly Ile
 1 5
 <210> 16
 <211>9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16
 Gly Leu Gln Ser Gln Ile Ala Gln Val
 1 5
 <210> 17
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 17
 Ser Leu Gln Glu Asn Leu Glu Ser Leu
 1 5
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18
 Phe Leu Phe Pro Gly Thr Glu Asn Gln Glu Leu
 1 5 10
 <210> 19
 <211>9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 19

ES 2 607 460 T3

| | | |
|----|--|-------------------------------------|
| | | Asn Leu Ala Glu Glu Leu Glu Gly Val |
| | | 1 5 |
| 5 | <210> 20 <211>9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 20 | |
| | | Asn Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val |
| | | 1 5 |
| 10 | <210>21 <211>9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 21 | |
| | | Lys Ile Ile Ser Glu Ile Gln Ala Leu |
| | | 1 5 |
| 15 | <210> 22 <211>9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 20 | <400> 22 | |
| | | Gly Leu Trp His His Gln Thr Glu Val |
| | | 1 5 |
| 25 | <210> 23 <211>9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 23 | |
| | | Thr Leu Val Gly Ile Ile Val Gly Val |
| | | 1 5 |
| 30 | <210> 24 <211>9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 35 | <400> 24 | |
| | | Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val |
| | | 1 5 |
| 40 | <210> 25 <211>9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 25 | |
| | | Gln Leu Leu Ala Gly Val Phe Leu Ala |
| | | 1 5 |
| 45 | <210> 26 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| 50 | <400> 26 | |

ES 2 607 460 T3

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Péptido consistente en la secuencia LTFGDVVAV (SEQ ID N.º 10).
2. El péptido conforme a la reivindicación 1, en que dicho péptido tiene la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en que dicho péptido es capaz de estimular linfocitos T CD8 o CD4.
3. El péptido conforme a la reivindicación 1 o 2, en que dicho 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.
5. Ácido nucleico, que codifica un péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Vector de expresión que expresa un ácido nucleico conforme a la reivindicación 5.
7. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso en medicina.
8. Célula hospedadora que comprende el ácido nucleico acorde con la reivindicación 5 o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, en que dicha célula hospedadora no es una célula madre embrionaria humana.
9. Método para producir un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método el cultivo de la célula hospedadora acorde con la reivindicación 8 que expresa el ácido nucleico acorde con la reivindicación 5 o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, y el aislamiento del péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
10. 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 y expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno o un constructo artificial que emula a una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
11. Linfocito T citotóxico (CTL) activado, producido con el método acorde con la reivindicación 10, que reconoce selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
12. Un número efectivo de linfocitos T citotóxicos (CTL) definido en la reivindicación 11 para el uso en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
13. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso en el tratamiento del cáncer o para el uso en la fabricación de una vacuna contra el cáncer.
14. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso acorde con la reivindicación 13, en que dicho cáncer se selecciona entre astrocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor neuroepitelial disembrionario, oligodendrogliomas, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomas mixtos, oligoastrocitomas, meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma, teratoma, gangliogliomas, gangliocitoma, gangliocitoma central, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET, p. ej. meduloblastoma, meduloepitelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, ependimoblastoma), tumores del parénquima pineal (p. ej. pineocitoma, pineoblastoma), tumores de células ependimales, tumores del plexo coroideo, tumores neuroepiteliales de origen incierto (p. ej. gliomatosis cerebri, astroblastoma), glioblastoma, tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales claras, cáncer de pulmón, SNC, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia, meduloblastoma, colon, recto, estómago, riñón, pulmón, páncreas, próstata, piel y otros tumores que muestran una sobreexpresión de la proteína de la que derivan los péptidos de la SEQ ID N.º 10.
15. El péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para el uso acorde con la reivindicación 13 o 14, en que dicha vacuna comprende además al menos un péptido adicional seleccionado entre las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 9, y las SEQ ID N.º 11 a SEQ ID N.º 26.
16. Kit que comprende un envase que contiene una composición farmacéutica que a su vez contiene el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el linfocito T citotóxico activado acorde con la reivindicación 11, en solución o en forma liofilizada.
17. El kit acorde con la reivindicación 16, que además comprende al menos otro péptido más seleccionado entre el grupo que consiste en los péptidos conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 9 y las SEQ ID N.º 11 a SEQ ID N.º 26.

Figura 1

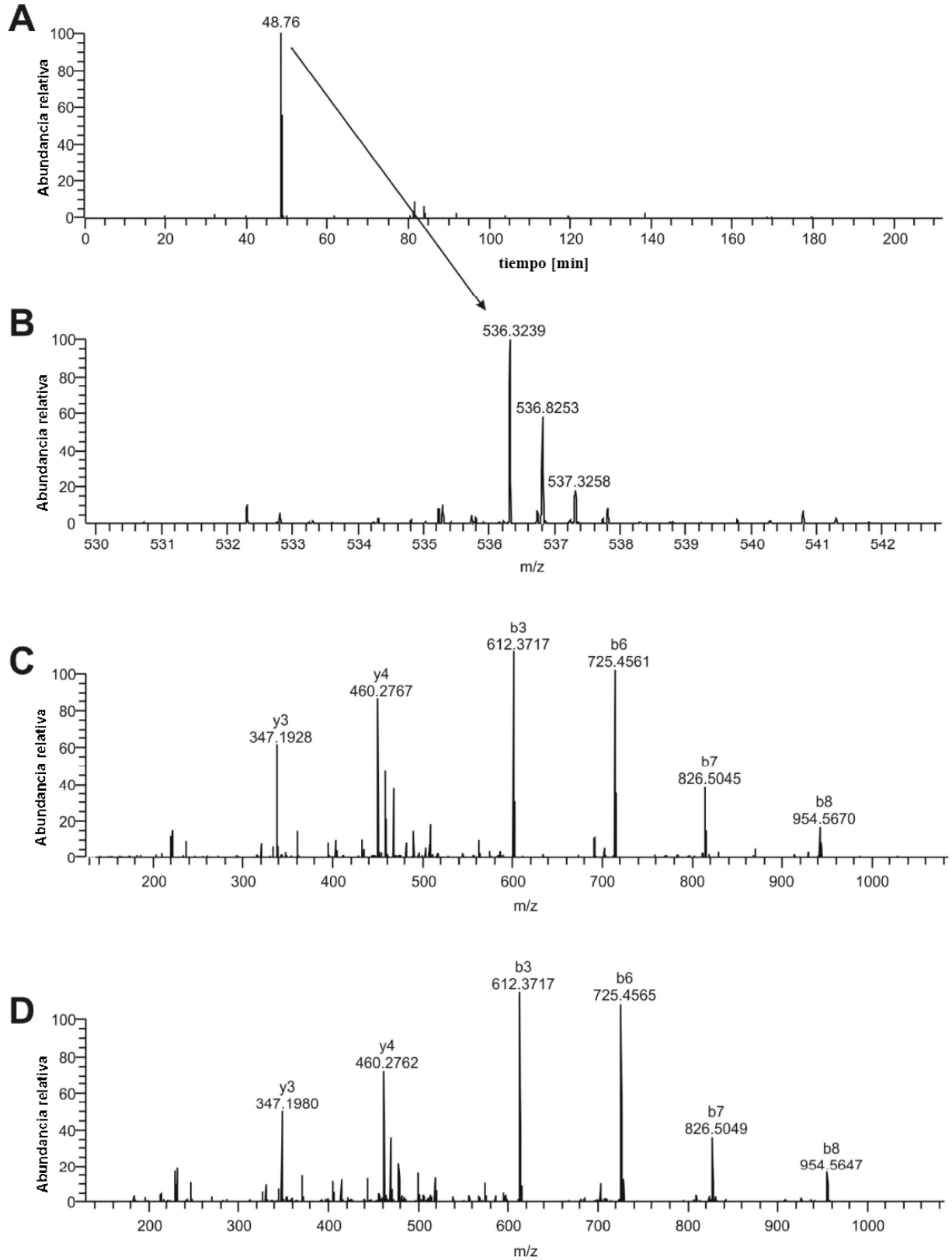
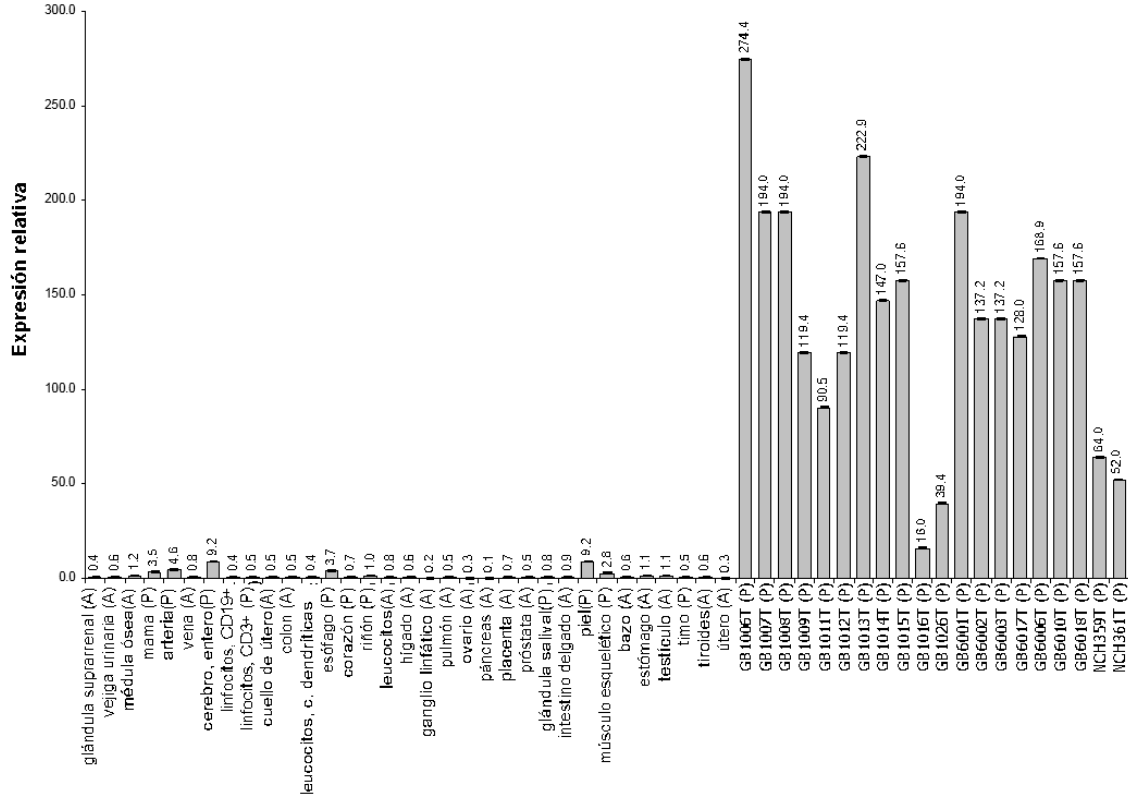


Figura 2a

a) FABP7 (ID conjunto de sondas: 205030_at)



b) NR2E1 (ID conjunto de sondas: 207443_at)

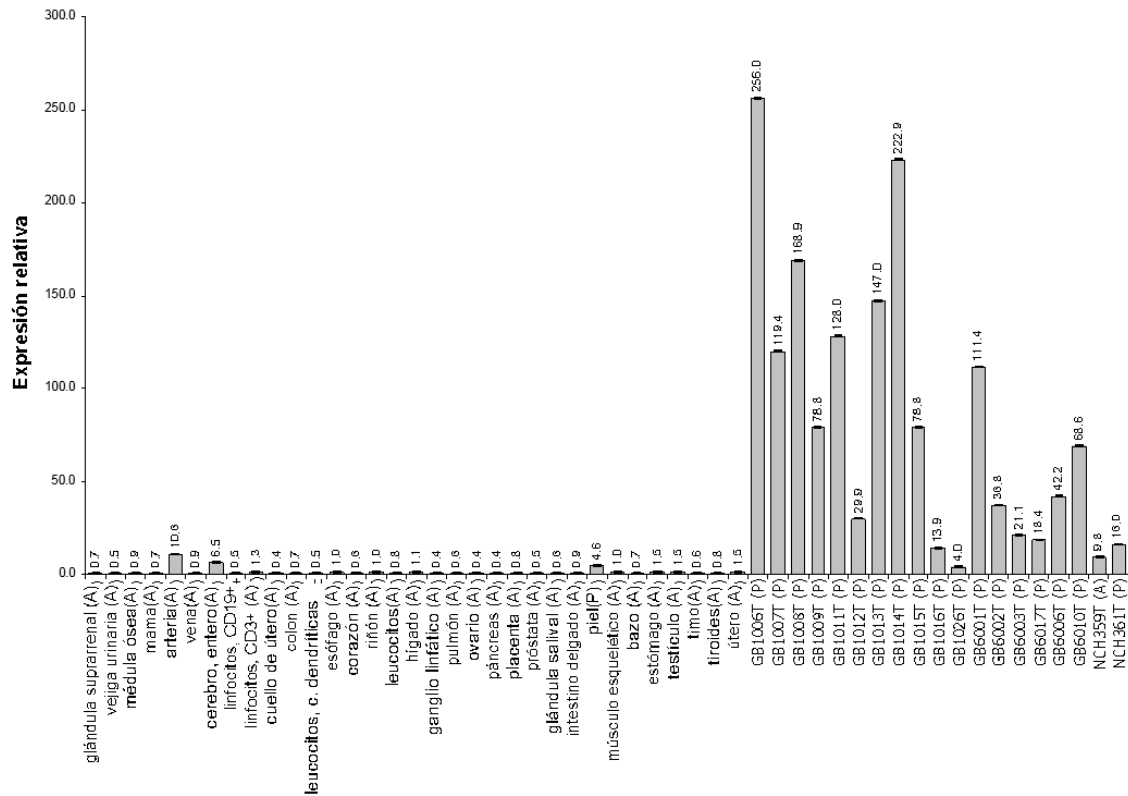
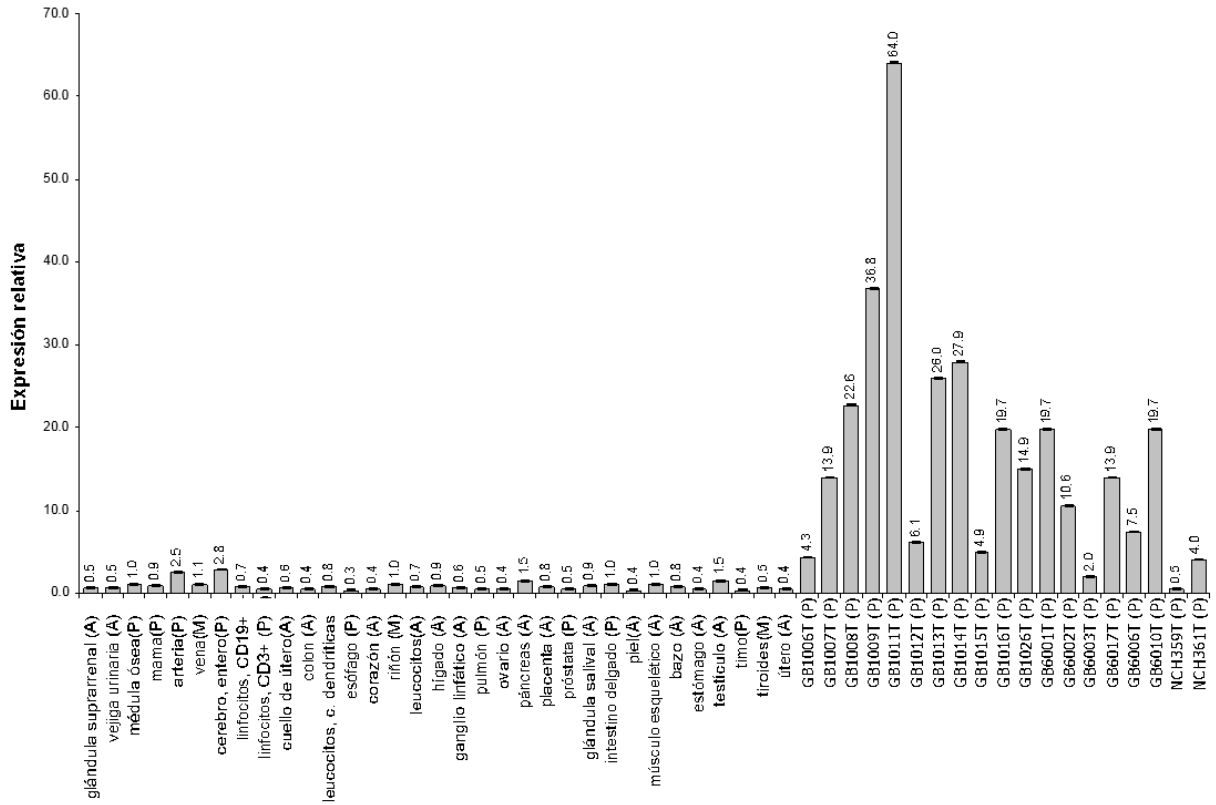


Figura 2b

a) SLCO1C1 (ID conjunto de sondas: 220460_at)



b) IGF2BP3 (ID conjunto de sondas: 216493_s_at)

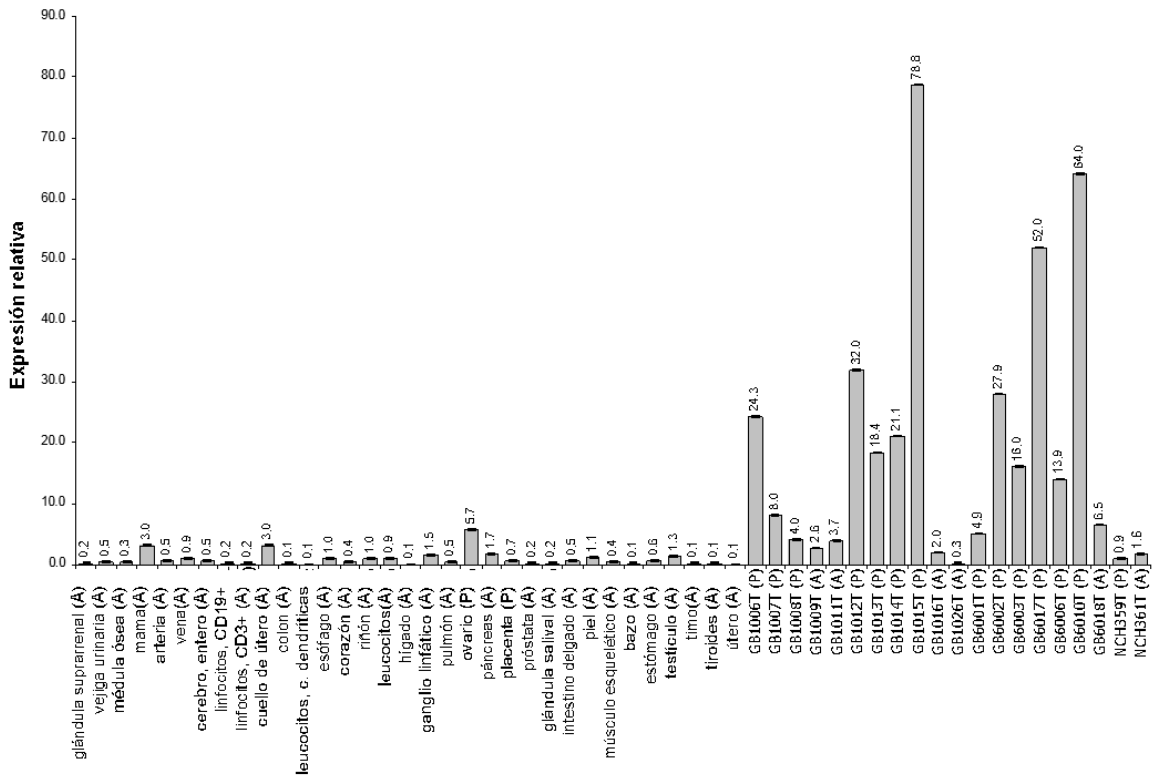


Figura 3

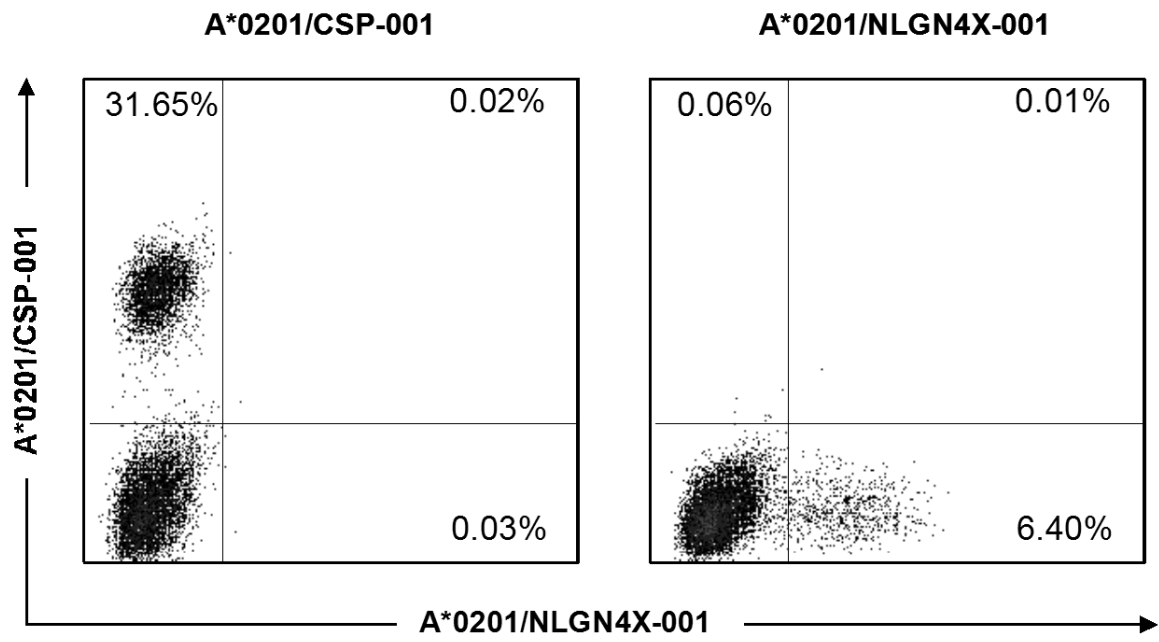


Figura 4

