(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 764 406**

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 7/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2014 PCT/EP2014/066755**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018805**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2014 E 14750175 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3030255**

(54) Título: **Nueva inmunoterapia contra varios tumores, como cáncer de pulmón, incluido NSCLC**

(30) Prioridad:

05.08.2013 GB 201313987
05.08.2013 US 201361862213 P
25.02.2014 GB 201403297

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

WEINSCHENK, TONI;
WALTER, STEFFEN;
FRITSCHE, JENS;
SONG, COLETTE y
SINGH, HARPREET

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

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, como cáncer de pulmón, incluido NSCLC

La presente invención se refiere a un péptido, ácidos nucleicos y células para usar en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la inmunoterapia para el cáncer. La presente invención se refiere, además, a un epítopo peptídico de células T citotóxicas (CTL) asociado a tumores, solo o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que sirve como ingrediente farmacéutico activo de composiciones vacunales que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales. La presente descripción se refiere a 67 secuencias peptídicas y sus variantes derivadas de moléculas de HLA clase I y HLA clase II de células tumorales humanas que pueden usarse en composiciones vacunales para provocar respuestas inmunitarias antitumorales.

Antecedentes de la invención

El cáncer de pulmón es la causa de la mayoría de las muertes relacionadas con cáncer tanto en hombres como en mujeres. A nivel mundial, el cáncer de pulmón es el cáncer más común en términos de incidencia y mortalidad. En 2008, hubo 1,61 millones de casos nuevos y 1,38 millones de muertes por cáncer de pulmón. Las tasas más altas se encuentran en Europa y América del Norte.

Desde 1987, más mujeres han muerto cada año por cáncer de pulmón que por cáncer de seno. Las tasas de mortalidad han seguido disminuyendo significativamente en los hombres entre 1991 y 2003 en aproximadamente 1,9 % por año. Las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón en las féminas se están acercando a una meseta después de aumentar continuamente durante varias décadas. Estas tendencias en la mortalidad por cáncer de pulmón reflejan la disminución de las tasas de tabaquismo en los últimos 30 años.

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), se esperan 230 000 nuevos casos de cáncer de pulmón y 160 000 muertes por cáncer de pulmón en 2013 en los EE. UU.

El cáncer de pulmón se clasifica clínicamente como de células pequeñas (13 %, SCLC) o de células no pequeñas (87 %, NSCLC) con fines de tratamiento. Generalmente tiene un mal pronóstico. De todas las personas con cáncer de pulmón, el 15 % sobrevive durante cinco años después del diagnóstico. La etapa suele estar avanzada en el momento del diagnóstico. En la presentación, el 30-40 % de los casos de NSCLC están en etapa IV y el 60 % de SCLC están en etapa IV.

Las opciones de tratamiento están determinadas por el tipo (células pequeñas o no pequeñas) y la etapa del cáncer e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias biológicas dirigidas como bevacizumab (AVASTIN®) y erlotinib (TARCEVA®). Para los cánceres localizados, la cirugía suele ser el tratamiento de elección. Estudios recientes indican que la supervivencia con cáncer de pulmón de células no pequeñas en etapa temprana mejora con la quimioterapia después de la cirugía. Debido a que la enfermedad generalmente se ha diseminado en el momento del diagnóstico, a menudo se usa radioterapia y quimioterapia, a veces en combinación con cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento de elección habitual para el cáncer de pulmón de células pequeñas; en este régimen, un gran porcentaje de pacientes experimentan remisión, que es duradera en algunos casos.

La supervivencia relativa de 1 año para el cáncer de pulmón ha aumentado ligeramente del 37 % en 1975-1979 al 42 % en 2002, en gran parte debido a las mejoras en las técnicas quirúrgicas y las terapias combinadas. Sin embargo, la tasa de supervivencia a los 5 años para todas las etapas combinadas es solo del 16 %. La tasa de supervivencia es del 49 % para los casos detectados cuando la enfermedad aún está localizada; sin embargo, solo el 16 % de los cánceres de pulmón se diagnostican en esta etapa temprana.

A pesar de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de una nueva opción de tratamiento eficaz y segura para los cánceres como el cáncer de pulmón, en particular el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNM), cánceres gástricos y tumores cerebrales de diferentes fenotipos, que mejoren el bienestar de los pacientes al no utilizar agentes quimioterapéuticos excesivos u otros agentes que puedan provocar efectos secundarios graves.

Guang-Hui Wang y otros (Oncology Lett, vol. 5, 21 de noviembre de 2012, páginas 544-548) describen niveles de expresión significativamente altos de la proteína 5 asociada a la remodelación de la matriz (MXRA5) en tejidos de cáncer colorrectal (CCR) recién cultivados. Sin embargo, los niveles de expresión de ARNm de MXRA5 no mostraron diferencias significativas entre los tejidos de CCR y sus tejidos normales correspondientes, y no se observó una correlación significativa entre la puntuación inmunorreactiva (IRS) y el valor de la cantidad relativa (RQ) correspondiente.

Del mismo modo, Buckanovich y otros (J Clin Oncology, vol. 25, núm. 7, 1 de marzo de 2007, páginas 852-861) encontraron que MXRA5 estaba sobreexpresada en el cáncer de ovario en comparación con los ovarios normales (por qRT-PCR) y está involucrada en la angiogénesis tumoral.

El documento US 2011/229504 se refiere a péptidos identificados en cáncer gastrointestinal y gástrico. MXRA5 no se menciona.

La presente invención emplea péptidos que estimulan el sistema inmunitario del paciente y actúan como agentes antitumorales de una manera no invasiva.

Resumen de la invención

En un primer aspecto de la presente invención, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 5 (MXRA5-001), en donde dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I.

Las siguientes tablas muestran los péptidos tal como se describen, sus respectivas SEQ ID NO, y las proteínas de origen prospectivas para estos péptidos. La SEQ ID No. 5 está de acuerdo con la invención. Todos los péptidos en las Tablas 1a, 1b y 1c se unen al alelo HLA A*02, los péptidos en la Tabla 1d se unen a los alelos HLA-DR. Los péptidos en la tabla 1c también son útiles en el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer gástrico y/o glioblastoma.

Los péptidos de clase II en la tabla Id son útiles adicionalmente en el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer gástrico y otros cánceres que sobreexpresan o presentan en exceso MMP12 o POSTN.

Tabla 1a: Péptidos como se describen, SEQ ID No. 5 está de acuerdo con la invención

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
1	ABCA13-001	ILFEINPKL	ABCA13
2	MMP12-003	KIQEMQHFL	MMP12
3	ABCA13-002	ALDENLHQL	ABCA13
4	DST-001	NLIEKSIYL	DST
5	MXRA5-001	TLSSIKVEV	MXRA5
6	DST-002	KLDETNNTL	DST
7	CDK4-001	TLWYRAPEV	CDK4/ CDK6
8	HNRNPH-001	SMSGYDQVL	HNRNPH1, HNRNPH2
9	TANC2-001	ALMDKEGLTAL	TANC2
10	RNF213-001	VLSVVEVTL	RNF213
11	SLC34A2-001	VLLPVEVATHYL	SLC34A2
12	SMYD3-001	SLIEDLILL	SMYD3
13	AKR-001	YLIHFPVSV	AKR1C1, AKR1C2
14	RCN1-001	FQYDHEAFL	RCN1, RCN3
15	IL8-001	KLAVALLAA	IL8
16	P2RY6-001	TVIGFLLPFA	P2RY6
17	HUWE1-001	RLLGPSAAADILQL	HUWE1
18	VCAN-001	TLYPHTSQV	VCAN
19	DROSHA-001	AVVEFLTSV	DROSHA
20	VCAN-002	ALVDHTPYL	VCAN
21	PLEKHA8-001	AILDTLYEV	PLEKHA8
22	ACACA-001	FLIPIYHQV	ACACA
23	ITGA11-001	FLHHLEIEL	ITGA11
24	COL12A1-002	FLVDGSWSV	COL12A1
25	ELANE-001	GLYPDAFAPV	ELANE
26	SERPINB3-001	KLFGEKTYL	SERPINB3
27	KIF26B-001	TVAEVIQSV	KIF26B

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
28	ANKH-001	SISDVIAQV	ANKH
29	NXF1-001	RLEEDDGDVAM	NXF1
30	RGS4-001	KIYNEFISV	RGS4
31	GFPT2-001	AIDGNNHEV	GFPT2
32	CERC-001	KLSWDLIYL	CERCAM
33	GALNT2-001	ALLRTVVSV	GALNT2
34	HNRNPM-001	ALGAGIERM	HNRNPM
35	BNC1-001	VLFPNLKTV	BNC1
36	FKBP10-001	TLVAIVVGV	FKBP10
37	FZD-001	VLAPLFVYL	FZD1, FZD2, FZD7
38	ATP-001	SLHFLILYV	ATP2A1, ATP2A2
39	LAMC2-001	RLLDSVSRL	LAMC2
40	MXRA5-002	GLTDNIHLV	MXRA5
41	HSP-002	SILTIEDGIFEV	HSPA2, HSPA8
42	VPS13B-001	SLWGGDVVL	VPS13B
43	CSE1-001	ALFPHLLQPV	CSE1L
44	DPYSL4-001	NLLAEIHGV	DPYSL4
45	SEC61G-001	AIMGFIGFFV	SEC61G
46	ORMDL1-002	TLTNIIHNL	ORMDL1
47	PCNXL3-001	GVLENIFGV	PCNXL3
48	SNRNP20-001	GLIEIISNA	SNRNP200

Tabla 1b: Péptidos adicionales según se describe

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
49	SAMSN1-001	RLLJAAENFL	SAMSN1
50	STAT2-001	SLLPVDIRQYL	STAT2
51	CNOT1-001	YLAPFLRNV	CNOT1
52	SHMT2-001	ALERGYSL	SHMT2
53	JUNB-001	YLPHAPPFA	JUNB
54	TACC3-001	KLVEFDFLGA	TACC3
55	CNOT1-002	SLADFMQEV	CNOT1
56	RAD54B-001	SLYKGLLSV	RAD54B
57	EEF2-002	GLAEDIDKGEV	EEF2
58	CCNA2-001	SLIDADPYL	CCNA2
59	NET1-001	ILVSWLPRL	NET1
60	C11orf24-001	VVDKTLLLV	C11orf24
61	RCC1-001	TLISRLPAV	RCC1
62	MAGEF1-001	ILFPDIIARA	MAGEF1

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
63	NCAPD2-001	SLAGDVALQQL	NCAPD2
64	C12orf44-001	AMLAVLHTV	C12orf44
65	HERC4-001	KVLEILHRV	HERC4

Tabla 1c: Péptidos adicionales que también se sobreexpresan en glioblastoma y/o cáncer gástrico

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
66	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3
67	CDC6-001	ILQDRLNQV	CDC6
68	FAP-003	YVYQNNIYL	FAP
69	WNT5A-001	AMSSKFFLV	WNT5A
70	TPX2-001	KILEDVVGV	TPX2
71	HMMR-001	KLLEYIEEI	HMMR
72	ADAM8-001	KLLTEVHAA	ADAM8
73	COL6A3-002	FLLDGSANV	COL6A3
74	THY1-001	SLLAQNTSWLL	THY1
75	DIO2-001	ALYDSVILL	DIO2

Tabla Id: Péptidos de MHC clase II según se describe

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	MMP12
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	POSTN

Tabla 1e: Péptidos adicionales según se describe con una abundancia adicional en otros cánceres

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
78	SLI-001	SLYDNQITTV	SLIT1, SLIT2
79	TLX3-001	SLAPAGVIRV	TLX3
80	CEP192-001	SLFGNSGILENV	CEP192
81	ANKS1A-001	ALYGRLEVV	ANKS1A
82	CEP250-002	ALWEKNTHL	CEP250
83	MDN1-001	ALANQKLYSV	MDN1
84	OLFM1-001	ILMGTELTQV	OLFM1
92	NEFH-001	HLLEDIAHV	NEFH

Tabla If: Otros péptidos según se describe con una abundancia adicional en otros tipos de cáncer

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
85	BUB1B-001	KIVDFSYSV	BUB1B
86	PI4KA-001	AMATESILHFA	PI4KA
87	AURKB-001	RVLPPSALQSV	AURKB

SEQ ID NO:	Código del péptido	Secuencia	Proteína(s) de origen
88	SLC3A2-001	SLLESNKDLLL	SLC3A2
89	IFT81-001	ALASVIKEL	IFT81
90	COG4-001	SLVAVELEKV	COG4
91	NCBP1-001	AMFENFVSV	NCBP1

La presente invención se refiere, además, al péptido de acuerdo con la presente invención, en donde dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, al péptido de acuerdo con la presente invención, en donde dicho péptido es parte de una proteína de fusión y está fusionado a los aminoácidos N-terminales de la cadena invariante de HLA-DR asociada al antígeno (Ii), o está fusionado a (o en la secuencia de) un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico para células dendríticas.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica el péptido de acuerdo con la presente invención.

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

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

La presente invención se refiere, además, a un péptido de acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión de acuerdo con la presente invención para su uso en medicina.

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos de acuerdo con la presente invención, y a métodos para fabricarlos.

La presente invención se refiere, además, a receptores de células T (TCR), en particular a TCR solubles (sTCR), de acuerdo con la presente invención, y a métodos para fabricarlos.

La presente invención se refiere, además, a una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector de expresión como se describió anteriormente.

La presente invención se refiere, además, a la célula huésped de acuerdo con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, a la célula huésped de acuerdo con la presente invención en donde la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

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

La presente invención se refiere, además, a un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos activados (CTL), el método comprende poner en contacto los CTL in vitro con moléculas de MHC clase I humana cargadas con antígeno, expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dicho CTL de una manera específica de antígeno, en donde dicho antígeno es cualquier péptido de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al método de acuerdo con la presente invención, en donde el antígeno se carga en moléculas de MHC clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada al poner en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método de acuerdo con la presente invención, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID No. 5.

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

La presente invención describe, además, un método para matar células objetivo en un paciente cuyas células objetivo expresan aberrantemente un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, el método comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de linfocitos T citotóxicos (CTL) de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al uso del péptido de acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, un vector de expresión de acuerdo con la presente invención, una célula de acuerdo con la presente invención o un linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere, además, a un uso de acuerdo con la presente invención, en donde dicho cáncer se selecciona de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer gástrico y glioblastoma.

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del huésped. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha aumentado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del huésped para intervenir en el crecimiento tumoral. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar los brazos humoral y celular del sistema inmunitario para la inmunoterapia contra el cáncer.

Los elementos específicos de la respuesta inmunitaria celular pueden reconocer y destruir específicamente las células tumorales. El aislamiento de células T citotóxicas (CTL) de las poblaciones de células infiltrantes de tumores o de sangre periférica sugiere que estas células juegan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Las células T CD8 positivas en particular, que reconocen moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que portan péptidos generalmente de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o productos ribosomales defectuosos (DRIPS) que se encuentran en el citosol, juegan un papel importante en esta respuesta. Las moléculas de MHC del ser humano también se designan como antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Hay dos clases de moléculas MHC: moléculas MHC clase I que se pueden encontrar en la mayoría de las células que tienen un núcleo. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y una microglobulina beta-2 (receptores MHC clase I) o una cadena alfa y una beta (receptores MHC clase II), respectivamente. Su conformación tridimensional da como resultado un surco de unión, que se utiliza para la interacción no covalente con los péptidos. Los MHC clase I presentan péptidos que se producen por la escisión proteolítica de proteínas predominantemente endógenas, DRIP y péptidos más grandes. Las moléculas de MHC clase II se pueden encontrar predominantemente en células presentadoras de antígenos (APC) profesionales, y principalmente presentan péptidos de proteínas exógenas o de transmembrana que son absorbidas por las APC durante la endocitosis, y posteriormente son procesadas. Los complejos de péptidos y moléculas de MHC clase I son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos CD8 positivos que portan el TCR (receptor de células T) apropiado, mientras que los complejos de péptidos y moléculas de MHC clase II son reconocidos por células T cooperadoras CD4 positivas que portan el TCR apropiado. Se conoce que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una cantidad estequiométrica de 1:1:1.

Las células T cooperadoras CD4 positivas desempeñan un papel importante en la inducción y el mantenimiento de respuestas efectivas por parte de las células T citotóxicas CD8 positivas. La identificación de epítopos de células T CD4 positivas derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) es de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales (Kobayashi y otros, 2002; Qin y otros, 2003; Gnjatic y otros, 2003). En el sitio del tumor, las células T cooperadoras apoyan un entorno de citocinas amigable con CTL (Mortara y otros, 2006) y atraen células efectoras, por ejemplo, CTL, células NK, macrófagos, granulocitos (Hwang y otros, 2007).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas de MHC clase II se restringe principalmente a las células del sistema inmunitario, especialmente a las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos, células dendríticas. En pacientes con cáncer, sorprendentemente se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas de MHC clase II (Dengjel y otros, 2006).

En modelos animales de mamíferos, por ejemplo, ratones, se demostró que incluso en ausencia de células efectoras CTL (es decir, linfocitos T CD8 positivos), las células T CD4 positivas son suficientes para inhibir la manifestación de tumores mediante la inhibición de la angiogénesis por secreción de interferón gamma (IFNy).

Además, se demostró que las células T CD4 positivas que reconocen péptidos de antígenos asociados a tumores presentados por moléculas HLA clase II pueden contrarrestar la progresión tumoral mediante la inducción de respuestas de anticuerpos (Ab).

A diferencia de los péptidos asociados a tumores que se unen a moléculas de HLA clase I, hasta la fecha solo se ha descrito un pequeño número de ligandos de clase II de antígenos asociados a tumores (TAA).

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas de HLA clase II generalmente se limita a las células del sistema inmunitario, no se consideró posible la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios. Sin

embargo, Dengjel y otros tuvieron éxito en la identificación de varios epítopos de MHC Clase II directamente de tumores (documentos WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel y otros, 2006).

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, es decir, sus epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todas las clases de proteínas, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que se expresan y, en comparación con las células no alteradas del mismo origen, están reguladas positivamente en las células del tumor respectivo.

Dado que ambos tipos de respuesta, dependiente de CD8 y de CD4, contribuyen de manera conjunta y sinérgica al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumores reconocidos por CTL CD8+ (ligando: molécula MHC clase I + epítopo peptídico) o por células T cooperadoras CD4 positivas (ligando: molécula MHC clase II + epítopo peptídico) es importante en el desarrollo de vacunas tumorales.

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

En la reacción inmunitaria dependiente de MHC clase I, los péptidos no solo tienen que poder unirse a ciertas moléculas de MHC clase I que son expresadas por las células tumorales, sino que también deben ser reconocidos por las células T que tienen receptores de células T específicos (TCR).

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, es decir, sus epítopos, pueden ser moléculas derivadas de todas las clases de proteínas, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que se expresan y, en comparación con las células no alteradas del mismo origen, están reguladas positivamente en las células del tumor respectivo.

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

a) Antígenos de cáncer de testículo: los primeros TAA identificados que pueden ser reconocidos por las células T pertenecen a esta clase, que originalmente se denominó antígenos de cáncer de testículo (CT) debido a la expresión de sus miembros en tumores humanos histológicamente diferentes y, entre tejidos normales, solo en espermatocitos/espermatogonias de testículos y, ocasionalmente, en placenta. Dado que las células de los testículos no expresan moléculas HLA clase I ni II, las células T en los tejidos normales no pueden reconocer estos antígenos y, por lo tanto, pueden considerarse inmunológicamente específicos del tumor. Ejemplos bien conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE o NY-ESO-1.

b) Antígenos de diferenciación: los tumores y el tejido normal del que surgió el tumor comparten estos TAA; la mayoría se encuentran en melanomas y melanocitos normales. Muchas de estas proteínas relacionadas con el linaje de melanocitos están involucradas en la biosíntesis de melanina y, por lo tanto, no son específicas del tumor pero, sin embargo, se usan ampliamente para la inmunoterapia contra el cáncer. Los ejemplos incluyen, entre otros, tirosinasa y Melan-A/MART-1 para melanoma o PSA para cáncer de próstata.

c) TAA sobreexpresados: se han detectado genes que codifican TAA ampliamente expresados en tipos de tumores histológicamente diferentes, así como en muchos tejidos normales, generalmente con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítopos procesados y potencialmente presentados por los tejidos normales estén por debajo del nivel umbral para el reconocimiento de células T, mientras que su sobreexpresión en células tumorales puede desencadenar una respuesta anticancerígena al romper la tolerancia previamente establecida. Ejemplos destacados para esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

d) Antígenos específicos de tumor: estos TAA únicos surgen de mutaciones de genes normales (como β-catenina, CDK4, etcétera). Algunos de estos cambios moleculares se asocian con la transformación y/o progresión neoplásica. Los antígenos específicos de tumor generalmente pueden inducir respuestas inmunitarias fuertes sin el riesgo de reacciones autoinmunitarias contra tejidos normales. Por otro lado, estos TAA en la mayoría de los casos solo son pertinentes para el tumor exacto en el que se identificaron y, por lo general, no se comparten entre muchos tumores individuales.

e) TAA que surgen de modificaciones postraduccionales anormales: estos TAA pueden surgir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores pero que, sin embargo, se asocian a los tumores por procesos postraduccionales principalmente activos en tumores. Los ejemplos para esta clase surgen de patrones de glucosilación alterados que conducen a nuevos epítopos en tumores como para MUC1 o eventos como el empalme de proteínas durante la degradación que pueden ser específicos del tumor o no.

f) Proteínas oncovirales: estos TAA son proteínas virales que pueden desempeñar un papel fundamental en el proceso oncogénico y, debido a que son extraños (no de origen humano), pueden provocar una respuesta de células T. Ejemplos de estas proteínas son las proteínas del virus del papiloma humano tipo 16, E6 y E7, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

Para que los linfocitos T citotóxicos reconozcan a las proteínas como antígenos específicos o asociados al tumor, y para que estas sean utilizadas en una terapia, se deben cumplir requisitos previos particulares. El antígeno debe expresarse

principalmente por las células tumorales y no o en cantidades comparativamente pequeñas por los tejidos sanos normales o en otra forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales en comparación con los tejidos sanos normales. Además, es conveniente que el antígeno respectivo no solo esté presente en un tipo de tumor, sino también en altas concentraciones (es decir, números de copias del péptido respectivo por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados con tumor a menudo se derivan de proteínas directamente implicadas en la transformación de una célula normal a una célula tumoral debido a una función, por ejemplo, en el control del ciclo celular o la supresión de la apoptosis. Además, los objetivos en la vía descendente de las proteínas directamente causantes de una transformación pueden estar regulados positivamente y, por lo tanto, pueden estar asociados indirectamente con el tumor. Tales antígenos asociados indirectamente al tumor también pueden ser objetivos de un enfoque de vacunación (Singh-Jasuja y otros, 2004). En ambos casos, es esencial que los epítopos estén presentes en la secuencia de aminoácidos del antígeno, ya que dicho péptido ("péptido inmunogénico") que se deriva de un antígeno asociado a un tumor debería conducir a una respuesta de células T *in vitro* o *in vivo.*

Básicamente, cualquier péptido que pueda unirse a una molécula MHC puede funcionar como un epítopo de células T. Un requisito previo para la inducción de una respuesta de células T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de una célula T con un TCR correspondiente y la ausencia de tolerancia inmunológica para este epítopo en particular.

Por lo tanto, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una vacuna tumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA se basan en el uso de CTL que se puede aislar de pacientes o sujetos sanos, o se basan en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión de péptidos diferenciales entre tumores y tejidos normales.

Sin embargo, la identificación de genes sobreexpresados en tejidos tumorales o líneas celulares tumorales humanas, o expresados selectivamente en tales tejidos o líneas celulares, no proporciona información precisa sobre el uso de los antígenos que se transcriben a partir de estos genes en una terapia inmunitaria. Esto se debe a que solo una subpoblación individual de epítopos de estos antígenos es adecuada para dicha aplicación, ya que una célula T con un TCR correspondiente debe estar presente, y la tolerancia inmunológica para este epítopo en particular debe estar ausente o ser mínima. Por lo tanto, en una forma de realización muy preferida de la invención es importante seleccionar solo aquellos péptidos presentados de forma excesiva o selectiva contra los cuales se puede encontrar una célula T funcional y/o proliferativa. Dicha célula T funcional se define como una célula T, que tras la estimulación con un antígeno específico puede expandirse clonalmente y puede ejecutar funciones efectoras ("célula T efectora").

En el caso de los TCR y anticuerpos de acuerdo con la invención, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. Para los TCR y los anticuerpos de acuerdo con la invención, la presentación es el factor determinante.

Las células T cooperadoras juegan un papel importante en la organización de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos de células T cooperadoras que desencadenan una respuesta de células T cooperadoras del tipo T_{H1} apoyan las funciones efectoras de las células T asesinas CD8 positivas, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran complejos de péptidos asociados al tumor/MHC en sus superficies celulares. De esta manera, los epítopos de péptidos de células T cooperadoras asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como ingredientes farmacéuticos activos de composiciones vacunales que estimulan las respuestas inmunitarias antitumorales.

Proteína 5 asociada con la remodelación de la matriz (MXRA5)

MXRA5, también conocida como adlican, codifica un proteoglicano de adhesión y pertenece a un grupo de genes involucrados en la remodelación de la ECM y la adhesión célula-célula (Rodningen y otros, 2008). Aunque se desconoce la función de MXRA5 en el cáncer, se han identificado mutaciones somáticas en MXRA5 en tumores obtenidos de una variedad de tejidos como piel, cerebro, pulmón y ovario. La RT-PCR se realizó en hallazgos de sobreexpresión por micromatrices confirmados para adlican (MXRA5) en cánceres de colon en comparación con tejido de colon normal (13 tumores colorrectales y 13 tejidos normales) (Zou y otros, 2002). En un estudio reciente, la proteína 5 asociada a la remodelación de la matriz fue el segundo gen mutado con mayor frecuencia en NSCLC (el primero es TP53) (Xiong y otros, 2012).

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente y excepto que se indique lo contrario, todos los términos se definen como se indica a continuación.

El término "péptido" se usa en la presente para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes.

Además, el término "péptido" incluirá sales de una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferiblemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables.

El término "péptido" incluirá "oligopéptido". El término "oligopéptido" se usa en la presente para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes.

El término "los péptidos de la presente invención" incluirá el péptido que consiste en un péptido como se definió anteriormente de acuerdo con la SEQ ID No. 5.

El término "polipéptido" designa una serie de residuos de aminoácidos, conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crítica para la invención siempre que se mantengan los epítopos correctos. A diferencia de los términos péptido y oligopéptido, el término polipéptido se refiere a moléculas que contienen más de aproximadamente 30 residuos de aminoácidos.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es "inmunogénico" (y por lo tanto es un "inmunógeno" dentro de la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad de inducir una respuesta de células 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 células T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, oligopéptido y/o proteína que se usa para generar anticuerpos específicos o TCR contra él.

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

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

Tabla 2: Frecuencias de expresión F de HLA*A02 y los serotipos de HLA-DR más frecuentes. Las frecuencias se deducen de las frecuencias de haplotipos G_f dentro de la población estadounidense adaptadas de Mori y otros (Mori y otros, 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-G_f)^2$. Las combinaciones de A*02 con ciertos alelos HLA-DR podrían enriquecerse o ser menos frecuentes de lo esperado que sus frecuencias individuales debido al desequilibrio de enlace. Para más detalles, consulte Chanock y otros (Chanock y otros, 2004).

	Frecuencias de expresión de los serotipos HLA*02 y HLA-DR en subpoblaciones de Norteamérica			
Alelo HLA	Americano caucásico	Afroamericano	Asiático americano	Latinoamericano
A*02	49,1 %	34,1 %	43,2 %	48,3 %
DR1	19,4 %	13,2 %	6,8 %	15,3 %
DR2	28,2 %	29,8 %	33,8 %	21,2 %
DR3	20,6 %	24,8 %	9,2 %	15,2 %
DR4	30,7 %	11,1 %	28,6 %	36,8 %
DR5	23,3 %	31,1 %	30,0 %	20,0 %
DR6	26,7 %	33,7 %	25,1 %	31,1 %
DR7	24,8 %	19,2 %	13,4 %	20,2 %
DR8	5,7 %	12,1 %	12,7 %	18,6 %
DR9	2,1 %	5,8 %	18,6 %	2,1 %

Por lo tanto, para fines terapéuticos y de diagnóstico, es muy conveniente un péptido que se una con una afinidad apropiada a varios receptores HLA clase II diferentes. Un péptido que se une a varias moléculas de HLA clase II diferentes se llama un ligando promiscuo.

Como se usa en la presente, 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 lo contrario, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, al híbrido de dicha secuencia con su complemento (ADN bicatenario) y al complemento de dicha secuencia. El término "región codificante" se refiere a esa porción de un gen que codifica de forma natural o normal el producto de expresión de ese gen en su entorno genómico natural, es decir, la región que codifica *in vivo* para el producto de expresión original del gen.

La región codificante puede ser de un gen no mutado ("normal"), mutado o alterado, o incluso puede ser de una secuencia de ADN o gen, totalmente sintetizado en el laboratorio utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica de síntesis de ADN.

El término "secuencia de nucleótidos" se refiere a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

La secuencia de nucleótidos que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser de origen natural o puede estar construida sintéticamente. En general, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas de esta invención se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y enlazadores oligonucleotídicos cortos, o de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar un gen sintético que puede expresarse en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos de regulación derivados de un operón microbiano o viral.

Como se usa en la presente, el término "un nucleótido que codifica (o codificante) para un péptido" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido que incluye codones de inicio y parada artificiales (artificiales) compatibles para el sistema biológico en el que se va a expresar la secuencia.

El término "producto de expresión" significa el polipéptido o proteína que es el producto de traducción natural del gen y cualquier equivalente de codificación de la secuencia de ácido nucleico que es el resultado de la degeneración del código genético y, por lo tanto, que codifica el (los) mismo(s) aminoácido(s).

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

El término "segmento de ADN" se refiere a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de ADN más grande, que se ha derivado de ADN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura, es decir, libre de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación del segmento y sus secuencias de nucleótidos componentes mediante métodos bioquímicos estándar, por ejemplo, mediante el uso de un vector de clonación. Dichos segmentos se proporcionan en forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido por secuencias internas no traducidas, o intrones, que típicamente están presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes posteriores al marco de lectura abierto, donde las mismas no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término "cebador" significa una secuencia corta de ácido nucleico que se puede aparear con una cadena de ADN y proporciona un extremo 3'-OH libre en el que una ADN polimerasa inicia la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

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

El término "aislado" significa que el material se separa de su entorno original (p. ej., el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y aún estar aislados porque dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos y los polipéptidos recombinantes o inmunogénicos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden estar en forma "purificada". El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, está destinado para una definición relativa, y puede incluir preparaciones que están altamente purificadas o preparaciones que están solo parcialmente purificadas, ya que los expertos en la técnica relevante entienden esos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una biblioteca de ADNc se han purificado convencionalmente a homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de partida o material natural a al menos un orden de magnitud, preferiblemente dos o tres órdenes, y con mayor preferencia cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente un polipéptido reivindicado que tiene una pureza preferiblemente de 99,999 %, o al menos 99,99 % o 99,9 %; e incluso convenientemente 99 % en peso o más.

Los ácidos nucleicos y los productos de expresión de polipéptidos descritos de acuerdo con la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen tales ácidos nucleicos y/o tales polipéptidos, pueden estar en "forma enriquecida". Como se usa en la presente, el término "enriquecido" significa que la concentración del material es al menos aproximadamente 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), ventajosamente 0,01 % en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 0,1 % en peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de aproximadamente 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % y 20 % en peso. Las secuencias, construcciones, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden estar ventajosamente en forma enriquecida o aislada.

El término "fragmento activo" significa un fragmento que genera una respuesta inmunitaria (es decir, tiene actividad inmunogénica) cuando se administra, solo u opcionalmente con un adyuvante adecuado, a un animal, como un mamífero,

por ejemplo, un conejo o un ratón, y también incluye un ser humano, tal respuesta inmunitaria toma la forma de estimular una respuesta de células T dentro del animal receptor, tal como un ser humano. Alternativamente, el "fragmento activo" también puede usarse para inducir una respuesta de células T *in vitro.*

Como se usa en la presente, los términos "porción", "segmento" y "fragmento", cuando se usan en relación con polipéptidos, se refieren a una secuencia continua de residuos, tales como residuos de aminoácidos, cuya secuencia forma un subconjunto de una secuencia más grande. Por ejemplo, si un polipéptido se sometiera a tratamiento con alguna de las endopeptidasas comunes, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarían porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido de partida. Cuando se usa en relación con polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

De acuerdo con la presente invención, el término "por ciento de identidad" o "porcentaje de identidad", cuando se refiere a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de la alineación de la secuencia a comparar (la "secuencia comparada") con la secuencia descrita o reivindicada (la" secuencia de referencia"). El por ciento de identidad se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

en donde C es la cantidad de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada sobre la longitud de alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, en donde
(i) cada base o aminoácido en la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineado correspondiente en la secuencia comparada y
(ii) cada espacio en la secuencia de referencia y
(iii) cada base o aminoácido alineado en la secuencia de referencia que es diferente de una base o aminoácido alineado en la secuencia comparada, constituye una diferencia y
(iiii) la alineación debe comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

y R es la cantidad de bases o aminoácidos en la secuencia de referencia a lo largo de la longitud de la alineación con la secuencia comparada con cualquier espacio creado en la secuencia de referencia que también se cuenta como una base o aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la cual el por ciento de identidad calculado anteriormente es aproximadamente igual o mayor que un por ciento de identidad mínimo especificado, entonces la secuencia comparada tiene el por ciento de identidad mínimo especificado con la secuencia de referencia aunque puedan existir alineaciones en las que el por ciento de identidad calculado anteriormente es menor que el por ciento de identidad especificado.

Los péptidos originales (no modificados) como se describen en la presente pueden modificarse mediante la sustitución de uno o más residuos en diferentes sitios, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se indica lo contrario.

Preferiblemente, esas sustituciones se encuentran al final de la cadena de aminoácidos. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora, por ejemplo, cuando un aminoácido se reemplaza por un aminoácido de estructura y características similares, como cuando un aminoácido hidrófobo se reemplaza por otro aminoácido hidrófobo. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos del mismo tamaño o naturaleza química o similar, como cuando la leucina se reemplaza por isoleucina. En estudios de variaciones de secuencia en familias de proteínas homólogas de origen natural, ciertas sustituciones de aminoácidos se toleran con mayor frecuencia que otras, y estas a menudo muestran correlación con similitudes en tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, y esta es la base para definir las "sustituciones conservadoras".

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

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro que tenga características similares pero que tenga un tamaño algo diferente, como el reemplazo de una alanina por un residuo de isoleucina. Los reemplazos altamente no conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por uno que sea polar, o incluso por uno de carácter básico. Sin embargo, tales sustituciones "radicales" no pueden descartarse como potencialmente ineficaces, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales podrían dar lugar a efectos fortuitos que de otra manera no serían predecibles a partir de principios químicos simples.

Por supuesto, tales sustituciones pueden involucrar estructuras distintas de los L-aminoácidos comunes. Por lo tanto, los D-aminoácidos podrían ser sustituidos por los L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en los péptidos antigénicos de la invención y aun así estar abarcados por la presente descripción. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no

estándar (es decir, grupos R distintos de los encontrados en los 20 aminoácidos comunes de proteínas naturales) también pueden usarse con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos de acuerdo con la presente invención.

Si se encuentra que las sustituciones en más de una posición dan como resultado un péptido con una actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor como se define a continuación, entonces se probarán las combinaciones de esas sustituciones para determinar si las sustituciones combinadas dan como resultado efectos aditivos o sinérgicos sobre la antigenicidad del péptido. Como máximo, no más de 4 posiciones dentro del péptido estarían simultáneamente sustituidas.

Los péptidos descritos pueden alargarse con hasta cuatro aminoácidos, es decir, 1, 2, 3 o 4 aminoácidos pueden agregarse a cualquier extremo en cualquier combinación entre 4:0 y 0:4.

Las combinaciones de los alargamientos descritos se pueden representar en la tabla 3:

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

Los aminoácidos para el alargamiento pueden ser los péptidos de la secuencia original de la proteína o cualquier otro aminoácido. El alargamiento se puede usar para mejorar la estabilidad o la solubilidad de los péptidos.

El término "respuesta de células T" significa la proliferación y activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo.* Para los CTL restringidos a MHC clase I, las funciones efectoras pueden ser la lisis de células objetivo que presentan péptidos pulsados, péptidos precursores o que presentan péptidos naturales, secreción de citocinas, preferiblemente interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido, secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptidos, o desgranulación.

Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido de SEQ ID No. 1 a SEQ ID No. 92 se prueban contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptidos a la que los péptidos sustituidos alcanzan la mitad del aumento máximo en la lisis con respecto al fondo no es más de aproximadamente 1 mM, preferiblemente no más de aproximadamente 1 µM, con mayor preferencia no más de aproximadamente 1 nM, y aún con mayor preferencia no más de aproximadamente 100 pM, y con la máxima preferencia no más de aproximadamente 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por los CTL de más de un individuo, al menos dos, y con mayor preferencia tres individuos.

Por lo tanto, los epítopos, tal como se describen, pueden ser idénticos a los epítopos de origen natural específicos del tumor o asociados al tumor o pueden incluir epítopos que difieren en no más de 4 residuos del péptido de referencia, siempre que tengan una actividad antigénica sustancialmente idéntica.

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del huésped. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha aumentado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del huésped para intervenir en el crecimiento tumoral. Actualmente se exploran diversos mecanismos para aprovechar los brazos humoral y celular del sistema inmunitario para la inmunoterapia contra el cáncer.

Los elementos específicos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer y destruir específicamente las células tumorales. El aislamiento de células T citotóxicas (CTL) de las poblaciones de células infiltrantes de tumores o de sangre periférica sugiere que estas células juegan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Las células T CD8 positivas en particular, que reconocen moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que porta péptidos, generalmente de 8 a 12 residuos derivados de proteínas o productos

ribosómicos defectuosos (DRIPS) ubicados en el citosol, juegan un papel importante en esta respuesta. Las moléculas de MHC del ser humano también se designan como antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Las moléculas de MHC clase I se pueden encontrar en la mayoría de las células que tienen un núcleo que presenta péptidos que resultan de la escisión proteolítica de proteínas principalmente endógenas, citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos más grandes. Sin embargo, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia en moléculas de MHC clase I. Esta vía no clásica de presentación en clase I se conoce como presentación cruzada en la literatura.

Dado que ambos tipos de respuesta, dependiente de CD8 y de CD4, contribuyen de manera conjunta y sinérgica al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumores reconocidos por CTL CD8 positivos (molécula MHC clase I) o por CTL CD4 positivos (molécula MHC clase II) es importante en el desarrollo de vacunas tumorales. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones de péptidos que contienen péptidos que se unen a complejos de MHC de cualquier clase.

Teniendo en cuenta los graves efectos secundarios y los gastos asociados con el tratamiento del cáncer, se necesitan desesperadamente mejores métodos de pronóstico y diagnóstico. Por lo tanto, existe la necesidad de identificar otros factores que representan biomarcadores para el cáncer en general y el cáncer de pulmón en particular. Además, existe la necesidad de identificar factores que puedan usarse en el tratamiento del cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular.

La presente invención proporciona un péptido que es útil en el tratamiento de cánceres/tumores, preferiblemente cánceres de pulmón, incluso con mayor preferencia carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) que presenta en exceso o exclusivamente el péptido de la invención. Se demostró por espectrometría de masas que este péptido es presentado de forma natural por moléculas HLA en muestras de cáncer de pulmón primario humano (véase el ejemplo 1 y la figura 1).

Se demostró que el gen/proteína fuente (también denominada "proteína de longitud completa" o "proteína subyacente") de la que se derivan los péptidos está muy sobreexpresada en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, y para las SEQ ID No. 66 a 75 de cáncer gástrico y glioblastoma en comparación con tejidos normales (ver el ejemplo 2 y la figura 2 para NSCLC) que demuestran un alto grado de asociación tumoral de los genes fuente. Además, los péptidos en sí mismos se presentan en gran exceso en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales (ver el ejemplo 3 y la figura 3).

Los péptidos unidos a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente los linfocitos T/células T. Las células T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, por ejemplo, las células de cáncer de pulmón que presentan los péptidos derivados.

Se ha demostrado que el péptido de la presente invención es capaz de estimular respuestas de células T y/o se presenta en exceso y, por lo tanto, puede usarse para la producción de anticuerpos y/o TCR, en particular sTCR, de acuerdo con la presente invención (ver el ejemplo 4 y la figura 4). Además, los péptidos cuando forman complejos con el MHC respectivo pueden usarse para la producción de anticuerpos y/o TCR, en particular sTCR, también de acuerdo con la presente invención. Los métodos respectivos son bien conocidos por la persona experta, y también se pueden encontrar en la literatura respectiva. Por lo tanto, el péptido de la presente invención es útil para generar una respuesta inmunitaria en un paciente mediante la cual las células tumorales pueden destruirse. Se puede inducir una respuesta inmunitaria en un paciente mediante la administración directa de los péptidos descritos o sustancias precursoras adecuadas (por ejemplo, péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifican estos péptidos) al paciente, idealmente en combinación con un agente que mejora la inmunogenicidad (es decir, un adyuvante). Se puede esperar que la respuesta inmunitaria que se origina a partir de dicha vacunación terapéutica sea altamente específica contra las células tumorales porque los péptidos objetivo de la presente invención no se presentan en tejidos normales en números de copias comparables, lo que evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias no deseadas contra células normales en el paciente.

Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente, "una sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado de los péptidos descritos en donde el péptido se modifica mediante la producción de sales de ácidos o bases del agente. Por ejemplo, las sales de ácido se preparan a partir de la base libre (por lo general en donde la forma neutra del fármaco tiene un grupo $-NH_2$ neutro) que implica la reacción con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para preparar sales de ácidos incluyen ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Por el contrario, la preparación de sales de bases de restos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan mediante el uso de una base farmacéuticamente aceptable tal 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 como

sales de ácido acético (acetatos), trifluoroacetatos o ácido clorhídrico (cloruros).

El péptido de la presente invención puede usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden usarse para terapia, dirigiendo las toxinas o sustancias radiactivas al tejido enfermo. Otro uso de estos anticuerpos puede ser dirigir radionucleidos al tejido enfermo con fines de adquisición de imágenes como PET. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la localización precisa de los tejidos enfermos.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es proporcionar un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I que forma complejos con un antígeno restringido a HLA, el método comprende: inmunizar un mamífero no humano modificado genéticamente que comprende células que expresan dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I con una forma soluble de una molécula MHC clase I en complejo con dicho antígeno restringido a HLA; aislar moléculas de ARNm a partir de las células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producir una biblioteca de presentación en fagos que muestra moléculas de proteínas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislar al menos un fago de dicha biblioteca de presentación en fagos, dicho al menos un fago presenta dicho anticuerpo que se une específicamente a dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I que forma complejos con dicho antígeno restringido a HLA.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I que forma complejos con un antígeno restringido a HLA, en donde el anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

Se describe un método para producir dicho anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I que forma complejos con un antígeno restringido a HLA, el método comprende: inmunizar un mamífero no humano modificado genéticamente que comprende células que expresan dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I con una forma soluble de una molécula MHC clase I en complejo con dicho antígeno restringido a HLA; aislar moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producir una biblioteca de presentación en fagos que presente moléculas de proteínas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislar al menos un fago de dicha biblioteca de presentación en fagos, dicho al menos un fago presenta dicho anticuerpo que puede unirse específicamente a dicho complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I que forma complejos con dicho antígeno restringido a HLA. Los métodos respectivos para producir tales anticuerpos y complejos mayores de histocompatibilidad clase I monocatenarios, así como otras herramientas para la producción de estos anticuerpos se describen en los documentos WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752 y Cohen CJ, Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. J Mol Recognit. Septiembre-octubre de 2003; 16 (5): 324-32; Denkberg G, Lev A, Eisenbach L, Benhar I, Reiter Y. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. J Immunol. 1 de septiembre de 2003; 171 (5): 2197-207; y Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, Tomaru U, Jacobson S, Reiter Y. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. J Immunol. 15 de abril de 2003; 170 (8): 4349-61.

Preferiblemente, el anticuerpo se une con una afinidad de unión de menos de 20 nanomolar, preferiblemente de menos de 10 nanomolar, al complejo, lo cual se considera "específico" en el contexto de la presente invención.

Un aspecto adicional de la invención es proporcionar un método para producir un receptor soluble de células T que reconoce un complejo péptido-MHC específico. Tales receptores solubles de células T pueden generarse a partir de clones específicos de células T, y su afinidad puede aumentarse mediante mutagénesis dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Con fines de selección del receptor de células T, se puede usar la presentación en fagos (documento US 2010/0113300, Liddy N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ, y otros. Monoclonal TCR- redirected tumor cell killing. Nat Med Jun de 2012; 18(6): 980-987). Con el fin de estabilizar los receptores de células T durante la presentación en fagos y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta pueden unirse, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro no originales, otros enlaces covalentes (receptor de células T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (ver Boulter JM, Glick M, Todorov PT, Baston E, Sami M, Rizkallah P, y otros, Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng, Sep de 2003; 16 (9): 707-711; Card KF, Price-Schiavi SA, Liu B, Thomson E, Nieves E, Belmont H, y otros, A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. Cancer Immunol Immunother Abril de 2004; 53 (4): 345-357; y Willcox BE, Gao GF, Wyer JR, O'Callaghan CA, Boulter JM, Jones EY, y otros, Production of soluble alphabeta T-cell receptor heterodimers suitable for biophysical analysis of ligand binding. Protein Sci, Nov de 1999; 8 (11): 2418-2423). El receptor de células T se puede unir a toxinas, fármacos, citocinas (ver el documento US 2013/0115191), dominios que reclutan células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., para ejecutar funciones particulares en las células objetivo. Además, podría expresarse en células T utilizadas para la transferencia adoptiva.

Se puede encontrar más información en los documentos WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. En el documento

WO 2012/056407A1 se describe una combinación de sTCR. Otros métodos para la producción se describen en el documento WO 2013/057586A1.

Para seleccionar péptidos presentados en exceso, se calcula un perfil de presentación que muestra la mediana de la presentación de la muestra, así como la variación de réplicas. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con una referencia de muestras de tejido normal. Cada uno de estos perfiles se puede consolidar después en una puntuación de presentación en exceso mediante el cálculo del valor de p de un modelo lineal de efectos mixtos (J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, Sarkar D., R Core team. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. 2008) que se ajusta para pruebas múltiples por la tasa de descubrimientos falsos (Y. Benjamini e Y. Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Serie B (Methodological), Vol.57 (Núm.1):289-300, 1995).

Para la identificación y la cuantificación relativa de ligandos de HLA mediante espectrometría de masas, se purificaron moléculas de HLA a partir de muestras de tejido congeladas por choque y se aislaron péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y las secuencias se identificaron mediante experimentos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) con ionización por nano-electrospray (nanoESI) en línea. Las secuencias de péptidos resultantes se verificaron mediante la comparación del patrón de fragmentación de TUMAP naturales registrados de las muestras de NSCLC con los patrones de fragmentación de péptidos de referencia sintéticos correspondientes de secuencias idénticas. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de tumores primarios, estos resultados proporcionan evidencia directa del procesamiento natural y la presentación de los péptidos identificados en el tejido tumoral primario obtenido de pacientes con NSCLC.

La línea de descubrimientos patentada XPRESIDENT® v2.1 (ver, por ejemplo, el documento US 2013-0096016) permite la identificación y selección de candidatos a vacunas de péptidos con presentación en exceso, relevantes, sobre la base de una cuantificación relativa directa de los niveles de péptidos restringidos a HLA en tejidos cancerosos en comparación con varios tejidos y órganos no cancerosos diferentes. Esto se logró mediante el desarrollo de la cuantificación diferencial sin etiquetas utilizando los datos adquiridos de LC-MS procesados por una línea de análisis de datos patentada, que combina algoritmos para la identificación de secuencias, agrupación espectral, conteo de iones, alineación del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

Se establecieron niveles de presentación que incluyen estimaciones de error para cada péptido y muestra. Se han identificado péptidos presentados exclusivamente en tejido tumoral y péptidos presentados en exceso en tejidos y órganos tumorales versus no cancerosos.

Los complejos HLA-péptido de 50 muestras de tejido tumoral de NSCLC congelado por choque se purificaron y los péptidos asociados con HLA se aislaron y analizaron por LC-MS.

Todos los TUMAP contenidos en la solicitud en cuestión fueron identificados con este enfoque en muestras de tumores primarios de NSCLC confirmando su presentación en NSCLC primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos de tumores de NSCLC y normales se cuantificaron mediante el uso de conteo iónico de datos de LC-MS sin etiqueta. El método supone que las áreas de señal de LC-MS de un péptido se correlacionan con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas de un péptido en diversos experimentos de LC-MS se normalizaron en función de la tendencia central, se promediaron por muestra y se combinaron en un gráfico de barras, denominado perfil de presentación. El perfil de presentación consolida diferentes métodos de análisis, como la búsqueda en bases de datos de proteínas, la agrupación espectral, la deconvolución del estado de carga (descarga) y la alineación del tiempo de retención y normalización.

La presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 5 (MXRA5-001), en donde dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos de acuerdo con la invención, en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos de acuerdo con la invención, en donde dicho péptido es parte de una proteína de fusión y está fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariante asociada al antígeno HLA-DR (Ii), o está fusionado a un anticuerpo (o dentro de este), tal como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico para células dendríticas.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica el péptido de acuerdo con la invención.

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

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa un ácido nucleico de acuerdo con la

invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido de acuerdo con la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de expresión de acuerdo con la invención para usar en medicina.

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

La presente invención se refiere, además, a la célula huésped de acuerdo con la invención que es una célula presentadora de antígenos

La presente invención se refiere, además, a la célula huésped de acuerdo con la invención en donde la célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido de acuerdo con la invención, el método comprende cultivar la célula huésped descrita y aislar el péptido de la célula huésped o su medio de cultivo.

La presente invención se refiere, además, a un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, el método comprende poner en contacto los CTL *in vitro* con moléculas de MHC clase I humano, cargadas con antígeno, que se expresan en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dicho CTL de una manera específica de antígeno, en donde dicho antígeno es cualquier péptido de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere, además, al método descrito, en donde dicho antígeno se carga en moléculas de MHC clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada al poner en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método de acuerdo con la invención, en donde la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID No. 5.

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

La presente invención describe, además, un método para matar células objetivo en un paciente cuyas células objetivo expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención, el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere, además, al uso de cualquier péptido de acuerdo con la invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención, un vector de expresión de acuerdo con la invención, una célula de acuerdo con la invención o un linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la invención para usar en el tratamiento contra el cáncer.

La presente invención se refiere, además, a un uso de acuerdo con la invención, en donde dicho uso es como una vacuna.

La presente invención se refiere, además, a un uso de acuerdo con la invención, en donde dicho cáncer se selecciona de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer gástrico y glioblastoma.

Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" se usan en la presente en un sentido amplio e incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o "completas", en el término "anticuerpos" también se incluyen fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de moléculas de inmunoglobulina, siempre que exhiban cualquiera de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador de cáncer de pulmón, suministro de una toxina a una célula de cáncer de pulmón que expresa un gen marcador de cáncer de pulmón a un nivel aumentado y/o inhibición de la actividad de un polipéptido marcador de cáncer de pulmón).

Siempre que sea posible, los anticuerpos de la invención se pueden adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también pueden generarse usando métodos bien conocidos. El experto en la materia entenderá que pueden usarse polipéptidos marcadores de cáncer de pulmón de longitud completa o fragmentos de estos para generar los anticuerpos de la invención. Un polipéptido que se usará para generar un anticuerpo de la invención puede purificarse parcial o totalmente de una fuente natural, o puede producirse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

Por ejemplo, un ADNc que codifica un ABCA13, MMP12, DST, MXRA5, CDK4, HNRNPH, TANC2, 1RNF213, SMYD3 y SLC34A2, o cualquier otro polipéptido de la SEQ ID No. 1 a la SEQ ID No. 65, y de la SEQ ID No. 76 a la SEQ ID No. 84 y el polipéptido de la SEQ ID No. 92, o un fragmento de este, puede expresarse en células procariotas (p. ej., bacterias) o células eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), después de lo cual la proteína recombinante puede

purificarse y usarse para generar una preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente al polipéptido marcador de cáncer de pulmón usado para generar el anticuerpo como se describe.

Un experto en la materia comprenderá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo con la especificidad y afinidad requeridas para su uso previsto (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, imagenología *in vivo*, terapia con inmunotoxinas). Los anticuerpos se prueban para determinar su actividad deseada mediante métodos conocidos, de acuerdo con el propósito para el cual se usarán los anticuerpos (por ejemplo, ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para obtener más orientación sobre la generación y las pruebas de anticuerpos, ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, nueva segunda edición 2013). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden analizar en ensayos ELISA, transferencias Western, tinción inmunohistoquímica de cánceres de pulmón fijados con formalina o secciones de tejido congelado. Después de su caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados al uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan de acuerdo con métodos de pruebas clínicas conocidas.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir; los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad antagonista deseada (patente de EE.UU. núm. 4,816,567).

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse mediante el uso de métodos de hibridoma. En un método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para inducir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro.*

Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante, como los descritos en la patente de EE.UU. núm. 4,816,567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante el uso de procedimientos convencionales (por ejemplo, con sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de estos, particularmente, fragmentos Fab, se puede lograr mediante el uso de técnicas de rutina conocidas en la técnica. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Se describen ejemplos de digestión con papaína en el documento WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994 y la patente de EE.UU. núm. 4,342,566. La digestión de los anticuerpos con papaína típicamente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno y un fragmento Fe residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento que tiene dos sitios de combinación a antígenos y todavía es capaz unirse de manera cruzada al antígeno.

Los fragmentos de anticuerpos, unidos o no a otras secuencias, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se altere o cambie significativamente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar algunas propiedades adicionales, como eliminar/agregar aminoácidos que pueden formar enlaces disulfuro, aumentar su longevidad biológica, cambiar sus características secretoras, etcétera. En cualquier caso, el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, tal como actividad de unión, regulación de la unión en el dominio de unión, etcétera. Las regiones funcionales o activas del anticuerpo pueden identificarse mediante mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido de la expresión y análisis del polipéptido expresado. Dichos métodos son muy evidentes para un experto en la materia y pueden incluir mutagénesis específica del sitio del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de estas (como Fv, Fab, Fab' u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias del marco o CDR importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente

todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen bien en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de los Estados Unidos Núm. 4,816,567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Se pueden emplear animales transgénicos (p. ej., ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de la inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de presentación de fagos.

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para lograr que la formulación sea isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y con mayor preferencia de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Los portadores adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Para los expertos en la materia será evidente que ciertos vehículos pueden ser más preferibles en dependencia, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración del anticuerpo que se administra.

Los anticuerpos pueden administrarse al sujeto, paciente o célula mediante inyección (p. ej., intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular), o mediante otros métodos, como la infusión, que aseguran su suministro al torrente sanguíneo de forma efectiva. Los anticuerpos también pueden administrarse por vía intratumoral o peritumoral, para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosis efectivas y los programas para administrar los anticuerpos pueden determinarse empíricamente, y la forma de realización de tales determinaciones está dentro de la habilidad en la técnica. Los expertos en la materia entenderán que la dosificación de anticuerpos que deben administrarse variará en dependencia, por ejemplo, del sujeto que recibirá el anticuerpo, la vía de administración, el tipo particular de anticuerpo utilizado y otros fármacos que se administran. Una dosis diaria típica del anticuerpo usado solo puede variar de aproximadamente 1 (µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, en dependencia de los factores mencionados anteriormente. Después de la administración de un anticuerpo para tratar el cáncer de pulmón, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de varias maneras bien conocidas por el profesional experto. Por ejemplo, el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer de pulmón en un sujeto que recibe tratamiento puede controlarse utilizando técnicas estándar de imágenes de tumores. Un anticuerpo administrado terapéuticamente que detiene el crecimiento tumoral, provoca la reducción del tumor y/o previene el desarrollo de nuevos tumores, en comparación con el curso de la enfermedad que ocurriría en ausencia de la administración de anticuerpos, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer de pulmón.

Debido a que los marcadores de tumores de pulmón ABCA13, MMP12 como se describe, se expresan mucho en células de cáncer de pulmón y se expresan a niveles extremadamente bajos en células normales, la inhibición de la expresión de ABCA13 y MMP12 o la actividad de polipéptidos puede integrarse en cualquier estrategia terapéutica para tratar o prevenir el NSCLC.

En los métodos descritos anteriormente, que incluyen la administración y la captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección génica), los ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar en forma de ADN desnudo o los ácidos nucleicos pueden estar en un vector para administrar los ácidos nucleicos a las células para inhibir la expresión de una proteína marcadora de tumor gástrico. El vector puede ser una preparación disponible comercialmente, tal como un vector de adenovirus (Quantum Biotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canadá). El suministro del ácido nucleico o vector a las células puede ser a través de una variedad de mecanismos. Como un ejemplo, el suministro puede ser a través de un liposoma, con el uso de preparaciones de liposomas disponibles comercialmente como LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md.), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, Wisconsin), así como otros liposomas

desarrollados de acuerdo con los procedimientos estándar en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector de esta invención puede administrarse *in vivo* por electroporación, cuya tecnología está disponible de Genetronics, Inc. (San Diego, California), así como por medio de una máquina SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, Arizona).

Como un ejemplo, el suministro del vector puede ser a través de un sistema viral, como un sistema de vector retroviral que puede empaquetar un genoma retroviral recombinante. Después el retrovirus recombinante se puede usar para infectar y, por lo tanto, suministrar a las células infectadas ácido nucleico antisentido que inhibe la expresión de ABCA13, MMP12. El método exacto de introducir el ácido nucleico alterado en las células de mamífero, por supuesto, no se limita al uso de vectores retrovirales. Otras técnicas están ampliamente disponibles para este procedimiento, incluido el uso de vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados (AAV), vectores lentivirales, vectores retrovirales pseudotipados. También se pueden utilizar técnicas de transducción física, como la administración de liposomas y mecanismos de endocitosis mediados por receptores y otros. Esta invención puede usarse junto con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia génica comúnmente utilizados.

Los anticuerpos también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionucleótido (como ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{3}H, ^{32}P o ^{35}S) para que el tumor se pueda localizar mediante inmunoescintiografía. Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden marcarse con sondas adecuadas para su detección por diversos métodos de imagen. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, fluorescencia, luz, microscopía confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; fluoroscopía, 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 radionucleidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bifuncionales o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Estos anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La unión de las sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo y la unión covalente de un compuesto quelante para la unión de la sonda, entre otros bien reconocidos en la técnica. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido enfermo puede estar fresca o congelada o puede estar embebida en parafina y fijada con un conservante como la formalina.

La presente invención proporciona así un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 5 (MXRA5-001), en donde dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I.

En la presente invención, el término "homólogo" se refiere al grado de identidad (véase el por ciento de identidad anterior) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir, secuencias de péptidos o polipéptidos. La "homología" mencionada anteriormente se determina mediante la comparación de dos secuencias alineadas en condiciones óptimas sobre las secuencias a comparar. Tal homología de secuencia se puede calcular mediante la creación de una alineación, por ejemplo, con el uso del algoritmo ClustalW. Las bases de datos públicas proporcionan software disponibles comúnmente para el análisis de secuencias, más específicamente, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas de análisis.

Un experto en la técnica podrá evaluar si las células T inducidas por una variante de un péptido específico podrán reaccionar de forma cruzada con el péptido mismo (Fong y otros, 2001); (Zaremba y otros, 1997; Colombetti y otros, 2006; Appay y otros, 2006).

Posteriormente, los CTL pueden reaccionar de forma cruzada con las células y matar células que expresan un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín como se define en los aspectos de la invención. Como puede derivarse de la literatura científica (Rammensee y otros, 1997) y las bases de datos (Rammensee y otros, 1999), ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son típicamente residuos de anclaje que forman una secuencia central que se ajusta al motivo de unión del receptor de HLA, que se define por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas de polipéptidos que constituyen el surco de unión.

Tabla 4: Variantes y motivos de los péptidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y 7

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ABCA13-001	Código del péptido		I	L	F	E	I	N	P	K	L
SEQ ID No.	Variantes										V
											I
											A
				M							V
				M							I

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
				M							
				M							A
				A							V
				A							I
				A							
				A							A
				V							V
				V							I
				V							
				V							A
				T							V
				T							I
				T							
				T							A
				Q							V
				Q							I
				Q							
				Q							A
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MMP12-003	Código del péptido		K	I	Q	E	M	Q	H	F	L
SEQ ID No.	Variantes			L							V
				L							I
				L							
				L							A
				M							V
				M							I
				M							
				M							A
				A							V
				A							I
				A							
				A							A
				V							V
				V							I
				V							
				V							A
				T							V
				T							I

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
				T							
				T							A
				Q							V
				Q							I
				Q							
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DST-001	Código del péptido		N	L	I	E	K	S	I	Y	L
SEQ ID No.	Variantes										V
											I
											A
				M							V
				M							I
				M							
				M							A
				A							V
				A							I
				A							
				A							A
				V							V
				V							I
				V							
				V							A
				T							V
				T							I
				T							
				T							A
				Q							V
				Q							I
				Q							
				Q							A
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MXRA5-001	Código del péptido		T	L	S	S	I	K	V	E	V
SEQ ID No.	Variantes										I
											L
											A
				M							
				M							I
				M							L

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
				M							A
				A							
				A							I
				A							L
				A							A
				V							
				V							I
				V							L
				V							A
				T							
				T							I
				T							L
				T							A
				Q							
				Q							I
				Q							L
				Q							A
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CDK4-001	Código del péptido		T	L	W	Y	R	A	P	E	V
SEQ ID No.	Variantes										I
											L
											A
				M							
				M							I
				M							L
				M							A
				A							
				A							I
				A							L
				A							A
				V							
				V							I
				V							L
				V							A
				T							
				T							I
				T							L
				T							A
				Q							

		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
				Q							I
				Q							L
				Q							A

Los péptidos más largos también pueden ser adecuados. También es posible que los epítopos de MHC clase I, aunque generalmente tengan entre 8 y 11 aminoácidos de largo, se generen mediante el procesamiento de péptidos a partir de péptidos o proteínas más largos que incluyen el epítopo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítopo real sean residuos que no afecten sustancialmente la escisión proteolítica necesaria para exponer el epítopo real durante el procesamiento.

La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC puede probarse mediante métodos conocidos en la técnica.

En una forma de realización de la presente invención, el péptido es una proteína de fusión que comprende los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariante de HLA-DR asociada al antígeno (p33, en el siguiente "Ii") como se deriva del NCBI, número de acceso al GenBank X00497.

Un enlace no peptídico es, por ejemplo, $-CH_2-NH$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$, $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$, y $-CH_2SO-$. La patente de los Estados Unidos 4,897,445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-CH_2-NH$) en cadenas de polipéptidos que implica polipéptidos sintetizados por procedimientos estándar y el enlace no peptídico sintetizado por reacción de un amino aldehído y un aminoácido en presencia de $NaCNBH_3$.

Un péptido en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, los péptidos (al menos los que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden sintetizarse mediante el modo Fmoc-poliamida de síntesis de péptidos en fase sólida como se describe por Lu y otros (1981) y sus referencias. La protección temporal del grupo N-amino es proporcionada por el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetitiva de este grupo protector muy lábil a las bases se realiza mediante el uso de piperidina al 20 % en N, N-dimetilformamida. Las funcionalidades de las cadenas laterales pueden protegerse como sus éteres de butilo (en el caso de serina treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso de ácido glutámico y ácido aspártico), derivado de butiloxicarbonilo (en el caso de lisina e histidina), derivado de tritilo (en el caso de la cisteína) y el derivado 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de la arginina). Cuando la glutamina o la asparagina son residuos C-terminales, se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrilo para proteger las funcionalidades amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros de dimetilacrilamida (monómero de la cadena principal), bisacriloiletilendiamina (reticulante) y el éster metílico de acriloilsarcosina (agente funcionalizante). El agente de unión escindible del péptido a la resina, que se utilizó es el derivado de ácido 4-hidroximetil-fenoxi-acético, lábil a los ácidos. Todos los derivados de aminoácidos se agregan como sus derivados de anhídrido simétrico preformados con la excepción de asparagina y glutamina, que se agregan usando un procedimiento de acoplamiento mediado por N, N-diciclohexilcarbodiimida/1hidroxibenzotriazol invertido. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan utilizando ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico o procedimientos de prueba de isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina con la eliminación concomitante de los grupos protectores de las cadenas laterales mediante tratamiento con ácido trifluoroacético al 95 % que contiene una mezcla de limpiador al 50 %. Los limpiadores comúnmente utilizados incluyen etanditiol, fenol, anisol y agua, la elección exacta depende de los aminoácidos constituyentes del péptido que se sintetiza. También es posible una combinación de metodologías en fase sólida y en fase de solución para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo (Bruckdorfer y otros, 2004) y las referencias citadas allí).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación *al vacío,* con la posterior trituración con éter dietílico proporcionando el péptido bruto. Los limpiadores presentes se eliminan mediante un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto libre de limpiadores. Los reactivos para la síntesis de péptidos están generalmente disponibles de, por ejemplo, Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

La purificación se puede realizar mediante cualquiera o una combinación de técnicas tales como recristalización, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y (generalmente) cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa usando, por ejemplo, separación por gradiente de acetonitrilo/agua.

El análisis de péptidos puede llevarse a cabo utilizando cromatografía en capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa, análisis de aminoácidos después de hidrólisis ácida y por análisis espectrométrico de masas por bombardeo de átomos rápidos (FAB), así como análisis espectrométrico de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

Un aspecto adicional 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, ANP, ARN o combinaciones de estos, ya sea de

forma monocatenaria y/o bicatenaria, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, polinucleótidos con una cadena principal de fosforotioato y puede o no contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, solo los péptidos que contienen residuos de aminoácidos de origen natural unidos por enlaces peptídicos de origen natural pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto adicional de la invención proporciona un vector de expresión que expresa un polipéptido como se describe.

Se han desarrollado una variedad de métodos para unir polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo, a través de terminales cohesivos complementarios. Por ejemplo, segmentos de homopolímeros complementarios se pueden agregar al segmento de ADN para insertarlos en el ADN del vector. El vector y el segmento de ADN se unen luego mediante enlaces de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Los enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores. Los enlazadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasas de restricción están disponibles comercialmente de varias fuentes, incluyendo International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE. UU.

Un método conveniente para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa como se describe por (Saiki y otros, 1988). Este método puede usarse para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo mediante ingeniería en sitios de restricción adecuados, o puede usarse para modificar el ADN en otras formas útiles como se conoce en la técnica. Si se usan vectores virales, se prefieren los vectores de pox o adenovirus.

El ADN (o en el caso de los vectores retrovirales, ARN) se puede expresar en un huésped adecuado para producir un polipéptido que comprende el péptido de la invención. Por lo tanto, el ADN que codifica el péptido de la invención puede usarse de acuerdo con técnicas conocidas, modificadas apropiadamente en vista de las enseñanzas contenidas en la presente, para construir un vector de expresión, que luego se usa para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Dichas técnicas incluyen las descritas en las patentes de los Estados Unidos núms. 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 en el caso de los vectores retrovirales, ARN) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede unirse a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para su introducción en un huésped apropiado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del huésped, la manera de la introducción del ADN en el huésped y si se desea el mantenimiento o la integración episomal.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, en la orientación adecuada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede estar unido a las secuencias nucleotídicas de control, reguladoras de la transcripción y la traducción, apropiadas y reconocidas por el huésped deseado, aunque tales controles están generalmente disponibles en el vector de expresión. Después el vector se introduce en el huésped a través de técnicas estándar. Generalmente, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar las células huésped transformadas. Una técnica de selección implica incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN, con cualquier elemento de control necesario, que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como la resistencia a los antibióticos.

Alternativamente, el gen para dicho rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se usa para co-transformar la célula huésped deseada.

Después las células huésped que han sido transformadas por el ADN recombinante de la invención se cultivan durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la materia en vista de las enseñanzas descritas en la presente para permitir la expresión del polipéptido, que luego puede ser recuperado.

Se conocen muchos sistemas de expresión, que incluyen bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus spec.*), células vegetales, células animales y células de insectos. Preferiblemente, el sistema puede ser células de mamífero tales como células CHO disponibles de la Colección de Biología Celular ATCC.

Un plásmido de vector de células de mamífero típico para la expresión constitutiva comprende el promotor de CMV o SV40 con una cola de poli A adecuada y un marcador de resistencia, tal como neomicina. Un ejemplo es pSVL disponible en Pharmacia, Piscataway, NJ, Estados Unidos. Un ejemplo de un vector de expresión de mamífero inducible es pMSG, también disponible en Pharmacia. Los vectores de plásmidos de levadura útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y generalmente están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Estados Unidos. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integradores de levadura (YIp) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores basados en promotores de CMV (por ejemplo, de Sigma-Aldrich) proporcionan expresión transitoria o estable, expresión o secreción citoplasmática, y marcaje N-terminal o C-terminal en diversas combinaciones

de FLAG, 3xFLAG, c-*myc* o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, purificación y análisis de proteínas recombinantes. Las fusiones de doble marcaje proporcionan flexibilidad en la detección.

La región reguladora del promotor fuerte del citomegalovirus humano (CMV) conduce a niveles de expresión de proteínas constitutivas tan altos como 1 mg/l en células COS. Para líneas celulares menos potentes, los niveles de proteína son típicamente ~ 0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación de SV40 dará como resultado altos niveles de replicación de ADN en células COS permisivas de replicación de SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado de pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen b-lactamasa para la selección por resistencia a ampicilina en bacterias, poliA de hGH y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de preprotripsina (PPT) pueden dirigir la secreción de proteínas de fusión FLAG en el medio de cultivo para la purificación usando, resinas, placas y anticuerpos ANTI-FLAG. Otros vectores y sistemas de expresión se conocen bien en la técnica para su uso con una variedad de células huésped.

En otra forma de realización, dos o más péptidos de la invención están codificados y, por lo tanto, se expresan en un orden sucesivo (similar a las construcciones de "cuentas en una cuerda"). Al hacerlo, los péptidos pueden unirse o fusionarse mediante tramos de aminoácidos enlazadores, como por ejemplo LLLLLL, o pueden unirse sin ningún péptido(s) adicional(es) entre ellos.

La presente invención también se refiere a una célula huésped transformada con una construcción de vector polinucleotídico de la presente invención. La célula huésped puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser células huésped procariotas preferidas en algunas circunstancias y típicamente son una cepa de E. coli como, por ejemplo, las cepas de E. coli DH5 disponible de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, Estados Unidos, y RR1 disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Rockville, MD, Estados Unidos (ATCC núm. 31343). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura, insecto y mamífero, preferiblemente células de vertebrados tales como las líneas celulares fibroblásticas y de colon de ratón, rata, mono o humano. Las células huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que generalmente están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, Estados Unidos. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de ATCC como CCL61, células de embrión de ratón suizo NIH NIH/3T3 disponibles de ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles de ATCC como CRL 1650 y células 293 que son células de riñón embrionario humano. Las células de insecto preferidas son células Sf9 que pueden transfectarse con vectores de expresión de baculovirus. Una visión general sobre la elección de las células huésped adecuadas para la expresión se puede encontrar, por ejemplo, en el libro de texto de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Primera parte, segunda edición, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra literatura conocida por la persona experta.

La transformación de los huéspedes celulares apropiados con una construcción de ADN de la presente invención se realiza mediante métodos bien conocidos que típicamente dependen del tipo de vector utilizado. Con respecto a la transformación de células huésped procariotas, véase, por ejemplo, Cohen y otros (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. La transformación de las células de levadura se describe en Sherman y otros (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. El método de Beggs (1978) Nature 275,104-109 también es útil. Con respecto a las células de vertebrados, Straagene Cloning Systems o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, Estados Unidos, tienen a su disposición reactivos útiles para transfectar dichas células, por ejemplo, fosfato de calcio y DEAE-dextrano o formulaciones de liposomas. La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es bien conocida en la técnica para transformar células de levadura, células bacterianas, células de insectos y células de vertebrados.

Las células transformadas con éxito, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, pueden identificarse mediante técnicas bien conocidas como la PCR. Alternativamente, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede detectar usando anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células huésped de la invención son útiles en la preparación del péptido de la invención, por ejemplo, células bacterianas, de levadura y de insecto. Sin embargo, otras células huésped pueden ser útiles en ciertos métodos terapéuticos. Por ejemplo, las células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas, pueden usarse útilmente para expresar los péptidos de la invención de modo que puedan cargarse en moléculas de MHC apropiadas. Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la invención.

En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o una célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) se encuentran actualmente en investigación para el tratamiento del cáncer de próstata (Sipuleucel-T) (Small y otros, 2006; Rini y otros, 2006).

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para producir un péptido, el método comprende cultivar una célula huésped y aislar el péptido de la célula huésped o su medio de cultivo.

En otra forma de realización, el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se usan en medicina. Por ejemplo, el péptido puede prepararse para inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.), inyección intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos de inyección de péptidos incluyen s.c., i.d., i.p., i.m., e i.v. Los métodos preferidos de inyección de ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Se pueden administrar dosis, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg, de péptido o ADN y dependerán del péptido o ADN respectivo. Las dosis de este intervalo se utilizaron con éxito en ensayos anteriores (Walter y otros, Nature Medicine 18, 1254-1261 (2012)).

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir células T activadas, el método comprende poner *en* contacto células T *in vitro* con moléculas MHC humanas cargadas con antígeno, expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar la célula T de una manera específica de antígeno, en donde el antígeno es un péptido de acuerdo con la invención. Preferiblemente, se usa una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Preferiblemente, la célula de mamífero carece o tiene un nivel o función reducida del transportador de péptidos TAP. Las células adecuadas que carecen del transportador peptídico TAP incluyen células T2, RMA-S y de Drosophila. TAP es el transportador asociado con el procesamiento de antígenos.

La línea celular T2 deficiente de la carga de péptidos humanos está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos con el núm. de catálogo CRL 1992; la línea celular de Drosophila línea Schneider 2 está disponible en la ATCC con el núm. de catálogo CRL 19863; la línea celular RMA-S de ratón se describe en Karre y otros, 1985.

Preferiblemente, la célula huésped antes de la transfección no expresa sustancialmente moléculas de MHC clase I. También se prefiere que la célula estimuladora exprese una molécula importante para proporcionar una señal coestimuladora para células T tales como cualquiera de B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácido nucleico de numerosas moléculas de MHC clase I y de las moléculas coestimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

En caso de que se use un epítopo MHC clase I como antígeno, las células T son CTL CD8 positivas.

Si una célula presentadora de antígeno se transfecta para expresar dicho epítopo, preferiblemente la célula comprende un vector de expresión que expresa un péptido que contiene la SEQ ID No. 5.

Se pueden usar otros métodos para generar CTL *in vitro.* Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples y otros (1995) y Kawakami y otros (1992) utilizan linfocitos autólogos infiltrantes de tumores en la generación de CTL. Plebanski y otros (1995) utilizan linfocitos de sangre periférica (PLB) autólogos en la preparación de CTL. Jochmus y otros (1997) describen la producción de CTL autólogos sometiendo las células dendríticas a pulsos con péptido o polipéptido, o mediante infección con virus recombinante. Hill y otros (1995) y Jerome y otros (1993) hacen uso de células B en la producción de CTL autólogos. Además, los macrófagos sometidos a pulsos con péptido o polipéptido, o infectados con virus recombinante, se pueden usar en la preparación de CTL autólogos. S. Walter y otros, 2003, describen la sensibilización *in vitro* de células T mediante el uso de células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC), que también es una forma adecuada de generar células T contra el péptido de elección. En este estudio, las aAPC se generaron mediante el acoplamiento de complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) mediante bioquímica biotina: estreptavidina. Este sistema permite el control exacto de la densidad de MHC en aAPC, lo que permite inducir selectivamente respuestas de células T específicas de antígeno de alta o baja avidez con alta eficiencia a partir de las muestras de sangre. Además de los complejos MHC:péptidos, las aAPC deben transportar otras proteínas con actividad coestimuladora como los anticuerpos anti-CD28 acoplados a su superficie. Además, tales sistemas basados en APC a menudo requieren la adición de factores solubles apropiados, por ejemplo, citocinas como la interleucina-12.

Las células alogénicas también pueden usarse en la preparación de células T y se describe un método en detalle en el documento WO 97/26328. Por ejemplo, además de las células de Drosophila y las células T2, se pueden usar otras células para presentar antígenos tales como células CHO, células de insectos infectadas con baculovirus, células objetivo infectadas con bacterias, levaduras, vaccinia. Además, se pueden usar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta y otros (1994)) que describe el desarrollo del virus del mosaico del caupí como un sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños.

Las células T activadas que se dirigen contra el péptido de la invención son útiles para la terapia. Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención proporciona células T activadas que pueden obtenerse por los métodos anteriores de la invención.

Las células T activadas, que se producen mediante el método anterior, reconocerán selectivamente una célula que expresa de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 5.

Preferiblemente, la célula T reconoce la célula mediante la interacción a través de su TCR con el complejo HLA/péptido (por ejemplo, mediante la unión). Las células T son útiles en un método para matar células objetivo en un paciente cuyas

células objetivo expresan aberrantemente un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención en donde al paciente se le administra una cantidad eficaz de células T activadas. Las células T que se administran al paciente pueden derivarse del paciente y activarse como se describe anteriormente (es decir, son células T autólogas). Alternativamente, las células T no son del paciente sino de otro individuo. Por supuesto, se prefiere si el individuo es un individuo sano. Por "individuo sano" los inventores quieren decir que el individuo generalmente goza de buena salud, preferiblemente tiene un sistema inmunitario competente y, con mayor preferencia, no padece ninguna enfermedad que pueda ser fácilmente analizada y detectada.

In vivo, las células objetivo para las células T CD8 positivas de acuerdo con la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC clase II) y/o células estromales que rodean el tumor (células tumorales) (que a veces también expresan MHC clase II; (Dengjel y otros, 2006)).

Las células T de la presente invención pueden usarse como ingredientes activos de una composición terapéutica. Por lo tanto, la invención también describe un método para matar células objetivo en un paciente cuyas células objetivo expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de células T como se definió anteriormente.

Por "expresado de manera aberrante", los inventores también se refieren a que el polipéptido se sobreexpresa en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen permanece en silencio en el tejido del que se deriva el tumor pero se expresa en el tumor. Por "sobreexpresado", los inventores se refieren a que el polipéptido está presente a un nivel de al menos 1,2 veces del que está presente en el tejido normal; preferiblemente al menos 2 veces, y con mayor preferencia al menos 5 veces o 10 veces el nivel presente en el tejido normal.

Las células T pueden obtenerse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos anteriormente.

Los protocolos para esta denominada transferencia adoptiva de células T se conocen bien en la técnica. Se pueden encontrar revisiones en (Gattinoni y otros, 2006) y (Morgan y otros, 2006).

Cualquier molécula de la invención, es decir, el péptido, ácido nucleico, anticuerpo, vector de expresión, célula, CTL activado, receptor de células T o el ácido nucleico que lo codifica, es útil para el tratamiento de trastornos, caracterizados por células que escapan de una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, cualquier molécula de la presente invención puede usarse como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede usarse sola o combinada con otra(s) molécula(s) de la invención o molécula(s) conocida(s).

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es una vacuna. Puede administrarse directamente al paciente, al órgano afectado o sistémicamente i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v., o aplicarse ex vivo a células derivadas del paciente o una línea celular humana que posteriormente se administran al paciente, o se usan *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente, que luego se vuelven a administrar al paciente. Si el ácido nucleico se administra a las células *in vitro,* puede ser útil que las células se transfecten para coexpresar citocinas inmunoestimulantes, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulante (ver más abajo) o usarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o administrarse con un sistema de administración adecuado, por ejemplo liposomas. El péptido también puede conjugarse con un vehículo adecuado tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o manano (véase el documento WO 95/18145 y Longenecker, 1993). El péptido también puede estar marcado, puede ser una proteína de fusión o puede ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se describe estimulen las células T CD4 o CD8. Sin embargo, la estimulación de los CTL CD8 es más eficiente en presencia de la ayuda proporcionada por las células T cooperadoras CD4. Por lo tanto, para los epítopos de MHC de Clase I que estimulan los CTL CD8, la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida proporcionan adecuadamente epítopos que estimulan las células T CD4 positivas. Los epítopos estimuladores de CD4 y CD8 se conocen bien en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID No. 5 y al menos un péptido adicional, preferiblemente de dos a 50, con mayor preferencia de dos a 25, incluso con mayor preferencia de dos a 20 y con la máxima preferencia dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. El (Los) péptido(s) puede(n) derivarse de uno o más TAA específicos y pueden unirse a moléculas de MHC clase I.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro o estar contenido en un vector o sistema de administración adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, ANP, ARN o una combinación de estos. Los métodos para diseñar e introducir dicho ácido nucleico se conocen bien en la técnica. Una visión general es proporcionada por ej. por (Pascolo y otros, 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el modo de acción de estos vectores para inducir una respuesta inmunitaria no se comprende completamente. Los vectores y sistemas de administración adecuados incluyen ADN y/o ARN virales, tales como sistemas basados en adenovirus, virus vaccinia, retrovirus, virus herpes, virus adenoasociados o híbridos que contienen elementos de más de un virus. Los sistemas de administración no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos y se conocen bien en la técnica de administración de ADN. También se puede utilizar el suministro físico, como a través de una "pistola de genes". El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico puede ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítopo que estimula las células T para la respectiva CDR

opuesta como se indicó anteriormente.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que aumentan o potencian de manera no específica la respuesta inmunitaria (por ejemplo, respuestas inmunitarias mediadas por CTL y células T cooperadoras (T_H) contra un antígeno, y por lo tanto se considerarían útiles en el medicamento de la presente invención. Los adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos de TLR5 derivados de flagelina, ligando 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 estos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y aceite en agua, OK-432, OM-174, OM -197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vector Pep-Tel®, micropartículas de poli(co-glicólido lactídico) [PLG] y dextrano, talac-toferrin SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF -17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, el estímulo QS21 de Aquila, que se deriva de la saponina, extractos de micobacterias e imitadores sintéticos de la pared celular bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Ribi's Detox, Qui Yo, o Superfos. Se prefieren adyuvantes como Freund's o GM-CSF. Se han descrito previamente varios adyuvantes inmunológicos (por ejemplo, MF59) específicos para células dendríticas y su preparación (Allison y Krummel, 1995; Allison y Krummel, 1995). También se pueden usar citocinas. Varias citocinas se han relacionado directamente en la influencia sobre la migración de las células dendríticas a los tejidos linfoides (p. ej., TNF-), acelerando la maduración de las células dendríticas a células presentadoras de antígenos eficaces para los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL- 4) (patente de los Estados Unidos núm. 5,849,589) y que actúan como inmunoadyuvantes (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa. IFN-beta) (Gabrilovich, 1996).

También se ha informado que los oligonucleótidos inmunoestimuladores con CpG aumentan los efectos de los adyuvantes en una vacuna. Sin estar atados por la teoría, los oligonucleótidos con CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de receptores de tipo Toll (TLR), principalmente TLR9. La activación de TLR9 activada por CpG mejora las respuestas humorales y celulares específicas al antígeno para una amplia variedad de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares autólogas y conjugados de polisacáridos tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, mejora la maduración y diferenciación de las células dendríticas, lo que da como resultado una mayor activación de las células T_{H1} y una fuerte generación de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso en ausencia de la ayuda de las células T CD4. El sesgo de T_{H1} inducido por la estimulación de TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes de vacunas como el alumbre o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo de T_{H2}. Los oligonucleótidos con CpG muestran una actividad adyuvante aún mayor cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones lipídicas o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta fuerte cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten que las dosis de antígeno se reduzcan en aproximadamente dos órdenes de magnitud, con respuestas de anticuerpos comparables a la vacuna de dosis completa sin CpG en algunos experimentos (Krieg, 2006). La patente núm. 6,406,705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos con CpG, adyuvantes que no son de ácido nucleico y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica al antígeno. Un antagonista de TLR9 con CpG es dSLIM (inmunomodulador de lazo tallo doble) de Mologen (Berlín, Alemania), que es un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención. También se pueden usar otras moléculas de unión a TLR tales como ARN que se une a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen, entre otros, CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, Idera), análogos de ARNbc como Poli(I:C) y sus derivados (por ejemplo, Am-pliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ADN o ARN bacteriano no CpG, así como pequeñas moléculas inmunoactivas y anticuerpos como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos dirigidos a estructuras clave del sistema inmunitario (por ejemplo, anti-CD40, anti-TGFbeta, anti- receptor de TNFalfa) y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como un adyuvante. El experto en la materia puede determinar fácilmente las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención sin excesiva experimentación.

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

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

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en factores estimulantes de colonias, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, immiquimod y resiquimod.

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, el adyuvante es

ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod.

Adyuvantes aún más preferidos son Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y mAB anti-CD40 o combinaciones de estos.

Esta composición se usa para administración parenteral, tal como administración subcutánea, intradérmica, intramuscular u oral. Para esto, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, agentes aglutinantes, agentes de voladura, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimulantes, como las citocinas. Una lista extensa de excipientes que pueden usarse en una composición de este tipo, por ejemplo, puede tomarse de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ra Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y la prensa farmacéutica. La composición se puede usar para la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Se pueden encontrar formulaciones ilustrativas, por ejemplo, en el documento EP2113253.

Sin embargo, en dependencia del número y las características fisicoquímicas de los péptidos de la invención, se necesita más investigación para proporcionar formulaciones para combinaciones específicas de péptidos, especialmente combinaciones con más de 20 péptidos que sean estables durante más de 12 a 18 meses.

La presente invención proporciona un medicamento que es útil para tratar el cáncer, en particular carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer gástrico y glioblastoma.

Se describe un kit que comprende:

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

El kit puede comprender además uno o más de (iii) un tampón, (i.v.) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja o (v) una jeringa. El recipiente es preferiblemente una botella, un frasco, una jeringa o un tubo de ensayo; y puede ser un recipiente de usos múltiples. La composición farmacéutica está preferiblemente liofilizada.

Los kits como se describen comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un recipiente adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos (por ejemplo, frascos de doble cámara), jeringas (como jeringas de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado por una variedad de materiales como vidrio o plástico. Preferiblemente, el kit y/o recipiente contienen instrucciones en el recipiente o asociadas con él, que indican instrucciones para la reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada se debe reconstituir a concentraciones de péptidos como se describió anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada a la administración subcutánea.

El recipiente que contiene la formulación puede ser un frasco de usos múltiples, que permite la administración repetida (por ejemplo, de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El kit puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, solución de bicarbonato de sodio).

Al mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente de al menos 0,15 mg/ml/péptido (= 75 µg) y preferiblemente no más de 3 mg/ml/péptido (= 1500 µg). El kit puede incluir además otros materiales convenientes desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

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

Preferiblemente, los kits como se describen incluyen una formulación de la invención empaquetada para uso en combinación con la administración conjunta de un segundo compuesto (tal como adyuvantes (por ejemplo, GM-CSF), un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o antagonista, un agente o inhibidor de antiangiogénesis, un agente inductor de apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de este. Los componentes del kit pueden estar formando complejos previamente o cada componente puede estar en un recipiente distinto por separado antes de la administración a un paciente. Los componentes del kit pueden proporcionarse en una o más soluciones líquidas, preferiblemente, una solución acuosa, con mayor preferencia, una solución acuosa estéril. Los componentes del kit también pueden proporcionarse como sólidos, que pueden convertirse en líquidos mediante la adición de disolventes adecuados, que se proporcionan preferiblemente en otro recipiente distinto.

El recipiente de un kit terapéutico puede ser un frasco, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa o cualquier otro medio para encerrar un sólido o líquido. Por lo general, cuando hay más de un componente, el kit contendrá un segundo frasco u otro recipiente, lo que permite una dosificación por separado. El kit también puede contener otro recipiente para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, un kit terapéutico contendrá un aparato (por ejemplo, una o más agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.), que permite la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente kit.

La presente formulación es adecuada para la administración de los péptidos por cualquier vía aceptable tal como oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferiblemente, la administración es s.c., y con la máxima preferencia i.d. La administración puede ser por bomba de infusión.

Dado que el péptido de la invención se aisló de NSCLC, el medicamento de la invención se usa preferiblemente para tratar NSCLC.

La presente invención se describirá ahora en los siguientes ejemplos que describen formas de realización preferidas de esta, pero sin limitarse a ellas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Espectro de masas ilustrativo de ABCA13-001 que demuestra su presentación en la muestra de tumor primario NSCLC898. Se realizó nanoESI-LCMS en un grupo de péptidos eluidos de la muestra de NSCLC 898. El cromatograma de masas para m/z 543,8318 ± 0,001 Da, z = 2 muestra un pico de péptido en el tiempo de retención 86,36 min. B) El pico detectado en el cromatograma de masas a 86,36 min reveló una señal de m/z 543,8318 en el espectro de MS. C) Un espectro de masa de desintegración inducida por colisión del precursor seleccionado m/z 543,8318 registrado en el experimento de nanoESI-LCMS en el tiempo de retención dado confirmó la presencia de ABCA13-001 en la muestra de tumor NSCLC898. D) Se registró el patrón de fragmentación del péptido de referencia ABCA13-001 sintético y se comparó con el patrón de fragmentación de TUMAP natural generado que se muestra en C para la verificación de la secuencia.

Figura 2: Perfiles de expresión de ARNm de proteínas seleccionadas en tejidos normales y en 21 muestras de cáncer de pulmón
a) ABCA13 (ID de conjunto de sondas: 1553605_a_at)
b) MMP12 (ID de conjunto de sondas: 204580_at)

Figura 3: Perfiles de presentación para péptidos de HLA clase I seleccionados. Se calculó un perfil de presentación para cada péptido que muestra la presentación media de la muestra, así como las variaciones de réplicas. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con una referencia de muestras de tejido normal.
a) ABCA13-001
b) DST-001
c) MXRA5-001

Figura 4: Resultados ilustrativos de la inmunogenicidad *in vitro* específica de péptido de TUMAP de clase I. Las células T CD8+ específicas se tiñeron con multímeros de HLA unidos a dos fluorocromos diferentes. Los gráficos de puntos muestran las poblaciones doble positivas de multímero MHC para el péptido estimulante (paneles de la izquierda) y la respectiva estimulación de control negativo (paneles de la derecha).

Figura 5: Propiedades de unión de POSTN-002 y MMP12-002 con los haplotipos HLA investigados: el diagrama muestra las puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a 5 de los 7 haplotipos HLA-DR analizados.

Figura 6: Estabilidad de los complejos HLA-POSTN-002 y MMP12-002 después de 24 horas a 37 °C: el diagrama muestra el porcentaje de complejos HLA-POSTN-002 y HLA-MMP12-002 intactos después de 24 horas a 37 °C con una molécula HLA correspondiente.

Figura 7: Respuesta ilustrativa de células T CD4 inducida por vacuna contra CEA-006 en el ensayo de ICS clase II. Después de la sensibilización *in vitro,* se analizaron las PBMC del paciente 36-031 para las respuestas de células T CD4 contra CEA-006 (panel superior) y simulado (panel inferior) en el grupo de puntos de tiempo V8/EOS. Las células se estimularon con los péptidos correspondientes y se tiñeron con marcadores de viabilidad, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 y efectores (de derecha a izquierda: CD154, TNF-alfa, IFN-gamma, IL-2, IL-10), respectivamente. Se analizaron las células T CD4 viables para determinar la proporción de células positivas para una o más moléculas efectoras.

Figura 8: Inmunogenicidad de varios péptidos de clase II: el diagrama muestra la tasa de respuesta inmunitaria contra 5 péptidos de clase II diferentes detectados en 16 pacientes para péptidos IMA950 y en 71 pacientes para péptidos IMA910 usando ICS.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Identificación y cuantificación de péptidos asociados a tumores presentados en la superficie celular

Muestras de tejidos

Los tejidos tumorales de los pacientes fueron proporcionados por la Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania. Se obtuvieron los consentimientos informados por escrito de todos los pacientes antes de la cirugía. Los tejidos se congelaron por choque en nitrógeno líquido inmediatamente después de la cirugía y se almacenaron hasta el aislamiento de TUMAP a - 80 °C.

Aislamiento de péptidos HLA de muestras de tejidos

Los grupos de péptidos HLA de muestras de tejidos congelados por choque se obtuvieron mediante inmunoprecipitación de tejidos sólidos de acuerdo con un protocolo ligeramente modificado (Falk, K., 1991; Seeger, F.H.T., 1999) con el uso del anticuerpo específico para HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico para HLA-A, -B, -C W6/32, sefarosa activada por CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Métodos

Los grupos de péptidos HLA obtenidos se separaron de acuerdo con su hidrofobicidad mediante cromatografía de fase inversa (sistema Acquity UPLC, Waters) y los péptidos de elución se analizaron en un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Los grupos de péptidos se cargaron directamente en la columna analítica microcapilar de sílice fundida (75 µm de diámetro interno x 250 mm) empaquetada con material de fase inversa C18 de 1,7 µm (Waters) con la aplicación de una velocidad de flujo de 400 nl por minuto. Posteriormente, los péptidos se separaron usando un gradiente binario de 180 minutos en dos etapas del 10 % al 33 % de B a una velocidad de flujo de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto de disolvente A (ácido fórmico al 0,1 % en agua) y disolvente B (ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo). Se usó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective) para la introducción en la fuente de nanoESI. El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo funcionar en el modo dependiente de los datos mediante el uso de una estrategia TOP5. En resumen, se inició un ciclo de exploración con una exploración completa de alta precisión de masa en la órbita (R = 30 000), que fue seguida por exploraciones MS/MS también en la órbita (R = 7500) en los 5 iones precursores más abundantes con exclusión dinámica de iones previamente seleccionados. Los espectros de masas en tándem fueron interpretados por SEQUEST y control manual adicional. La secuencia de péptidos identificada se aseguró mediante la comparación del patrón de fragmentación del péptido natural generado con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia de secuencia sintética idéntica. La figura 1 muestra un espectro ilustrativo obtenido a partir de tejido tumoral para el péptido ABCA13-001 asociado a MHC clase I y su perfil de elución en el sistema UPLC.

La cuantificación relativa por LC-MS sin marcaje se realizó mediante recuento de iones, es decir, mediante extracción y análisis de características de LC-MS (Mueller y otros, 2007a). El método supone que el área de la señal de LC-MS del péptido se correlaciona con su abundancia en la muestra. Las características extraídas se procesaron adicionalmente por deconvolución del estado de carga y alineación del tiempo de retención (Mueller y otros, 2007b; Sturm y otros, 2008). Finalmente, todas las características de LC-MS se referenciaron con los resultados de identificación de secuencia para combinar datos cuantitativos de diferentes muestras y tejidos con perfiles de presentación de péptidos. Los datos cuantitativos se normalizaron en una forma de dos niveles de acuerdo con la tendencia central para explicar la variación dentro de las réplicas técnicas y biológicas. Por lo tanto, cada péptido identificado puede asociarse con datos cuantitativos, lo que permite una cuantificación relativa entre muestras y tejidos. Además, todos los datos cuantitativos adquiridos para los candidatos peptídicos se inspeccionaron manualmente para asegurar la consistencia de los datos y verificar la precisión del análisis automatizado. Para cada péptido se calculó un perfil de presentación que muestra la presentación media de la muestra, así como las variaciones de las réplicas. El perfil yuxtapone las muestras de NSCLC a una referencia de muestras de tejido normal.

Los perfiles de presentación de péptidos ilustrativos presentados en exceso se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 2

Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos como se describen

No todos los péptidos identificados como presentados en la superficie de las células tumorales por las moléculas de MHC son adecuados para la inmunoterapia, porque la mayoría de estos péptidos se derivan de proteínas celulares normales expresadas por muchos tipos de células. Solo unos pocos de estos péptidos están asociados a tumores y probablemente puedan inducir células T con una alta especificidad de reconocimiento para el tumor del que derivaron. Para identificar tales péptidos y minimizar el riesgo de autoinmunidad inducida por la vacunación, los inventores se centraron en aquellos péptidos que se derivan de proteínas que se sobreexpresan en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

El péptido ideal se derivará de una proteína que es única para el tumor y no está presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que se derivan de genes con un perfil de expresión similar al ideal, los péptidos identificados se

asignaron a las proteínas y genes, respectivamente, de los cuales se derivaron y se generaron los perfiles de expresión de estos genes.

Fuentes de ARN y preparación

Las muestras de tejido extirpadas quirúrgicamente fueron proporcionadas por la Universidad de Heidelberg, Heidelberg, Alemania (véase el Ejemplo 1) después de obtener el consentimiento informado por escrito de cada paciente. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la cirugía y luego se homogeneizaron con mortero y pilón en nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras mediante el uso del reactivo TRI (Ambion, Darmstadt, Alemania) seguido de una limpieza con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El ARN total de los tejidos humanos sanos se obtuvo comercialmente (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Amsterdam, Países Bajos; BioChain, Hay-ward, CA, EE. UU.). El ARN de varios individuos (entre 2 y 123 individuos) se mezcló de tal manera que el ARN de cada individuo se ponderó por igual.

La calidad y la cantidad de todas las muestras de ARN se evaluaron en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) mediante el uso del kit 6000 Pico LabChip para ARN (Agilent).

Experimentos de micromatrices

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se realizó mediante microarreglos de oligonucleótidos Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de Affymetrix. Brevemente, se sintetizó ADNc bicatenario a partir de 5-8 µg de ARN total, mediante el uso de SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) como se describe en el manual. La transcripción *in vitro* se realizó con el kit de marcaje de transcritos de ARN de alto rendimiento BioArray (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.) para las matrices U133A o con el kit de marcaje GeneChip IVT (Affymetrix) para las matrices U133 Plus 2.0, seguido de Fragmentación de ARNc, hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos). Las imágenes se escanearon con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), con el uso de la configuración predeterminada para todos los parámetros. Para la normalización, se utilizaron 100 genes de referencia proporcionados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de las relaciones de registro de señal proporcionadas por el software y la muestra de riñón normal se ajustó arbitrariamente a 1,0.

En la Figura 2 se muestran perfiles de expresión ilustrativos de genes fuente según se describe que están altamente sobreexpresados o expresados exclusivamente en carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

Ejemplo 4

Inmunogenicidad *in vitro* para péptidos presentados por MHC clase I de NSCLC

Con el fin de obtener información sobre la inmunogenicidad de los TUMAP descritos, realizamos investigaciones utilizando un ensayo de sensibilización de células T *in vitro* basado en estimulaciones repetidas de células T CD8+ con células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) cargadas con complejos de péptidos/MHC y anticuerpo anti-CD28. De esta manera, podríamos demostrar inmunogenicidad para 9 TUMAP restringidos a HLA-A*0201 como se describe hasta ahora, lo que demuestra que estos péptidos son epítopos de células T contra los cuales existen células T precursoras CD8+ en humanos (Tabla 4).

Sensibilización *in vitro* de células T CD8+

Para realizar estimulaciones *in vitro* mediante células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos células T CD8+ de productos de leucoféresis HLA-A*02 frescos mediante selección positiva con el uso de microperlas CD8 (Mil Tenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania) de donantes sanos obtenidos de Transfusion Medicine Tuebingen, Alemania, después del consentimiento informado.

Se incubaron linfocitos CD8+ aislados o PBMC hasta su uso en medio de células T (TCM) que consiste en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10 % (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), Penicilina 100 U/ml /Estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Cologne, Alemania), piruvato de sodio 1 mM (CC Pro, Ober-dorla, Alemania), gentamicina a 20 µg/ml (Cambrex). En este paso también se agregaron IL-7 a 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 a 10 U/ml (Novartis Pharma, Nürnberg, Alemania).

La generación de perlas recubiertas con pMHC/anti-CD28, estimulaciones y lectura de células T se realizó en un sistema *in vitro* altamente definido mediante el uso de cuatro moléculas de pMHC diferentes por condición de estimulación y 8 moléculas de pMHC diferentes por condición de lectura.

Todos los complejos de pMHC usados para la carga de aAPC y la lectura citométrica se derivaron del intercambio de ligando de MHC inducido por UV (Rodenko y otros, 2006) con modificaciones menores. Para determinar la cantidad de monómero pMHC que se obtuvo por intercambio, realizamos ELISA de sandwich basados en estreptavidina de acuerdo con (Rodenko y otros, 2006).

El Ac 9.3 IgG2a de ratón coestimulador purificado anti CD28 humano (Jung y otros, 1987) se biotiniló químicamente mediante el uso de sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina según lo recomendado por el fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las perlas utilizadas fueron partículas de poliestireno recubiertas con estreptavidina de 5,6 µm de diámetro (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.).

Los pMHC utilizados para las estimulaciones de control positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 modificado) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5), respectivamente.

Se recubrieron 800 000 perlas/200 µl en placas de 96 pocillos en presencia de 4 x 12,5 ng de biotina-pMHC diferentes, se lavaron y se añadieron 600 ng de biotina anti-CD28 posteriormente en un volumen de 200 µl. Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos mediante la incubación conjunta de $1x10^6$ células T CD8+ con $2x10^5$ perlas recubiertas lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 a 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37 °C. La mitad del medio se intercambió por TCM fresco suplementado con IL-2 a 80 U/ml y la incubación continuó durante 3-4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se realizó un total de tres veces. Para la lectura del multímero pMHC mediante el uso de 8 moléculas de pMHC diferentes por condición, se utilizó un enfoque de codificación combinatoria bidimensional como se describió previamente (Andersen y otros, 2012) con modificaciones menores que abarcan el acoplamiento a 5 fluorocromos diferentes. Finalmente, se realizaron análisis multiméricos mediante tinción de las células con colorante cercano al IR para células vivas/muertas (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), clon de anticuerpo para CD8-FITC SKI (BD, Heidelberg, Alemania) y multímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis, se utilizó un citómetro LSRII SORP de BD equipado con láseres y filtros apropiados. Las células específicas para el péptido se calcularon como porcentaje del total de células CD8+. La evaluación del análisis multimérico se realizó mediante el uso del software FlowJo (Tree Star, Oregon, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de linfocitos multímero+ CD8+ específicos se detectó mediante la comparación con estimulaciones control negativas. Se detectó inmunogenicidad para un antígeno dado si se encontró que al menos un pocillo estimulado *in vitro* evaluable de un donante sano contenía una línea de células T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (es decir, este pocillo contenía al menos 1 % de células multímero+ específicas entre las células T CD8+ y el porcentaje de células multímero+ específicas fue al menos 10 veces la mediana de las estimulaciones control negativas).

Inmunogenicidad *in vitro* para péptidos de NSCLC

Para los péptidos HLA clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* pudo demostrarse mediante la generación de líneas de células T específicas para los péptidos. En la figura 4 se muestran resultados ilustrativos de citometría de flujo después de la tinción para multímeros específicos de TUMAP para dos péptidos según se describen, junto con los controles negativos correspondientes. Los resultados para 25 péptidos según se describen se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos de HLA clase I según se describen

Resultados ilustrativos de experimentos de inmunogenicidad *in vitro* realizados por el solicitante de los péptidos según se describen. <20 % = +; 20 % - 49 % = ++; 50 % - 70 %= +++; y > 70 % = ++++

SEQ ID NO:	Pocillos	Donantes
1	+	++
2	+	++
3	+	++
4	+	++
7	++	++++
8	+	++
9	+	+
10	+	++
11	++	++++ (100 %)
15	++	++
16	+	++
19	+	++
18	+	+++
21	++	++
22	+	+++
24	+	++
30	+	++
31	+	+++
32	+	+++
33	+	+++
35	+	++
37	+	++++ (100 %)
38	+	++
39	+	++
40	+	++
42	++	++++ (100 %)
43	+	+++
44	+	++
45	+	+
46	+	+++
47	+	++
48	+	+
52	+	+
53	++	++
54	+	++
55	+	++

SEQ ID NO:	Pocillos	Donantes
56	++	++++ (100 %)
62	++	++++
57	+	++
59	+	+++
60	+++	++++ (100 %)
61	+	+++
63	+	++
64	+	+++
65	++	+++
66	+	+++
67	+	++
68	+	+
69	++	+++
70	+	+++
71	+	+++
72	+	+++
73	+	++
74	+	+++
75	+	++
78	++	++
79	+	++++
80	+	++
81	+	++
85	++	++++
86	+	++
87	+	+++
88	+	++
92	+	++

Ejemplo 5

Síntesis de péptidos.

Todos los péptidos se sintetizaron mediante el uso de síntesis de péptidos en fase sólida estándar y bien establecida con la estrategia Fmoc. Después de la purificación por RP-HPLC preparativa, se realizó un procedimiento de intercambio iónico para incorporar contraiones fisiológicamente compatibles (por ejemplo, trifluoroacetato, acetato, amonio o cloruro).

La identidad y la pureza de cada péptido individual se han determinado por espectrometría de masas y RP-HPLC analítica. Después del procedimiento de intercambio iónico, los péptidos se obtuvieron como liofilizados de color blanco a blanquecino con purezas del 90 % al 99,7 %.

Todos los TUMAP se administran preferiblemente como sales de trifluoroacetato o sales de acetato, también son posibles otras formas de sal. Para las medidas del ejemplo 4, se usaron sales de trifluoroacetato de los péptidos.

Ejemplo 6

Intercambio de ligando UV

Los péptidos candidatos para las vacunas como se describe se probaron adicionalmente para determinar su inmunogenicidad mediante ensayos de sensibilización *in vitro*. Los complejos de péptido-MHC individuales requeridos para estos ensayos se produjeron mediante radiación UV-intercambio de ligando, donde un péptido sensible a UV se escinde tras la irradiación UV, y se intercambia con el péptido de interés según se analiza. Solo los candidatos a péptidos que pueden unirse y estabilizar efectivamente las moléculas de MHC receptoras de péptidos evitan la disociación de los complejos de MHC. Para determinar el rendimiento de la reacción de intercambio, se realizó un ELISA basado en la detección de la cadena ligera (β2m) de complejos de MHC estabilizados. El ensayo se realizó como se describe generalmente en Rodenko y otros (Rodenko B, Toebes M, Hadrup SR, van Esch WJ, Molenaar AM, Schumacher TN, Ovaa H. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. Nat Protoc. 2006;1(3):1120-32).

Las placas MAXISorp de 96 pocillos (NUNC) se revistieron durante una noche con estreptavidina 2 µg/ml en PBS a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces y se bloquearon durante 30 minutos a 37 ºC en tampón de bloqueo que contenía BSA al 2 %. Los monómeros HLA-A*0201/MLA-001 replegados sirvieron como patrones, cubriendo el intervalo de 8-500 ng/ml. Los monómeros péptido-MHC de la reacción de UV-intercambio se diluyeron 100 veces en tampón de bloqueo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron cuatro veces, se incubaron con 2 µg/ml de anti-β2m conjugado con HRP durante 1 hora a 37 °C, se lavaron nuevamente y se detectaron con una solución TMB que se detuvo con NH_2SO_4. La absorción se midió a 450 nm.

Tabla 6: Radiación UV-Intercambio de ligandos

SEQ ID NO.	Nombre del péptido	Rendimiento promedio de intercambio en %	Rendimiento de intercambio
81	ANKS1A-001	78	++++
87	AURKB-001	54	+++
85	BUB1B-001	59	+++
48	SNRNP20-001	54	+++
80	CEP192-001	56	+++
90	COG4-001	57	+++
89	IFT81-001	57	+++
83	MDN1-001	67	+++
82	CEP250-002	70	+++
91	NCBP1-001	65	+++
92	NEFH-001	50	++
84	OLFM1-001	48	++
86	PI4KA-001	51	+++
11	SLC3A2-001	56	+++
78	SLI-001	47	++
79	TLX3-001	70	+++
2	MMP12-003	57	+++
68	FAP-003	31	++
66	IGF2BP3-001	46	++
4	DST-001	50	++
5	MXRA5-001	57	+++
31	GFPT2-001	43	++
1	ABCA13-001	93	++++
6	DST-002	59	+++

SEQ ID NO.	Nombre del péptido	Rendimiento promedio de intercambio en %	Rendimiento de intercambio
40	MXRA5-002	56	+++
49	SAMSN1-001	47	++
8	HNRNPH-001	26	++
69	WNT5A-001	37	++
15	IL8-001	41	++
50	STAT2-001	69	+++
72	ADAM8-001	67	+++
73	COL6A3-002	81	++++
18	VCAN-001	41	++
12	SMYD3-001	50	++
3	ABCA13-002	36	++
35	BNC1-001	43	++
7	CDK4-001	45	++
19	DROSHA-001	68	+++
33	GALNT2-001	73	++++
13	AKR-001	13	+
39	LAMC2-001	61	+++
56	RAD54B-001	48	++
24	COL12A1-002	55	+++
43	CSE1-001	55	+++
45	SEC61G-001	18	+
47	PCNXL3-001	87	++++
9	TANC2-001	71	++++
70	TPX2-001	56	+++
17	HUWE1-001	45	++
54	TACC3-001	54	+++
32	CERC-001	62	+++
26	SERPINB3-001	47	++
58	CCNA2-001	54	+++
44	DPYSL4-001	77	++++
27	KIF26B-001	68	+++
51	CNOT1-001	57	+++
11	SLC34A2-001	51	+++
30	RGS4-001	49	++
20	VCAN-002	49	++
67	CDC6-001	48	++
74	THY1-001	65	+++
10	RNF213-001	84	++++

SEQ ID NO.	Nombre del péptido	Rendimiento promedio de intercambio en %	Rendimiento de intercambio
61	RCN1-001	75	++++
37	FZD-001	52	+++
71	HMMR-001	49	++
60	C11orf24-001	47	++
53	JUNB-001	51	+++
25	ELANE-001	62	+++
61	RCC1-001	77	++++
62	MAGEF1-001	83	++++
22	ACACA-001	61	+++
21	PLEKHA8-001	47	++
57	EEF2-002	31	++
41	HSP-002	47	++
38	ATP-001	19	+
46	ORMDL1-002	61	+++
59	NET1-001	82	++++
63	NCAPD2-001	76	++++
42	VPS13B-001	63	+++
64	C12orf44-001	34	++
23	ITGA11-001	53	+++
75	DIO2-001	50	++
28	ANKH-001	52	+++
65	HERC4-001	61	+++
16	P2RY6-001	91	++++

Los péptidos candidatos que muestran un alto rendimiento de intercambio (es decir, superior al 40 %, preferiblemente superior al 50 %, con mayor preferencia superior al 70 % y con la máxima preferencia superior al 80 %) se prefieren generalmente para una generación y producción de anticuerpos o fragmentos de estos, y/o receptores de células T o fragmentos de estos, ya que muestran suficiente avidez por las moléculas MHC y evitan la disociación de los complejos de MHC.

Ejemplo 7

Unión e inmunogenicidad de péptidos y MHC clase II seleccionados

Las proteínas HLA clase II se dividen en 3 isotipos principales HLA-DR, DP, DQ que están codificados por numerosos haplotipos. La combinación de varias cadenas α y β aumenta la diversidad de las proteínas HLA clase II encontradas en una población arbitraria. Por lo tanto, los TUMAP de HLA clase II seleccionados deben unirse a varias moléculas de HLA-DR diferentes (es decir, mostrar una capacidad de unión promiscua) para poder contribuir a una respuesta efectiva de células T en un porcentaje significativo de pacientes.

La unión promiscua de POSTN-002 y MMP12-002 a varios haplotipos HLA-DR y la estabilidad de los complejos formados se evaluó en un ensayo de unión *in vitro* por un proveedor de servicios externo de la siguiente manera.

Materiales y métodos

Lista de péptidos

Secuencia núm.	ID del péptido	Secuencia	Origen	Tamaño
76	MMP12-002	INNYTPDMNREDVDYAIR	IMA-942	18
77	POSTN-002	TNGVIHVVDKLLYPADT	IMA-942	17

Lista de haplotipos HLA-DR investigados

Los 7 haplotipos HLA-DR investigados se seleccionan de acuerdo con sus frecuencias en la población norteamericana HLA-A*02 y HLA-A*24 positiva (Tabla 7.1 y 7.2)

Los datos se derivan del análisis de 1,35 millones de voluntarios con determinación del tipo de HLA, registrados en el Programa Nacional de Donantes de Médula (Mori y otros, 1997). La población analizada se subdividió en los siguientes grupos étnicos: caucásicos estadounidenses (N = 997,193), afroamericanos (N = 110,057), asiáticos americanos (N = 81,139), latinoamericanos (N = 100,128) y nativos americanos (N = 19,203).

Tabla 7.1 Frecuencias de haplotipos en norteamericanos positivos para HLA-A*02: Los haplotipos analizados están resaltados en gris.

Haplotipo serológico		Frecuencia del haplotipo [% de individuos positivos para HLA-A*02]				
HLA-A	HLA-DR	Caucásico	Africano	Asiático	Latino	Americano nativo
2	1	8,8	7,8	3,0	6,1	6,8
2	2	14,9	13,8	17,6	9,7	13,8
2	3	6,1	11,1	1,8	5,3	5,5
2	4	21,3	9,4	15,7	23,6	24,9
2	5	1,2	2,3	1,0	1,3	1,8
2	6	15,2	20,0	11,5	17,7	15,9
2	7	13,0	10,5	2,5	7,8	9,0
2	8	4,2	5,7	10,2	16,2	8,7
2	9	1,2	2,8	16,0	1,0	2,9
2	10	1,4	2,4	1,2	1,3	0,8
2	11	8,7	10,6	5,2	6,4	4,8
2	12	2,6	2,8	12,3	1,8	1,9
2	90	1,4	0,8	2,0	1,7	3,3
SUMA		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabla 7.2 Frecuencias de haplotipos en norteamericanos positivos para HLA-A*24: los haplotipos analizados se resaltan en gris.

Haplotipo serológico		Frecuencia del haplotipo [% de individuos positivos para HLA-A*24]				
HLA-A	HLA-DR	Caucásico	Africano	Asiático	Latino	Americano nativo
24	1	8,2	7,9	5,4	4,1	4,6
24	2	15,7	18,8	24,6	10,7	14,8
24	3	6,0	7,5	1,4	3,7	4,0
24	4	14,9	14,4	19,8	25,8	21,6
24	5	2,0	1,6	1,4	2,7	1,0
24	6	17,0	18,7	9,6	20,5	20,7
24	7	9,2	7,9	2,5	4,8	4,3
24	8	4,0	3,8	5,7	12,4	11,3
24	9	1,4	1,7	9,9	0,7	5,8
24	10	1,6	1,2	0,8	2,0	0,6
24	11	16,5	8,0	5,2	9,0	5,4
24	12	1,8	7,5	11,5	2,2	2,4
24	90	1,6	1,0	2,2	1,3	3,3
SUMA		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Principio de la prueba

El ensayo de unión péptido-MHC REVEAL® de ProImmune determina la capacidad de cada péptido candidato para unirse al haplotipo de HLA clase II seleccionado y estabilizar el complejo HLA-péptido. De este modo, los péptidos candidatos se ensamblan *in vitro* con una proteína HLA clase II particular. El nivel de incorporación de péptidos en las moléculas de HLA se mide por la presencia o ausencia de la conformación nativa del complejo ensamblado HLA-péptido en el momento 0 después de completar el procedimiento de replegamiento (denominado velocidad de activación).

La capacidad de unión del péptido candidato a una molécula de HLA particular se compara con el que tiene propiedades de unión muy fuertes (control positivo) que da como resultado la puntuación correspondiente de la unión MHC-péptido REVEAL®. El péptido de control positivo es seleccionado y proporcionado por ProImmune sobre la base de su experiencia individualmente para cada haplotipo HLA.

Además de la afinidad de un péptido con una molécula de HLA particular, la estabilidad duradera del complejo HLA-péptido formado es crucial para la aparición de una respuesta inmunitaria. Por consiguiente, la presencia del complejo HLA-péptido formado se mide después de su incubación durante 24 horas a 37 °C. En consecuencia, la estabilidad del complejo MHC-péptido formado se calcula como una proporción de las puntuaciones de unión a las 24 horas y las puntuaciones de unión que se reciben justo después del replegamiento (correspondiente en el momento 0) en por ciento.

Resultados

El análisis de POSTN-002 y MMP12-002 en el ensayo de unión de péptido-MHC REVEAL® mostró que ambos péptidos se unen a varios haplotipos HLA. Se demostró que POSTN-002 forma un complejo con 5 y MMP12-002 con 4 de 7 haplotipos de HLA investigados (Figura 5). Ninguno de ambos péptidos se unió a HLA-DR3 ni HLA-DR6. Las puntuaciones de unión detectada estaban dentro del intervalo de 0,02 a aproximadamente 2,5 % en comparación con el control positivo, y claramente por encima de las puntuaciones de los péptidos que no se unieron.

El análisis de estabilidad de los complejos HLA-POSTN-002 y HLA-MMP12-002 formados reveló que 3 y 2 de los 6 complejos HLA-péptido investigados eran estables después de 24 horas a 37 °C, respectivamente (Figura 6).

Se puede llegar a una conclusión sobre la inmunogenicidad de un péptido en función de su capacidad de unión a una molécula de HLA mediante la comparación de la puntuación de unión de este péptido con el de inmunogenicidad conocida. Por lo tanto, se seleccionaron cinco péptidos bien investigados con inmunogenicidad determinada para esta comparación. La inmunogenicidad de estos péptidos se determinó *ex vivo* en muestras de sangre de pacientes vacunados mediante el uso de células T CD4 con tinción de citocina intracelular (ICS).

En principio, los ensayos de ICS analizan la calidad de las células T específicas en términos de funciones efectoras. Por lo tanto, las células mononucleares periféricas (PBMC) fueron cultivadas in vitro y posteriormente estimuladas de nuevo por el péptido de interés, un péptido de referencia y un control negativo (aquí MOCK). Después las células reestimuladas se tiñeron para la producción de FN-gamma, TNF-alfa, IL-2 e IL-10, así como la expresión de la molécula coestimuladora CD154. El conteo de las células afectadas se realizó en un citómetro de flujo (Figura 7).

El análisis de inmunogenicidad reveló una respuesta inmunitaria del 100 % por vacunación con péptidos IMA950 (BIR-002 y MET-005) en 16 pacientes y una respuesta inmunitaria del 44 % al 86 % por vacunación con péptidos IMA910 (CEA-006, TGFBI-004 y MMP-001) en 71 pacientes.

Para comparar las puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 con las puntuaciones de unión de los péptidos IMA910 e IMA950, todos los péptidos se organizaron en una tabla para cada haplotipo HLA-DR investigado de acuerdo con la puntuación de unión detectada (Tablas 8.1 a 8.5).

Tabla 8.1 Puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a HLA-DR1 en comparación con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II con inmunogenicidad conocida: POSTN-002 y MMP12-002 están resaltados en gris.

Rango de péptidos	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR1
1	BIR-002	IMA950	40,06
2	CEA-006	IMA910	1,31
3	MET-005	IMA950	0,87
4	POSTN-002	IMA-942	0,24
5	MMP-001	IMA901	0,19
6	MMP12-002	IMA-942	0,04
7	TGFBI-004	IMA910	0,03

Tabla 8.2 Puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a HLA-DR2 en comparación con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II con inmunogenicidad conocida: POSTN-002 y MMP12-002 están resaltados en gris.

Rango de péptidos	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR2
1	MMP12-002	IMA-942	2,43
2	MMP-001	IMA901	0,7
3	POSTN-002	IMA-942	0,68
4	MET-005	IMA950	0,28
5	TGFBI-004	IMA910	0,28
6	BIR-002	IMA950	0,05
7	CEA-006	IMA910	0,03

Tabla 8.3 Puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a HLA-DR4 en comparación con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II con inmunogenicidad conocida: POSTN-002 y MMP12-002 están resaltados en gris.

Rango de péptidos	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR4
1	CEA-006	IMA910	39,65
2	BIR-002	IMA950	6,12
3	MET-005	IMA950	5,89
4	MMP12-002	IMA-942	074
5	MMP-001	IMA90l	0,06
6	POSTN-002	IMA-942	0,02
7	TGFBI-004	IMA910	0,02

Tabla 8.4 Puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a HLA-DR5 en comparación con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II con inmunogenicidad conocida: POSTN-002 y MMP12-002 están resaltados en gris.

Rango de péptidos	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR5
1	BIR-002	IMA950	103,9
2	MMP-001	IMA901	47,82
3	CEA-006	IMA910	24,27
4	MET-005	IMA950	0,12
5	POSTN-002	IMA-942	0,08
6	MMP12-002	IMA-942	0,04
7	TGFBI-004	IMA910	0,04

Tabla 8.5 Puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 a HLA-DR7 en comparación con las puntuaciones de unión de péptidos de clase II con inmunogenicidad conocida: POSTN-002 y MMP12-002 están resaltados en gris.

Rango de péptidos	Código del péptido	Origen	Puntuación de unión relativa HLA-DR7
1	MET-005	IMA950	3,69
2	CEA-006	TMA910	0,63
3	POSTN-002	IMA-942	0,47
4	BIR-002	IMA950	0,27
5	TGFBI-004	IMA910	0,01
6	MMP-001	IMA901	0
7	MMP12-002	IMA-942	0

La comparación de las puntuaciones de unión de POSTN-002 y MMP12-002 con las puntuaciones de unión de los otros péptidos de clase II con inmunogenicidad conocida mostró que las capacidades de unión de ambos péptidos se encuentran principalmente en el medio hasta la mitad inferior de las tablas con excepción de HLA-DR2. Las capacidades de unión de ambos péptidos a HLA-DR2 se encuentran en la mitad superior de la tabla, donde MMP12-002 es el principal candidato. En base a este análisis, se debe esperar que ambos péptidos, POSTN-002 y MMP12-002, induzcan también

una respuesta inmunitaria.

Lista de referencia

Acuff HB, Sinnamon M, Fingleton B, Boone B, Levy SE, Chen X, Pozzi A, Carbone DP, Schwartz DR, Moin K, Sloane BF, Matrisian LM (2006). Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer. Cancer Res 66, 7968-7975.

Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. Cell 123, 409-421.

Albig AR, Schiemann WP (2005). Identification and characterization of regulator of G protein signaling 4 (RGS4) as a novel inhibitor of tubulogenesis: RGS4 inhibits mitogen-activated protein kinases and vascular endothelial growth factor signaling. Mol. Biol. Cell 16, 609-625.

Allison JP, Krummel MF (1995). The Yin and Yang of T cell costimulation. Science 270, 932-933.

An CH, Kim YR, Kim HS, Kim SS, Yoo NJ, Lee SH (2012). Frameshift mutations of vacuolar protein sorting genes in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. Hum. Pathol. 43, 40-47.

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.

Araki W, Takahashi-Sasaki N, Chui DH, Saito S, Takeda K, Shirotani K, Takahashi K, Murayama KS, Kametani F, Shiraishi H, Komano H, Tabira T (2008). A family of membrane proteins associated with presenilin expression and gamma-secretase function. FASEB J 22, 819-827.

Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Hesselgesser J, Horuk R, Strieter RM (1997). The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. J Leukoc. Biol. 62, 554-562.

Asteriti IA, Rensen WM, Lindon C, Lavia P, Guarguaglini G (2010). The Aurora-A/TPX2 complex: a novel oncogenic holoenzyme? Biochim. Biophys. Acta 1806, 230-239.

Aylsworth A, Jiang SX, Desbois A, Hou ST (2009). Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth. Exp. Cell Res. 315, 2856-2868.

Badiglian FL, Oshima CT, De Oliveira LF, De Oliveira CH, De Sousa DR, Gomes TS, Goncalves WJ (2009). Canonical and noncanonical Wnt pathway: a comparison among normal ovary, benign ovarian tumor and ovarian cancer. Oncol Rep. 21, 313-320.

Bargo S, Raafat A, McCurdy D, Amirjazil I, Shu Y, Traicoff J, Plant J, Vonderhaar BK, Callahan R (2010). Transforming acidic coiled-coil protein-3 (Tacc3) acts as a negative regulator of Notch signaling through binding to CDC10/Ankyrin repeats. Biochem. Biophys. Res Commun. 400, 606-612.

Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K, Verhoeven G, Swinnen JV (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. Cancer Res. 67, 8180-8187.

Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ (1990). Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science 248, 850-854.

Behrens P, Brinkmann U, Fogt F, Wernert N, Wellmann A (2001). Implication of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene for breast cancer development. Anticancer Res. 21, 2413-2417.

Belaaouaj A, Kim KS, Shapiro SD (2000). Degradation of outer membrane protein A in Escherichia coli killing by neutrophil elastase. Science 289, 1185-1188.

Beljan PR, Durdov MG, Capkun V, Ivcevic V, Pavlovic A, Soljic V, Peric M (2012). IMP3 can predict aggressive behaviour of lung adenocarcinoma. Diagn. Pathol. 7, 165.

Benaglio P, McGee TL, Capelli LP, Harper S, Berson EL, Rivolta C (2011). Next generation sequencing of pooled samples reveals new SNRNP200 mutations associated with retinitis pigmentosa. Hum. Mutat. 32, E2246-E2258.

Bennett G, Sadlier D, Doran PP, Macmathuna P, Murray DW (2011). A functional and transcriptomic analysis of NET1 bioactivity in gastric cancer. BMC. Cancer 11, 50.

Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM (2009). Endoplasmic reticulum Ca2+-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. J Exp. Clin Cancer Res. 28, 25.

Bird AW, Hyman AA (2008). Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. J Cell Biol. 182, 289-300.

Boni R, Wellmann A, Man YG, Hofbauer G, Brinkmann U (1999). Expression of the proliferation and apoptosis-associated CAS protein in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. Am. J Dermatopathol. 21, 125-128. Brandt S, Ellwanger K, Beuter-Gunia C, Schuster M, Hausser A, Schmitz I, Beer-Hammer S (2010). SLy2 targets the nuclear SAP30/HDAC1 complex. Int. J Biochem. Cell Biol. 42, 1472-1481.

Brozic P, Turk S, Rizner TL, Gobec S (2011). Inhibitors of aldo-keto reductases AKR1C1-AKR1C4. Curr. Med. Chem. 18, 2554-2565.

Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F (2004). From production of peptides in milligram amounts for research to multitons quantities for drugs of the future. Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43.

Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Moller M, Eriksen JA, Gaudernack G (2006). Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Immunol. Immunother. 55, 1553-1564.

Brusselmans K, De SE, Verhoeven G, Swinnen JV (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. Cancer Res. 65, 6719-6725.

Brustmann H (2004). Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. Gynecol. Oncol 92, 268-276. Bukau B, Horwich AL (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92, 351-366.

Byrns MC, Jin Y, Penning TM (2011). Inhibitors of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3): overview and structural insights. J Steroid Biochem. Mol. Biol. 125, 95-104.

Calabrese F, Lunardi F, Balestro E, Marulli G, Perissinotto E, Loy M, Nannini N, Valente M, Saetta M, Agostini C, Rea F (2012). Serpin B4 isoform overexpression is associated with aberrant epithelial proliferation and lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. Pathology 44, 192-198.

Cao X, Coskun U, Rossle M, Buschhorn SB, Grzybek M, Dafforn TR, Lenoir M, Overduin M, Simons K (2009). Golgi protein FAPP2 tubulates membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 106, 21121-21125.

Cataldo DD, Gueders MM, Rocks N, Sounni NE, Evrard B, Bartsch P, Louis R, Noel A, Foidart JM (2003). Pathogenic role of matrix metalloproteases and their inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease and therapeutic relevance of matrix metalloproteases inhibitors. Cell Mol. Biol. (Noisy, -le-grand) 49, 875-884.

Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. Cancer Res. 66, 5287-5294.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. Mol. Cell Biochem. 253, 269-285.

Chami M, Gozuacik D, Saigo K, Capiod T, Falson P, Lecoeur H, Urashima T, Beckmann J, Gougeon ML, Claret M, le MM, Brechot C, Paterlini-Brechot P (2000). Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. Oncogene 19, 2877-2886.

Chandler S, Cossins J, Lury J, Wells G (1996). Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein. Biochem. Biophys. Res Commun. 228, 421-429.

Chang CC, Tai CJ, Su TC, Shen KH, Lin SH, Yeh CM, Yeh KT, Lin YM, Jiang MC (2012). The prognostic significance of nuclear CSE1L in urinary bladder urothelial carcinomas. Ann. Diagn. Pathol. 16, 362-368.

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.

Chen CY, Fang HY, Chiou SH, Yi SE, Huang CY, Chiang SF, Chang HW, Lin TY, Chiang IP, Chow KC (2011a). Sumoylation of eukaryotic elongation factor 2 is vital for protein stability and anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma cells. Cancer Sci. 102, 1582-1589.

Chen CY, Fang HY, Chiou SH, Yi SE, Huang CY, Chiang SF, Chang HW, Lin TY, Chiang IP, Chow KC (2011b). Sumoylation of eukaryotic elongation factor 2 is vital for protein stability and anti-apoptotic activity in lung adenocarcinoma cells. Cancer Sci. 102, 1582-1589.

Chen D, Brooks CL, Gu W (2006). ARF-BP1 as a potential therapeutic target. Br. J Cancer 94, 1555-1558.

Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W (2005a). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Cell 121, 1071-1083.

Chen DR, Chien SY, Kuo SJ, Teng YH, Tsai HT, Kuo JH, Chung JG (2010a). SLC34A2 as a novel marker for diagnosis and targeted therapy of breast cancer. Anticancer Res. 30, 4135-4140.

Chen J, Emara N, Solomides C, Parekh H, Simpkins H (2010b). Resistance to platinum-based chemotherapy in lung cancer cell lines. Cancer Chemother. Pharmacol. 66, 1103-1111.

Chen JF, Zhang LJ, Zhao AL, Wang Y, Wu N, Xiong HC, Liang Z, Li JY, Huang XF, Yang Y (2005b). [Abnormal expression of Thy-1 as a novel tumor marker in lung cancer and its prognostic significance]. Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi. 85, 1921-1925.

Chen P, Wang SJ, Wang HB, Ren P, Wang XQ, Liu WG, Gu WL, Li DQ, Zhang TG, Zhou CJ (2012). The distribution of IGF2 and IMP3 in osteosarcoma and its relationship with angiogenesis. J Mol. Histol. 43, 63-70.

Cho NH, Hong KP, Hong SH, Kang S, Chung KY, Cho SH (2004). MMP expression profiling in recurred stage IB lung cancer. Oncogene 23, 845-851.

Choi KU, Yun JS, Lee IH, Heo SC, Shin SH, Jeon ES, Choi YJ, Suh DS, Yoon MS, Kim JH (2010). Lysophosphatidic acid-induced expression of periostin in stromal cells: Prognoistic relevance of periostin expression in epithelial ovarian cancer. Int J Cancer.

Chong IW, Chang MY, Chang HC, Yu YP, Sheu CC, Tsai JR, Hung JY, Chou SH, Tsai MS, Hwang JJ, Lin SR (2006). Great potential of a panel of multiple hMTH1, SPD, ITGA11 and COL11A1 markers for diagnosis of patients with non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 16, 981-988.

Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S (1997). Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. Cancer 80, 1489-1496.

Chung FY, Cheng TL, Chang HJ, Chiu HH, Huang MY, Chang MS, Chen CC, Yang MJ, Wang JY, Lin SR (2010). Differential gene expression profile of MAGE family in taiwanese patients with colorectal cancer. J Surg. Oncol 102, 148-153.

Ciocca DR, Calderwood SK (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress. Chaperones. 10, 86-103.

Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL (1992). Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. Cancer Res. 52, 3648-3654.

Claudio JO, Zhu YX, Benn SJ, Shukla AH, McGlade CJ, Falcioni N, Stewart AK (2001). HACS1 encodes a novel SH3-SAM adaptor protein differentially expressed in normal and malignant hematopoietic cells. Oncogene 20, 5373-5377.

Coe BP, Henderson LJ, Garnis C, Tsao MS, Gazdar AF, Minna J, Lam S, MacAulay C, Lam WL (2005). High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines. Genes Chromosomes. Cancer 42, 308-313.

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.
Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G, Pelosi G, Viale G, Pece S, Di Fiore PP (2009). Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. Oncogene 28, 2959-2968.
Cooper CR, Graves B, Pruitt F, Chaib H, Lynch JE, Cox AK, Sequeria L, van Golen KL, Evans A, Czymmek K, Bullard RS, Donald CD, Sol-Church K, Gendernalik JD, Weksler B, Farach-Carson MC, Macoska JA, Sikes RA, Pienta KJ (2008). Novel surface expression of reticulocalbin 1 on bone endothelial cells and human prostate cancer cells is regulated by TNF-alpha. J Cell Biochem. 104, 2298-2309.
Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS (2009). Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. Histopathology 55, 28-36.
Cordes C, Munzel AK, Gorogh T, Leuschner I, Ambrosch P, Gottschlich S, Hoffmann M (2010). Prognostic relevance of the proliferation marker REPP86 for laryngeal cancer. Anticancer Res 30, 3541-3547.
Creighton CJ, Bromberg-White JL, Misek DE, Monsma DJ, Brichory F, Kuick R, Giordano TJ, Gao W, Omenn GS, Webb CP, Hanash SM (2005). Analysis of tumor-host interactions by gene expression profiling of lung adenocarcinoma xenografts identifies genes involved in tumor formation. Mol. Cancer Res 3, 119-129.
D'Angelo G, Rega LR, De Matteis MA (2012). Connecting vesicular transport with lipid synthesis: FAPP2. Biochim. Biophys. Acta 1821, 1089-1095.
Da Forno PD, Pringle JH, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, Hancox RA, Fletcher A, Saldanha GS (2008). WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. Clin Cancer Res 14, 5825-5832.
de Souza Meyer EL, Dora JM, Wagner MS, Maia AL (2005). Decreased type 1 iodothyronine deiodinase expression might be an early and discrete event in thyroid cell dedifferentation towards papillary carcinoma. Clin Endocrinol. (Oxf) 62, 672-678.
Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A (1997). Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. J Intern. Med 242, 41-48.
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. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature 432, 231-235.
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.
Dharmavaram RM, Huynh AI, Jimenez SA (1998). Characterization of human chondrocyte and fibroblast type XII collagen cDNAs. Matrix Biol. 16, 343-348.
Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T (1998). Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. Am J Pathol. 153, 963-972.
Dolznig H, Schweifer N, Puri C, Kraut N, Rettig WJ, Kerjaschki D, Garin-Chesa P (2005). Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. Cancer Immun. 5, 10.
Dong-Dong L (2007). Small interfering RNA (siRNA) inhibited human liver cancer cell line SMMC7721 proliferation and tumorigenesis. Hepatogastroenterology 54, 1731-1735.
Drucker KL, Kitange GJ, Kollmeyer TM, Law ME, Passe S, Rynearson AL, Blair H, Soderberg CL, Morlan BW, Ballman KV, Giannini C, Jenkins RB (2009). Characterization and gene expression profiling in glioma cell lines with deletion of chromosome 19 before and after microcell-mediated restoration of normal human chromosome 19. Genes Chromosomes. Cancer 48, 854-864.
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.
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.
Ecimovic P, Murray D, Doran P, McDonald J, Lambert DG, Buggy DJ (2011). Direct effect of morphine on breast cancer cell function in vitro: role of the NET1 gene. Br. J Anaesth. 107, 916-923.
Ehrmann J, Strakova N, Vrzalikova K, Hezova R, Kolar Z (2008). Expression of STATs and their inhibitors SOCS and PIAS in brain tumors. In vitro and in vivo study. Neoplasma 55, 482-487.
Fang WY, Liu TF, Xie WB, Yang XY, Wang S, Ren CP, Deng X, Liu QZ, Huang ZX, Li X, Ding YQ, Yao KT (2005). Reexploring the possible roles of some genes associated with nasopharyngeal carcinoma using microarray-based detection. Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai) 37, 541-546.
Feng CJ, Li HJ, Li JN, Lu YJ, Liao GQ (2008). Expression of Mcm7 and Cdc6 in oral squamous cell carcinoma and precancerous lesions. Anticancer Res 28, 3763-3769. Findeis-Hosey JJ, Xu H (2012). Insulin-like growth factor II-messenger RNA-binding protein-3 and lung cancer. Biotech. Histochem. 87, 24-29.
Findeis-Hosey JJ, Yang Q, Spaulding BO, Wang HL, Xu H (2010). IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. Hum. Pathol. 41, 477-484.

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.
Fukuda T, Oyamada H, Isshiki T, Maeda M, Kusakabe T, Hozumi A, Yamaguchi T, Igarashi T, Hasegawa H, Seidoh T, Suzuki T (2007). Distribution and variable expression of secretory pathway protein reticulocalbin in normal human organs and non-neoplastic pathological conditions. J Histochem. Cytochem. 55, 335-345.
Gamero AM, Young MR, Mentor-Marcel R, Bobe G, Scarzello AJ, Wise J, Colburn NH (2010). STAT2 contributes to promotion of colorectal and skin carcinogenesis. Cancer Prev. Res. (Phila) 3, 495-504.
Gares SL, Pilarski LM (2000). Balancing thymocyte adhesion and motility: a functional linkage between betal integrins and the motility receptor RHAMM. Dev. Immunol 7, 209-225.
Garg M, Kanojia D, Saini S, Suri S, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010a). Germ cell-specific heat shock protein 70-2 is expressed in cervical carcinoma and is involved in the growth, migration, and invasion of cervical cells. Cancer 116, 3785-3796.
Garg M, Kanojia D, Seth A, Kumar R, Gupta A, Surolia A, Suri A (2010b). Heat-shock protein 70-2 (HSP70-2) expression in bladder urothelial carcinoma is associated with tumour progression and promotes migration and invasion. Eur. J Cancer 46, 207-215.
Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. Nat. Rev. Immunol. 6, 383-393.
Ghosh S, Albitar L, LeBaron R, Welch WR, Samimi G, Birrer MJ, Berkowitz RS, Mok SC (2010). Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. Gynecol. Oncol 119, 114-120.
Gorrin Rivas MJ, Arii S, Furutani M, Harada T, Mizumoto M, Nishiyama H, Fujita J, Imamura M (1998). Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: correlation with angiostatin generation and its clinical significance. Hepatology 28, 986-993.
Gorrin-Rivas MJ, Arii S, Mori A, Takeda Y, Mizumoto M, Furutani M, Imamura M (2000). Implications of human macrophage metalloelastase and vascular endothelial growth factor gene expression in angiogenesis of hepatocellular carcinoma. Ann Surg 231, 67-73.
Graf F, Mosch B, Koehler L, Bergmann R, Wuest F, Pietzsch J (2010). Cyclin-dependent kinase 4/6 (cdk4/6) inhibitors: perspectives in cancer therapy and imaging. Mini. Rev. Med. Chem. 10, 527-539.
Greenfield JJ, High S (1999). The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. J Cell Sci. 112 (Pt 10), 1477-1486.
Gregory KE, Keene DR, Tufa SF, Lunstrum GP, Morris NP (2001). Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: association with articular cartilage and the growth plate. J Bone Miner. Res. 16, 2005-2016.
Grunda JM, Fiveash J, Palmer CA, Cantor A, Fathallah-Shaykh HM, Nabors LB, Johnson MR (2010). Rationally designed pharmacogenomic treatment using concurrent capecitabine and radiotherapy for glioblastoma; gene expression profiles associated with outcome. Clin Cancer Res. 16, 2890-2898.
Gruter P, Tabernero C, von KC, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, Wilm M, Felber BK, Izaurralde E (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. Mol. Cell 1, 649-659.
Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, Benediktsdottir KR, Magnusdottir DN, Orlygsdottir G, Jakobsdottir M, Stacey SN, Sigurdsson A, Wahlfors T, Tammela T, Breyer JP, McReynolds KM, Bradley KM, Saez B, Godino J, Navarrete S, Fuertes F, Murillo L, Polo E, Aben KK, van Oort IM, Suarez BK, Helfand BT, Kan D, Zanon C, Frigge ML, Kristjansson K, Gulcher JR, Einarsson GV, Jonsson E, Catalona WJ, Mayordomo JI, Kiemeney LA, Smith JR, Schleutker J, Barkardottir RB, Kong A, Thorsteinsdottir U, Rafnar T, Stefansson K (2009). Genome-wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. Nat Genet. 41, 1122-1126.
Guo Y, Hsu DK, Feng SL, Richards CM, Winkles JA (2001). Polypeptide growth factors and phorbol ester induce progressive ankylosis (ank) gene expression in murine and human fibroblasts. J Cell Biochem. 84, 27-38. Hagemann T, Gunawan B, Schulz M, Fuzesi L, Binder C (2001). mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. Eur. J Cancer 37, 1839-1846.
Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y (2006). Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. Cancer Sci. 97, 113-118.
Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell 125, 887-901.
Han S, Nam J, Li Y, Kim S, Cho SH, Cho YS, Choi SY, Choi J, Han K, Kim Y, Na M, Kim H, Bae YC, Choi SY, Kim E (2010). Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. J Neurosci. 30, 15102-15112.
Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 295, 1852-1858.
Hase ME, Yalamanchili P, Visa N (2006). The Drosophila heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. J Biol. Chem. 281, 39135-39141. Hernandez I, Moreno JL, Zandueta C, Montuenga L, Lecanda F (2010). Novel alternatively spliced ADAM8 isoforms contribute to the aggressive bone metastatic phenotype of lung cancer. Oncogene 29, 3758-3769.
Hitakomate E, Hood FE, Sanderson HS, Clarke PR (2010). The methylated N-terminal tail of RCC1 is required for stabilisation of its interaction with chromatin by Ran in live cells. BMC. Cell Biol. 11, 43.
Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, Gonzalez-Duarte R (2002). ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. Genome Biol. 3, RESEARCH0027.
Ho CY, Wong CH, Li HY (2008). Perturbation of the chromosomal binding of RCC1, Mad2 and survivin causes spindle assembly defects and mitotic catastrophe. J Cell Biochem. 105, 835-846.

Hochrainer K, Mayer H, Baranyi U, Binder B, Lipp J, Kroismayr R (2005). The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. Genomics 85, 153-164.
Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taege C, Simm A, Silber RE, Burdach S (2005). Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. Clin Cancer Res 11, 1086-1092.
Honda A, Valogne Y, Bou NM, Brechot C, Faivre J (2012). An intron-retaining splice variant of human cyclin A2, expressed in adult differentiated tissues, induces a G1/S cell cycle arrest in vitro. PLoS. ONE. 7, e39249.
Honore B, Baandrup U, Vorum H (2004). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins F and H/H' show differential expression in normal and selected cancer tissues. Exp. Cell Res. 294, 199-209.
Hood FE, Royle SJ (2011). Pulling it together: The mitotic function of TACC3. Bioarchitecture. 1, 105-109. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N (2009). Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. Autophagy. 5, 973-979.
Houghton AM, Grisolano JL, Baumann ML, Kobayashi DK, Hautamaki RD, Nehring LC, Cornelius LA, Shapiro SD (2006). Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. Cancer Res 66, 6149-6155.
Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK, Shapiro SD (2010). Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. Nat Med. 16, 219-223.
Hovhannisyan RH, Carstens RP (2007). Heterogeneous ribonucleoprotein m is a splicing regulatory protein that can enhance or silence splicing of alternatively spliced exons. J Biol. Chem. 282, 36265-36274.
Hua D, Shen L, Xu L, Jiang Z, Zhou Y, Yue A, Zou S, Cheng Z, Wu S (2012). Polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 regulates cellular metastasis-associated behavior in gastric cancer. Int. J Mol. Med. 30, 1267-1274. Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005). Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 23, 8765-8773.
Huang KH, Chiou SH, Chow KC, Lin TY, Chang HW, Chiang IP, Lee MC (2010). Overexpression of aldo-keto reductase 1C2 is associated with disease progression in patients with prostatic cancer. Histopathology 57, 384-394. Huang MY, Wang HM, Tok TS, Chang HJ, Chang MS, Cheng TL, Wang JY, Lin SR (2012). EVI2B, ATP2A2, S100B, TM4SF3, and OLFM4 as potential prognostic markers for postoperative Taiwanese colorectal cancer patients. DNA Cell Biol. 31, 625-635.
Huo J, Liu Y, Ma J, Xiao S (2010). A novel splice-site mutation of ATP2A2 gene in a Chinese family with Darier disease. Arch. Dermatol. Res. 302, 769-772.
Hwang YS, Park KK, Cha IH, Kim J, Chung WY (2012). Role of insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3 in invadopodia formation and the growth of oral squamous cell carcinoma in athymic nude mice. Head Neck 34, 1329-1339.
Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y (2004). ADAM8 as a novel serological and histochemical marker for lung cancer. Clin Cancer Res. 10, 8363-8370.
Ishikawa Y, Vranka J, Wirz J, Nagata K, Bachinger HP (2008). The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. J Biol. Chem. 283, 31584-31590. Ito K, Takahashi A, Morita M, Suzuki T, Yamamoto T (2011). The role of the CNOT1 subunit of the CCR4-NOT complex in mRNA deadenylation and cell viability. Protein Cell 2, 755-763.
Iuchi S, Green H (1999). Basonuclin, a zinc finger protein of keratinocytes and reproductive germ cells, binds to the rRNA gene promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 9628-9632.
Jalbout M, Bouaouina N, Gargouri J, Corbex M, Ben AS, Chouchane L (2003). Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma. Cancer Lett. 193, 75-81. Jeng YM, Wang TH, Lu SH, Yuan RH, Hsu HC (2009). Prognostic significance of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression in gastric adenocarcinoma. Br. J Surg 96, 66-73.
Jung CK, Jung JH, Park GS, Lee A, Kang CS, Lee KY (2006). Expression of transforming acidic coiled-coil containing protein 3 is a novel independent prognostic marker in non-small cell lung cancer. Pathol. Int 56, 503-509.
Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 4611-4615.
Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M, Scott KL, Kwong LN, Xiao Y, Cordon-Cardo C, Granter SR, Ramaswamy S, Golub T, Duncan LM, Wagner SN, Brennan C, Chin L (2010). Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. PLoS. ONE. 5, e10770.
Kadara H, Lacroix L, Behrens C, Solis L, Gu X, Lee JJ, Tahara E, Lotan D, Hong WK, Wistuba II, Lotan R (2009). Identification of gene signatures and molecular markers for human lung cancer prognosis using an in vitro lung carcinogenesis system. Cancer Prev. Res (Phila) 2, 702-711.
Kamlekar RK, Simanshu DK, Gao YG, Kenoth R, Pike HM, Prendergast FG, Malinina L, Molotkovsky JG, Venyaminov SY, Patel DJ, Brown RE (2013). The glycolipid transfer protein (GLTP) domain of phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2 (FAPP2): structure drives preference for simple neutral glycosphingolipids. Biochim. Biophys. Acta 1831, 417-427.
Kanno A, Satoh K, Masamune A, Hirota M, Kimura K, Umino J, Hamada S, Satoh A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T (2008). Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. Int J Cancer 122, 2707-2718.
Kanno T, Kamba T, Yamasaki T, Shibasaki N, Saito R, Terada N, Toda Y, Mikami Y, Inoue T, Kanematsu A, Nishiyama H, Ogawa O, Nakamura E (2012). JunB promotes cell invasion and angiogenesis in VHL-defective renal cell carcinoma. Oncogene 31, 3098-3110.
Kao RH, Francia G, Poulsom R, Hanby AM, Hart IR (2003). Application of differential display, with in situ hybridization verification, to microscopic samples of breast cancer tissue. Int. J Exp. Pathol. 84, 207-212.

Kars MD, Iseri OD, Gunduz U (2011). A microarray based expression profiling of paclitaxel and vincristine resistant MCF-7 cells. Eur. J Pharmacol. 657, 4-9.
Katagiri C, Iida T, Nakanishi J, Ozawa M, Aiba S, Hibino T (2010). Up-regulation of serpin SCCA1 is associated with epidermal barrier disruption. J Dermatol. Sci. 57, 95-101.
Katoh M (2008). WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. Curr. Drug Targets. 9, 565-570. Katoh M, Katoh M (2007). STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer (Review). Int J Mol. Med 19, 273-278.
Kawata H, Shimada N, Kamiakito T, Komatsu K, Morita T, Ota T, Obayashi M, Shitara K, Tanaka A (2012). RhoC and guanine nucleotide exchange factor Netl in androgen-unresponsive mouse mammary carcinoma SC-4 cells and human prostate cancer after short-term endocrine therapy. Prostate 72, 1071-1079.
Kelly SM, Corbett AH (2009). Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes. Traffic. 10, 1199-1208.
Kennedy A, Dong H, Chen D, Chen WT (2009). Elevation of seprase expression and promotion of an invasive phenotype by collagenous matrices in ovarian tumor cells. Int J Cancer 124, 27-35.
Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. Acta Physiol (Oxf) 204, 17-33.
Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T, Shimazu K, Morishita Y, Shimazaki M, Kii I, Horie H, Nagai H, Kudo A, Fukayama M (2008). Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. J Histochem. Cytochem. 56, 753-764.
Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, Ko E, Kim Y, Kim S, Shim YM, Park J (2011). A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. Cancer 117, 4080-4091.
Kim EH, Park AK, Dong SM, Ahn JH, Park WY (2010a). Global analysis of CpG methylation reveals epigenetic control of the radiosensitivity in lung cancer cell lines. Oncogene 29, 4725-4731.
Kim HS, Kim dH, Kim JY, Jeoung NH, Lee IK, Bong JG, Jung ED (2010b). Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. Korean J Intern. Med. 25, 399-407.
Kim MY, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J (2009). Tumor self-seeding by circulating cancer cells. Cell 139, 1315-1326.
Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS (2004). [The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma]. Korean J Hepatol. 10, 62-72.
Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K (2011). Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. Int. J Cancer 128, 1524-1531.
Kloth JN, Oosting J, van WT, Szuhai K, Knijnenburg J, Gorter A, Kenter GG, Fleuren GJ, Jordanova ES (2007). Combined array-comparative genomic hybridization and single-nucleotide polymorphism-loss of heterozygosity analysis reveals complex genetic alterations in cervical cancer. BMC. Genomics 8, 53.
Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malloy MP, Soares DC, McRae AF, Condie A, White A, Hawkins W, McGhee K, van BM, MacIntyre DJ, Starr JM, Deary IJ, Visscher PM, Porteous DJ, Cannon RE, St CD, Muir WJ, Blackwood DH (2009). A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. Am J Hum. Genet. 85, 833-846.
Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Perveen R, Kivitie-Kallio S, Norio R, Warburg M, Fryns JP, de la Chapelle A, Lehesjoki AE (2003). Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. Am. J Hum. Genet. 72, 1359-1369.
Konishi N, Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Ota I, Tanaka N, Fujimoto K (2008). Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer. Clin Cancer Res. 14, 4408-4416.
Kornak U, Brancati F, Le MM, Lichtenbelt K, Hohne W, Tinschert S, Garaci FG, Dallapiccola B, Nurnberg P (2010). Three novel mutations in the ANK membrane protein cause craniometaphyseal dysplasia with variable conductive hearing loss. Am. J Med. Genet. A 152A, 870-874.
Korosec B, Glavac D, Rott T, Ravnik-Glavac M (2006). Alterations in the ATP2A2 gene in correlation with colon and lung cancer. Cancer Genet. Cytogenet. 171, 105-111.
Kramer MW, Escudero DO, Lokeshwar SD, Golshani R, Ekwenna OO, Acosta K, Merseburger AS, Soloway M, Lokeshwar VB (2010). Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. Cancer. Krieg AM (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 471-484.
Kuang P, Zhou C, Li X, Ren S, Li B, Wang Y, Li J, Tang L, Zhang J, Zhao Y (2012). Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase 2 as a potential biomarker for predicting cisplatin efficacy in advanced NSCLC patients. Lung Cancer 77, 427-432.
Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G (2008). Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. Leukemia 22, 1529-1538.
Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, Kitagawa M, Kawai H, Gaffney PM, Miyauchi M, Takata T (2006). Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. Cancer Res 66, 6928-6935.
Kwon OH, Park JL, Kim M, Kim JH, Lee HC, Kim HJ, Noh SM, Song KS, Yoo HS, Paik SG, Kim SY, Kim YS (2011). Aberrant up-regulation of LAMB3 and LAMC2 by promoter demethylation in gastric cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 406, 539-545.
Kwon YJ, Lee SJ, Koh JS, Kim SH, Kim YJ, Park JH (2009). Expression patterns of aurora kinase B, heat shock protein

47, and periostin in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Res 18, 141-151.
Labied S, Galant C, Nisolle M, Ravet S, Munaut C, Marbaix E, Foidart JM, Frankenne F (2009). Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time. Hum. Reprod. 24, 113-121.
Lau E, Zhu C, Abraham RT, Jiang W (2006). The functional role of Cdc6 in S-G2/M in mammalian cells. EMBO Rep. 7, 425-430.
Lazaris AC, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis BC (1997). Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. Breast Cancer Res. Treat. 43, 43-51.
Le CB, Rynkowski M, Le MM, Bruyere C, Lonez C, Gras T, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Ruysschaert JM, Kiss R, Lefranc F (2010). Long-term in vitro treatment of human glioblastoma cells with temozolomide increases resistance in vivo through up-regulation of GLUT transporter and aldo-keto reductase enzyme AKR1C expression. Neoplasia. 12, 727-739.
Lee KH, Kim JR (2012). Regulation of HGF-mediated cell proliferation and invasion through NF-kappaB, JunB, and MMP-9 cascades in stomach cancer cells. Clin Exp. Metastasis 29, 263-272.
Lee WS, Jain MK, Arkonac BM, Zhang D, Shaw SY, Kashiki S, Maemura K, Lee SL, Hollenberg NK, Lee ME, Haber E (1998). Thy-1, a novel marker for angiogenesis upregulated by inflammatory cytokines. Circ. Res 82, 845-851.
Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 425, 415-419.
Lefave CV, Squatrito M, Vorlova S, Rocco GL, Brennan CW, Holland EC, Pan YX, Cartegni L (2011). Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. EMBO J 30, 4084-4097.
Leivo I, Jee KJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, Nagy B, Knuutila S (2005). Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation. Cancer Genet. Cytogenet. 156, 104-113.
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.
Li H, Guo L, Li J, Liu N, Liu J (2000a). Alternative splicing of RHAMM gene in chinese gastric cancers and its in vitro regulation. Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi. 17, 343-347.
Li H, Guo L, Li JW, Liu N, Qi R, Liu J (2000b). Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. Int J Oncol 17, 927-932.
Li HG, Han JJ, Huang ZQ, Wang L, Chen WL, Shen XM (2011). IMP3 is a novel biomarker to predict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. J Craniofac. Surg. 22, 2022-2025.
Li J, Ying J, Fan Y, Wu L, Ying Y, Chan AT, Srivastava G, Tao Q (2010). WNT5A antagonizes WNT/beta-catenin signaling and is frequently silenced by promoter CpG methylation in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Biol. Ther. 10, 617-624.
Li Y, Chu LW, LI Z, Yik PY, Song YQ (2009). A study on the association of the chromosome 12p13 locus with sporadic late-onset Alzheimer's disease in Chinese. Dement. Geriatr. Cogn Disord. 27, 508-512.
Liang WJ, Qiu F, Hong MH, Guo L, Qin HD, Liu QC, Zhang XS, Mai HQ, Xiang YQ, Min HQ, Zeng YX (2008). [Differentially expressed genes between upward and downward progressing types of nasopharyngeal carcinoma]. Ai. Zheng. 27, 460-465.
Liao B, Hu Y, Brewer G (2011). RNA-binding protein insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP-3) promotes cell survival via insulin-like growth factor II signaling after ionizing radiation. J Biol. Chem. 286, 31145-31152.
Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. J Biol. Chem. 280, 18517-18524.
Lin DM, Ma Y, Xiao T, Guo SP, Han NJ, Su K, Yi SZ, Fang J, Cheng SJ, Gao YN (2006). [TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung]. Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi. 35, 540-544.
Litjens SH, de Pereda JM, Sonnenberg A (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. Trends Cell Biol. 16, 376-383.
Liu J, Yang L, Jin M, Xu L, Wu S (2011a). regulation of the invasion and metastasis of human glioma cells by polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. Mol. Med. Rep. 4, 1299-1305.
Liu T, Jin X, Zhang X, Yuan H, Cheng J, Lee J, Zhang B, Zhang M, Wu J, Wang L, Tian G, Wang W (2012). A novel missense SNRNP200 mutation associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Chinese family. PLoS. ONE. 7, e45464.
Liu W, Morito D, Takashima S, Mineharu Y, Kobayashi H, Hitomi T, Hashikata H, Matsuura N, Yamazaki S, Toyoda A, Kikuta K, Takagi Y, Harada KH, Fujiyama A, Herzig R, Krischek B, Zou L, Kim JE, Kitakaze M, Miyamoto S, Nagata K, Hashimoto N, Koizumi A (2011b). Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. PLoS. ONE. 6, e22542.
Lleres D, Denegri M, Biggiogera M, Ajuh P, Lamond AI (2010). Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. EMBO Rep. 11, 445-451.
Lu D, Yang X, Jiang NY, Woda BA, Liu Q, Dresser K, Mercurio AM, Rock KL, Jiang Z (2011). IMP3, a new biomarker to predict progression of cervical intraepithelial neoplasia into invasive cancer. Am. J Surg. Pathol. 35, 1638-1645. Lu Z, Zhou L, Killela P, Rasheed AB, Di C, Poe WE, McLendon RE, Bigner DD, Nicchitta C, Yan H (2009). Glioblastoma proto-oncogene SEC61gamma is required for tumor cell survival and response to endoplasmic reticulum stress. Cancer Res. 69, 9105-9111.
Lugassy C, Torres-Munoz JE, Kleinman HK, Ghanem G, Vernon S, Barnhill RL (2009). Overexpression of malignancy-associated laminins and laminin receptors by angiotropic human melanoma cells in a chick chorioallantoic membrane model. J Cutan. Pathol. 36, 1237-1243.

Ma LJ, Li W, Zhang X, Huang DH, Zhang H, Xiao JY, Tian YQ (2009). Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA micromatrices. Arch. Med Res 40, 114-123.

Ma TS, Mann DL, Lee JH, Gallinghouse GJ (1999). SR compartment calcium and cell apoptosis in SERCA over-expression. Cell Calcium 26, 25-36.

Ma Y, Lin D, Sun W, Xiao T, Yuan J, Han N, Guo S, Feng X, Su K, Mao Y, Cheng S, Gao Y (2006). Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. Clin Cancer Res 12, 1121-1127.

MacLennan DH, Rice WJ, Green NM (1997). The mechanism of Ca2+ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPases. J Biol. Chem. 272, 28815-28818.

Maeder C, Kutach AK, Guthrie C (2009). ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. Nat Struct. Mol. Biol. 16, 42-48.

Manda R, Kohno T, Niki T, Yamada T, Takenoshita S, Kuwano H, Yokota J (2000). Differential expression of the LAMB3 and LAMC2 genes between small cell and non-small cell lung carcinomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275, 440-445.

Marchand M, Van BN, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De GJ, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der BP, Boon T (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. Int. J. Cancer 80, 219-230.

Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y,. (1995). Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3. Int. J Cancer 63, 883-885.

Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA (2006). Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol 291, G45-G54.

McManus KJ, Barrett IJ, Nouhi Y, Hieter P (2009). Specific synthetic lethal killing of RAD54B-deficient human colorectal cancer cells by FEN1 silencing. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 106, 3276-3281.

Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. Autophagy. 5, 649-662.

Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S, Chouchane L (2001). Genetic variation in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. Cancer 91, 672-678. Meyer EL, Goemann IM, Dora JM, Wagner MS, Maia AL (2008). Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in medullary thyroid carcinoma. Mol. Cell Endocrinol. 289, 16-22.

Miller NH, Justice CM, Marosy B, Swindle K, Kim Y, Roy-Gagnon MH, Sung H, Behneman D, Doheny KF, Pugh E, Wilson AF (2012). Intra-familial tests of association between familial idiopathic scoliosis and linked regions on 9q31.3-q34.3 and 16p12.3-q22.2. Hum. Hered. 74, 36-44.

Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh JL, Lin F, Hope C, Holcombe RF (2004). Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma. Int. J Oncol 25, 1337-1342. Mochizuki S, Okada Y (2007). ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Sci. 98, 621-628.

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.

Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation 64, 1017-1027.

Moroy G, Alix AJ, Sapi J, Hornebeck W, Bourguet E (2012). Neutrophil elastase as a target in lung cancer. Anticancer Agents Med. Chem. 12, 565-579.

Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, Kishida T, Yao M, Latif F, Maher ER (2010). Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. Oncogene 29, 2104-2117.

Moss DK, Wilde A, Lane JD (2009). Dynamic release of nuclear RanGTP triggers TPX2-dependent microtubule assembly during the apoptotic execution phase. J Cell Sci. 122, 644-655.

Murakami M, Araki O, Morimura T, Hosoi Y, Mizuma H, Yamada M, Kurihara H, Ishiuchi S, Tamura M, Sasaki T, Mori M (2000). Expression of type II iodothyronine deiodinase in brain tumors. J Clin Endocrinol. Metab 85, 4403-4406.

Nakamura Y, Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sakai D, Mochida J, Hotta T, Ando K (2006). Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. Br. J Dermatol. 154, 1062-1070.

Neidert MC, Schoor O, Trautwein C, Trautwein N, Christ L, Melms A, Honegger J, Rammensee HG, Herold-Mende C, Dietrich PY, Stevanovic S (2012). Natural HLA class I ligands from glioblastoma: extending the options for immunotherapy. J Neurooncol.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. Nat Med. 4, 328-332.

Niedergethmann M, Alves F, Neff JK, Heidrich B, Aramin N, Li L, Pilarsky C, Grutzmann R, Allgayer H, Post S, Gretz N (2007). Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model. Br. J Cancer 97, 1432-1440.

Nikolova DN, Zembutsu H, Sechanov T, Vidinov K, Kee LS, Ivanova R, Becheva E, Kocova M, Toncheva D, Nakamura Y (2008). Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. Oncol Rep. 20, 105-121.

Nirde P, Derocq D, Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gary-Bobo M, Garcia M (2010). Heat shock cognate 70 protein

secretion as a new growth arrest signal for cancer cells. Oncogene 29, 117-127.
Nishinakamura R, Uchiyama Y, Sakaguchi M, Fujimura S (2011). Nephron progenitors in the metanephric mesenchyme. Pediatr. Nephrol. 26, 1463-1467.
Odermatt A, Taschner PE, Khanna VK, Busch HF, Karpati G, Jablecki CK, Breuning MH, MacLennan DH (1996). Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca2+ ATPase, are associated with Brody disease. Nat Genet. 14, 191-194.
Oh SP, Taylor RW, Gerecke DR, Rochelle JM, Seldin MF, Olsen BR (1992). The mouse alpha 1(XII) and human alpha 1(XII)-like collagen genes are localized on mouse chromosome 9 and human chromosome 6. Genomics 14, 225-231.
Ohta S, Koide M, Tokuyama T, Yokota N, Nishizawa S, Namba H (2001). Cdc6 expression as a marker of proliferative activity in brain tumors. Oncol Rep. 8, 1063-1066.
Ortega P, Moran A, Fernandez-Marcelo T, De JC, Frias C, Lopez-Asenjo JA, Sanchez-Pernaute A, Torres A, Diaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M (2010). MMP-7 and SGCE as distinctive molecular factors in sporadic colorectal cancers from the mutator phenotype pathway. Int. J Oncol 36, 1209-1215.
Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005). Protein translocation by the Sec61/SecY channel. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 21, 529-550.
Pascolo S, Ginhoux F, Laham N, Walter S, Schoor O, Probst J, Rohrlich P, Obermayr F, Fisch P, Danos O, Ehrlich R, Lemonnier FA, Rammensee HG (2005). The non-classical HLA class I molecule HFE does not influence the NK-like activity contained in fresh human PBMCs and does not interact with NK cells. Int. Immunol. 17, 117-122.
Pascreau G, Eckerdt F, Lewellyn AL, Prigent C, Mailer JL (2009). Phosphorylation of p53 is regulated by TPX2-Aurora A in xenopus oocytes. J Biol. Chem. 284, 5497-5505.
Patterson CE, Abrams WR, Wolter NE, Rosenbloom J, Davis EC (2005). Developmental regulation and coordinate reexpression of FKBP65 with extracellular matrix proteins after lung injury suggest a specialized function for this endoplasmic reticulum immunophilin. Cell Stress. Chaperones. 10, 285-295.
Patterson CE, Schaub T, Coleman EJ, Davis EC (2000). Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. Mol. Biol. Cell 11, 3925-3935.
Peiro G, Diebold J, Baretton GB, Kimmig R, Lohrs U (2001). Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome. Int. J Gynecol. Pathol. 20, 359-367.
Peng C, Togayachi A, Kwon YD, Xie C, Wu G, Zou X, Sato T, Ito H, Tachibana K, Kubota T, Noce T, Narimatsu H, Zhang Y (2010). Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile. Biochem. Biophys. Res. Commun. 402, 680-686.
Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K (2000). Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. Biochem. J 351, 67-77.
Perrin-Tricaud C, Rutschmann C, Hennet T (2011). Identification of domains and amino acids essential to the collagen galactosyltransferase activity of GLT25D1. PLoS. ONE. 6, e29390.
Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, Bowman ED, Engels EA, Caporaso NE, Harris CC (2011). Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer. J Natl. Cancer Inst. 103, 1112-1122.
Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, Spitz MR, El-Zein RA (2011). Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. Genes Chromosomes. Cancer 50, 1-12.
Pontisso P, Calabrese F, Benvegnu L, Lise M, Belluco C, Ruvoletto MG, Marino M, Valente M, Nitti D, Gatta A, Fassina G (2004). Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma. Br. J Cancer 90, 833-837.
Prades C, Arnould I, Annilo T, Shulenin S, Chen ZQ, Orosco L, Triunfol M, Devaud C, Maintoux-Larois C, Lafargue C, Lemoine C, Denefle P, Rosier M, Dean M (2002). The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. Cytogenet. Genome Res 98, 160-168.
Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, Thelma BK (2010). Association analysis of ADPRT1, AKR1B1, RAGE, GFPT2 and PAI-1 gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes. BMC. Med. Genet. 11, 52.
Puppin C, Fabbro D, Dima M, Di LC, Puxeddu E, Filetti S, Russo D, Damante G (2008). High periostin expression correlates with aggressiveness in papillary thyroid carcinomas. J Endocrinol. 197, 401-408.
Purdue MP, Johansson M, Zelenika D, Toro JR, Scelo G, Moore LE, Prokhortchouk E, Wu X, Kiemeney LA, Gaborieau V, Jacobs KB, Chow WH, Zaridze D, Matveev V, Lubinski J, Trubicka J, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Bucur A, Bencko V, Foretova L, Janout V, Boffetta P, Colt JS, Davis FG, Schwartz KL, Banks RE, Selby PJ, Harnden P, Berg CD, Hsing AW, Grubb RL, III, Boeing H, Vineis P, Clavel-Chapelon F, Palli D, Tumino R, Krogh V, Panico S, Duell EJ, Quiros JR, Sanchez MJ, Navarro C, Ardanaz E, Dorronsoro M, Khaw KT, Allen NE, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Trichopoulos D, Linseisen J, Ljungberg B, Overvad K, Tjonneland A, Romieu I, Riboli E, Mukeria A, Shangina O, Stevens VL, Thun MJ, Diver WR, Gapstur SM, Pharoah PD, Easton DF, Albanes D, Weinstein SJ, Virtamo J, Vatten L, Hveem K, Njolstad I, Tell GS, Stoltenberg C, Kumar R, Koppova K, Cussenot O, Benhamou S, Oosterwijk E, Vermeulen SH, Aben KK, van der Marel SL, Ye Y, Wood CG, Pu X, Mazur AM, Boulygina ES, Chekanov NN, Foglio M, Lechner D, Gut I, Heath S, Blanche H, Hutchinson A, Thomas G, Wang Z, Yeager M, Fraumeni JF, Jr., Skryabin KG, McKay JD, Rothman N, Chanock SJ, Lathrop M, Brennan P (2011). Genome-wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. Nat Genet. 43, 60-65.

Puyol M, Martin A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, Guerra C, Santamaria D, Barbacid M (2010). A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. Cancer Cell 18, 63-73.

Qu P, Du H, Wang X, Yan C (2009). Matrix metalloproteinase 12 overexpression in lung epithelial cells plays a key role in emphysema to lung bronchioalveolar adenocarcinoma transition. Cancer Res 69, 7252-7261.

Ramakrishna M, Williams LH, Boyle SE, Bearfoot JL, Sridhar A, Speed TP, Gorringe KL, Campbell IG (2010). Identification of candidate growth promoting genes in ovarian cancer through integrated copy number and expression analysis. PLoS. ONE. 5, e9983.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics 50, 213-219.

Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).

Rao B, Gao Y, Huang J, Gao X, Fu X, Huang M, Yao J, Wang J, Li W, Zhang J, Liu H, Wang L, Wang J (2011). Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. Int. J Colorectal Dis. 26, 593-601.

Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002). Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. Genome Res. 12, 1231-1245.

Rauch J, O'Neill E, Mack B, Matthias C, Munz M, Kolch W, Gires O (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by regulating A-Raf transcription. Cancer Res. 70, 1679-1688.

Rege TA, Hagood JS (2006a). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. FASEB J 20, 1045-1054.

Rege TA, Hagood JS (2006b). Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. Biochim. Biophys. Acta 1763, 991-999.

Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Ozer HL, Schwab M, Albino AP, Old LJ (1993). Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. Cancer Res 53, 3327-3335.

Rettig WJ, Su SL, Fortunato SR, Scanlan MJ, Raj BK, Garin-Chesa P, Healey JH, Old LJ (1994). Fibroblast activation protein: purification, epitope mapping and induction by growth factors. Int J Cancer 58, 385-392.

Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ (2006). Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy. Cancer 107, 67-74.

Ripka S, Konig A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress T, Michl P (2007). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. Carcinogenesis 28, 1178-1187.

Rivera VT, Boudoukha S, Simon A, Souidi M, Cuvellier S, Pinna G, Polesskaya A (2013). Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. Oncogene.

Rodningen OK, Borresen-Dale AL, Alsner J, Hastie T, Overgaard J (2008). Radiation-induced gene expression in human subcutaneous fibroblasts is predictive of radiation-induced fibrosis. Radiother. Oncol 86, 314-320.

Rodriguez CI, Stewart CL (2007). Disruption of the ubiquitin ligase HERC4 causes defects in spermatozoon maturation and impaired fertility. Dev. Biol. 312, 501-508.

Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Roigas J, Kristiansen G, Schnorr D, Loening SA, Jung K, Lichtinghagen R (2004a). Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. Oncol Rep. 11, 529-536.

Roemer A, Schwettmann L, Jung M, Stephan C, Roigas J, Kristiansen G, Loening SA, Lichtinghagen R, Jung K (2004b). The membrane proteases adams and hepsin are differentially expressed in renal cell carcinoma. Are they potential tumor markers? J Urol. 172, 2162-2166.

Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jaattela M (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. Genes Dev. 19, 570-582.

Romagnoli S, Fasoli E, Vaira V, Falleni M, Pellegrini C, Catania A, Roncalli M, Marchetti A, Santambrogio L, Coggi G, Bosari S (2009). Identification of potential therapeutic targets in malignant mesothelioma using cell-cycle gene expression analysis. Am J Pathol. 174, 762-770.

Romero-Weaver AL, Wang HW, Steen HC, Scarzello AJ, Hall VL, Sheikh F, Donnelly RP, Gamero AM (2010). Resistance to IFN-alpha-induced apoptosis is linked to a loss of STAT2. Mol. Cancer Res. 8, 80-92.

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.

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.

Ruan K, Bao S, Ouyang G (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. Cell Mol. Life Sci. 66, 2219-2230.

Ruiz dA, I, Scarselli M, Rosemond E, Gautam D, Jou W, Gavrilova O, Ebert PJ, Levitt P, Wess J (2010). RGS4 is a negative regulator of insulin release from pancreatic beta-cells in vitro and in vivo. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A 107, 7999-8004.

Rusin M, Zientek H, Krzesniak M, Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Butkiewicz D, Vaitiekunaite R, Lisowska K, Grzybowska E, Krawczyk Z (2004). Intronic polymorphism (1541-1542delGT) of the constitutive heat shock protein 70 gene has functional significance and shows evidence of association with lung cancer risk. Mol. Carcinog. 39, 155-163.

Sagara N, Toda G, Hirai M, Terada M, Katoh M (1998). Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252, 117-122.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.
Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro CS, O'Donovan M, Craddock N, Kucherlapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A (1999). Mutations in ATP2A2, encoding a Ca2+ pump, cause Darier disease. Nat Genet. 21, 271-277.
Samanta S, Sharma VM, Khan A, Mercurio AM (2012). Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. Oncogene 31, 4689-4697.
Sang QX (1998). Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. Cell Res 8, 171-177.
Sarai N, Kagawa W, Fujikawa N, Saito K, Hikiba J, Tanaka K, Miyagawa K, Kurumizaka H, Yokoyama S (2008). Biochemical analysis of the N-terminal domain of human RAD54B. Nucleic Acids Res. 36, 5441-5450.
Satow R, Shitashige M, Kanai Y, Takeshita F, Ojima H, Jigami T, Honda K, Kosuge T, Ochiya T, Hirohashi S, Yamada T (2010). Combined functional genome survey of therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 16, 2518-2528.
Scanlan MJ, Raj BK, Calvo B, Garin-Chesa P, Sanz-Moncasi MP, Healey JH, Old LJ, Rettig WJ (1994). Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 5657-5661.
Schafer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G (2003). ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol 285, L376-L385.
Schegg B, Hulsmeier AJ, Rutschmann C, Maag C, Hennet T (2009). Core glycosylation of collagen is initiated by two beta(1-O)galactosyltransferases. Mol. Cell Biol. 29, 943-952.
Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, Kurek R, Neubauer HJ (2006). Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. Cancer Res 66, 5278-5286.
Scieglinska D, Piglowski W, Mazurek A, Malusecka E, Zebracka J, Filipczak P, Krawczyk Z (2008). The HspA2 protein localizes in nucleoli and centrosomes of heat shocked cancer cells. J Cell Biochem. 104, 2193-2206.
Seifert W, Kuhnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V, Hennies HC (2011). Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. J Biol. Chem. 286, 37665-37675.
Shaulian E (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? Cell Signal. 22, 894-899.
Shaulian E, Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol. 4, E131-E136.
Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. Cancer Cell 3, 377-386.
Shigeishi H, Fujimoto S, Hiraoka M, Ono S, Taki M, Ohta K, Higashikawa K, Kamata N (2009). Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility, correlates with expression of microtubule-associated protein in human oral squamous cell carcinomas. Int J Oncol 34, 1565-1571.
Shimbo T, Tanemura A, Yamazaki T, Tamai K, Katayama I, Kaneda Y (2010). Serum anti-BPAG1 auto-antibody is a novel marker for human melanoma. PLoS. ONE. 5, e10566.
Shyian M, Gryshkova V, Kostianets O, Gorshkov V, Gogolev Y, Goncharuk I, Nespryadko S, Vorobjova L, Filonenko V, Kiyamova R (2011). Quantitative analysis of SLC34A2 expression in different types of ovarian tumors. Exp. Oncol 33, 94-98.
Siddiqui N, Borden KL (2012). mRNA export and cancer. Wiley. Interdiscip. Rev. RNA. 3, 13-25.
Simpson NE, Tryndyak VP, Beland FA, Pogribny IP (2012). An in vitro investigation of metabolically sensitive biomarkers in breast cancer progression. Breast Cancer Res. Treat. 133, 959-968.
Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tubingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. Cancer Immunol. Immunother. 53, 187-195.
Siow DL, Wattenberg BW (2012). Mammalian ORMDL proteins mediate the feedback response in ceramide bio-synthesis. J Biol. Chem. 287, 40198-40204.
Slack FJ, Weidhaas JB (2008). MicroRNA in cancer prognosis. N. Engl. J Med. 359, 2720-2722.
Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. J Clin Oncol. 24, 3089-3094.
Smith MJ, Culhane AC, Donovan M, Coffey JC, Barry BD, Kelly MA, Higgins DG, Wang JH, Kirwan WO, Cotter TG, Redmond HP (2009a). Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification. Br. J Cancer 100, 1452-1464.
Smith SC, Nicholson B, Nitz M, Frierson HF, Jr., Smolkin M, Hampton G, El-Rifai W, Theodorescu D (2009b). Profiling bladder cancer organ site-specific metastasis identifies LAMC2 as a novel biomarker of hematogenous dissemination. Am J Pathol. 174, 371-379.
Sohr S, Engeland K (2008). RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. Cell Cycle 7, 3448-3460.
Somers GR, Bradbury R, Trute L, Conigrave A, Venter DJ (1999). Expression of the human P2Y6 nucleotide receptor in normal placenta and gestational trophoblastic disease. Lab Invest 79, 131-139.
Srougi MC, Burridge K (2011). The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. PLoS. ONE. 6, e17108.
Staehler M, Stenzl A, Dietrich PY, Eisen T, Haferkamp A, Beck J, Mayer A, Walter S, Singh-Jasuja H, Stief C (2007). A phase I study to evaluate safety, immunogenicity and anti-tumor activity of the multi-peptide vaccine IMA901 in renal cell

carcinoma patients (RCC). Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5098 (Abstract).

Starzyk RM, Rosenow C, Frye J, Leismann M, Rodzinski E, Putney S, Tuomanen EI (2000). Cerebral cell adhesion molecule: a novel leukocyte adhesion determinant on blood-brain barrier capillary endothelium. J Infect. Dis. 181, 181-187.

Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B, Penning TM (2004). Human cytosolic 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity: implications for steroid hormone metabolism and action. J Biol. Chem. 279, 10784-10795.

Stewart DJ (2010). Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. Crit Rev. Oncol Hematol. 75, 173-234.

Stuart JE, Lusis EA, Scheck AC, Coons SW, Lal A, Perry A, Gutmann DH (2010). Identification of Gene Markers Associated With Aggressive Meningioma by Filtering Across Multiple Sets of Gene Expression Arrays. J Neuropathol. Exp. Neurol.

Suminami Y, Kishi F, Sekiguchi K, Kato H (1991). Squamous cell carcinoma antigen is a new member of the serine protease inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 51-58.

Sunaga N, Imai H, Shimizu K, Shames DS, Kakegawa S, Girard L, Sato M, Kaira K, Ishizuka T, Gazdar AF, Minna JD, Mori M (2012). Oncogenic KRAS-induced interleukin-8 overexpression promotes cell growth and migration and contributes to aggressive phenotypes of non-small cell lung cancer. Int. J Cancer 130, 1733-1744.

Sutherlin ME, Nishimori I, Caffrey T, Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mack D, Iwamura T, Clausen H, Hollingsworth MA (1997). Expression of three UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyltransferases in adenocarcinoma cell lines. Cancer Res. 57, 4744-4748.

Suvasini R, Shruti B, Thota B, Shinde SV, Friedmann-Morvinski D, Nawaz Z, Prasanna KV, Thennarasu K, Hegde AS, Arivazhagan A, Chandramouli BA, Santosh V, Somasundaram K (2011). Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. J Biol. Chem. 286, 25882-25890.

Tai CJ, Shen SC, Lee WR, Liao CF, Deng WP, Chiou HY, Hsieh CI, Tung JN, Chen CS, Chiou JF, Li LT, Lin CY, Hsu CH, Jiang MC (2010). Increased cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein expression promotes protrusion extension and enhances migration of MCF-7 breast cancer cells. Exp. Cell Res. 316, 2969-2981.

Takanami I, Abiko T, Koizumi S (2008). Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis. Int J Biol. Markers 23, 182-186.

Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M, Wands JR, Sugimachi K (1998). A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 10164-10169.

Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I, Prives C (2007). hCAS/CSEIL associates with chromatin and regulates expression of select p53 target genes. Cell 130, 638-650.

Terabayashi T, Sakaguchi M, Shinmyozu K, Ohshima T, Johjima A, Ogura T, Miki H, Nishinakamura R (2012). Phosphorylation of Kif26b promotes its polyubiquitination and subsequent proteasomal degradation during kidney development. PLoS. ONE. 7, e39714.

Terry KL, Vitonis AF, Hernandez D, Lurie G, Song H, Ramus SJ, Titus-Ernstoff L, Carney ME, Wilkens LR, Gentry-Maharaj A, Menon U, Gayther SA, Pharaoh PD, Goodman MT, Cramer DW, Birrer MJ (2010). A polymorphism in the GALNT2 gene and ovarian cancer risk in four population based case-control studies. Int. J Mol. Epidemiol. Genet. 1, 272-277.

Thierry L, Geiser AS, Hansen A, Tesche F, Herken R, Miosge N (2004). Collagen types XII and XIV are present in basement membrane zones during human embryonic development. J Mol. Histol. 35, 803-810.

Thorsen K, Sorensen KD, Brems-Eskildsen AS, Modin C, Gaustadnes M, Hein AM, Kruhoffer M, Laurberg S, Borre M, Wang K, Brunak S, Krainer AR, Torring N, Dyrskjot L, Andersen CL, ORntoft TF (2008). Alternative splicing in colon, bladder, and prostate cancer identified by exon array analysis. Mol. Cell Proteomics. 7, 1214-1224.

Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den DP, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. J Exp. Med 190, 1669-1678.

Timar J, Kasler M, Katai J, Soos M, Mathiasz D, Romany A, Patthy L, Kovacs G, Jozsa A, Szilak L, Forrai T (2006). [Developments in cancer management by innovative genomics. 2006 report of the National Cancer Consortium]. Magy. Onkol. 50, 349-359.

Tischler V, Fritzsche FR, Wild PJ, Stefan C, Seifert HH, Riener MO, Hermanns T, Mortezavi A, Gerhardt J, Schraml P, Jung K, Moch H, Soltermann A, Kristiansen G (2010). Periostin is up-regulated in high grade and high stage prostate cancer. BMC. Cancer 10, 273.

Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Keiser AR, Wert SE, Bruno MD, Whitsett JA (2011). Sox2 activates cell proliferation and differentiation in the respiratory epithelium. Am J Respir. Cell Mol. Biol. 45, 101-110.

Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L (2008). Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. BMC. Genomics 9, 166.

Tong L, Harwood HJ, Jr. (2006). Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. J Cell Biochem. 99, 1476-1488.

Tong WG, Wierda WG, Lin E, Kuang SQ, Bekele BN, Estrov Z, Wei Y, Yang H, Keating MJ, Garcia-Manero G (2010). Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. Epigenetics. 5, 499-508.

Torre GC (1998). SCC antigen in malignant and nonmalignant squamous lesions. Tumour. Biol. 19, 517-526.

Tritz R, Hickey MJ, Lin AH, Hadwiger P, Sah DW, Neuwelt EA, Mueller BM, Kruse CA (2009). FAPP2 gene down-regulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 383, 167-171.

Tsai JR, Chong IW, Chen YH, Yang MJ, Sheu CC, Chang HC, Hwang JJ, Hung JY, Lin SR (2007). Differential expression profile of MAGE family in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer 56, 185-192.
Tseng H (1998). Basonuclin, a zinc finger protein associated with epithelial expansion and proliferation. Front Biosci. 3, D985-D988.
Tseng H, Biegel JA, Brown RS (1999). Basonuclin is associated with the ribosomal RNA genes on human keratinocyte mitotic chromosomes. J Cell Sci. 112 Pt 18, 3039-3047.
Tseng H, Green H (1994). Association of basonuclin with ability of keratinocytes to multiply and with absence of terminal differentiation. J Cell Biol. 126, 495-506.
Tsuji A, Kikuchi Y, Sato Y, Koide S, Yuasa K, Nagahama M, Matsuda Y (2006). A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. Biochem. J 396, 51-59.
Tsukamoto Y, Uchida T, Karnan S, Noguchi T, Nguyen LT, Tanigawa M, Takeuchi I, Matsuura K, Hijiya N, Nakada C, Kishida T, Kawahara K, Ito H, Murakami K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M (2008). Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. J Pathol. 216, 471-482.
Twarock S, Tammi MI, Savani RC, Fischer JW (2010). Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. J Biol. Chem. 285, 23276-23284.
Twells RC, Metzker ML, Brown SD, Cox R, Garey C, Hammond H, Hey PJ, Levy E, Nakagawa Y, Philips MS, Todd JA, Hess JF (2001). The sequence and gene characterization of a 400-kb candidate region for IDDM4 on chromosome 11q13. Genomics 72, 231-242.
Tzankov A, Strasser U, Dirnhofer S, Menter T, Arber C, Jotterand M, Rovo A, Tichelli A, Stauder R, Gunthert U (2011). In situ RHAMM protein expression in acute myeloid leukemia blasts suggests poor overall survival. Ann Hematol.
Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, Nishinakamura R (2010). Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 107, 9240-9245. Ullman E, Pan JA, Zong WX (2011). Squamous cell carcinoma antigen 1 promotes caspase-8-mediated apoptosis in response to endoplasmic reticulum stress while inhibiting necrosis induced by lysosomal injury. Mol. Cell Biol. 31, 2902-2919.
Utispan K, Thuwajit P, Abiko Y, Charngkaew K, Paupairoj A, Chau-in S, Thuwajit C (2010). Gene expression profiling of cholangiocarcinoma-derived fibroblast reveals alterations related to tumor progression and indicates periostin as a poor prognostic marker. Mol. Cancer 9, 13.
van AM, Schepens M, de BD, Janssen B, Merkx G, Geurts van KA (2000). Construction of a 350-kb sequence-ready 11q13 cosmid contig encompassing the markers D11S4933 and D11S546: mapping of 11 genes and 3 tumor-associated translocation breakpoints. Genomics 66, 35-42.
Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR (1998). Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. Int. J Cancer 79, 468-475.
Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, Garcia JA, Salcedo M (2005). Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. BMC. Cancer 5, 68.
Wahl MC, Will CL, Luhrmann R (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. Cell 136, 701-718.
Walchli C, Koch M, Chiquet M, Odermatt BF, Trueb B (1994). Tissue-specific expression of the fibril-associated collagens XII and XIV. J Cell Sci. 107 (Pt 2), 669-681.
Wallace AM, Sandford AJ, English JC, Burkett KM, Li H, Finley RJ, Muller NL, Coxson HO, Pare PD, Abboud RT (2008). Matrix metalloproteinase expression by human alveolar macrophages in relation to emphysema. COPD. 5, 13-23.
Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring 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.
Wang C, Rajput S, Watabe K, Liao DF, Cao D (2010a). Acetyl-CoA carboxylase-a as a novel target for cancer therapy. Front Biosci. (Schol. Ed) 2, 515-526.
Wang C, Xu C, Sun M, Luo D, Liao DF, Cao D (2009a). Acetyl-CoA carboxylase-alpha inhibitor TOFA induces human cancer cell apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 385, 302-306.
Wang HW, Lin CP, Chiu JH, Chow KC, Kuo KT, Lin CS, Wang LS (2007). Reversal of inflammation-associated dihydrodiol dehydrogenases (AKR1C1 and AKR1C2) overexpression and drug resistance in nonsmall cell lung cancer cells by wogonin and chrysin. Int. J Cancer 120, 2019-2027.
Wang J, Tsui HW, Beier F, Pritzker KP, Inman RD, Tsui FW (2008a). The ANKH DeltaE490Mutation in Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystal Deposition Disease (CPPDD) affects tissue non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) activities. Open Rheumatol. J 2, 23-30.
Wang KK, Liu N, Radulovich N, Wigle DA, Johnston MR, Shepherd FA, Minden MD, Tsao MS (2002). Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. Oncogene 21, 7598-7604.
Wang Q, Traynor JR (2011). Opioid-induced down-regulation of RGS4: role of ubiquitination and implications for receptor cross-talk. J Biol. Chem. 286, 7854-7864.
Wang SZ, Luo XG, Shen J, Zou JN, Lu YH, Xi T (2008b). Knockdown of SMYD3 by RNA interference inhibits cervical carcinoma cell growth and invasion in vitro. BMB. Rep. 41, 294-299.
Wang WX, Zhang WJ, Peng ZL, Yang KX (2009b). [Expression and clinical significance of CDC6 and hMSH2 in cervical carcinoma]. Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban. 40, 857-860.
Wang Y, Zhou F, Wu Y, Xu D, Li W, Liang S (2010b). The relationship between three heat shock protein 70 gene polymorphisms and susceptibility to lung cancer. Clin Chem. Lab Med. 48, 1657-1663.
Warner SL, Stephens BJ, Nwokenkwo S, Hostetter G, Sugeng A, Hidalgo M, Trent JM, Han H, Von Hoff DD (2009).

Validation of TPX2 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res 15, 6519-6528.
Watanabe M, Takemasa I, Kawaguchi N, Miyake M, Nishimura N, Matsubara T, Matsuo E, Sekimoto M, Nagai K, Matsuura N, Monden M, Nishimura O (2008). An application of the 2-nitrobenzenesulfenyl method to proteomic profiling of human colorectal carcinoma: A novel approach for biomarker discovery. Proteomics. Clin Appl. 2, 925-935. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H (2011). Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. Clin Colorectal Cancer 10, 134-141.
Watrin E, Legagneux V (2005). Contribution of hCAP-D2, a non-SMC subunit of condensin I, to chromosome and chromosomal protein dynamics during mitosis. Mol. Cell Biol. 25, 740-750.
Watt SL, Lunstrum GP, McDonough AM, Keene DR, Burgeson RE, Morris NP (1992). Characterization of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. J Biol. Chem. 267, 20093-20099.
Wawrzynska L, Sakowicz A, Rudzinski P, Langfort R, Kurzyna M (2003). The conversion of thyroxine to triiodothyronine in the lung: comparison of activity of type I iodothyronine 5' deiodinase in lung cancer with peripheral lung tissues. Monaldi Arch. Chest Dis. 59, 140-145.
Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. Cancer Cell 1, 279-288.
Weiner L, Green H (1998). Basonuclin as a cell marker in the formation and cycling of the murine hair follicle. Differentiation 63, 263-272.
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.
Wickramasinghe VO, Stewart M, Laskey RA (2010). GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. Nucleus. 1, 393-396.
Wildeboer D, Naus S, my Sang QX, Bartsch JW, Pagenstecher A (2006). Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. J Neuropathol. Exp. Neurol. 65, 516-527.
Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P, Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM, Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben-Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins R, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM, Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR (2008). Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. Nat Genet. 40, 161-169.
Winkler GS, Mulder KW, Bardwell VJ, Kalkhoven E, Timmers HT (2006). Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription. EMBO J 25, 3089-3099.
Wong CH, Chan H, Ho CY, Lai SK, Chan KS, Koh CG, Li HY (2009). Apoptotic histone modification inhibits nuclear transport by regulating RCC1. Nat Cell Biol. 11, 36-45.
Wu A, Wu B, Guo J, Luo W, Wu D, Yang H, Zhen Y, Yu X, Wang H, Zhou Y, Liu Z, Fang W, Yang Z (2011a). Elevated expression of CDK4 in lung cancer. J Transl. Med. 9, 38.
Wu GC, Hu HC, Shi MH (2008). [Expression and clinical significance of a disintegrin and metalloprotease 8 (ADAM8) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in non-small cell lung cancer]. Ai. Zheng. 27, 874-878.
Wu H, Xu H, Miraglia LJ, Crooke ST (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. J Biol. Chem. 275, 36957-36965.
Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. Am. J Physiol 269, C775-C784.
Wu SQ, Lv YE, Lin BH, Luo LM, Lv SL, Bi AH, Jia YS (2013). Silencing of periostin inhibits nicotine-mediated tumor cell growth and epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. Mol. Med. Rep. 7, 875-880.
Wu YM, Liu CH, Hu RH, Huang MJ, Lee JJ, Chen CH, Huang J, Lai HS, Lee PH, Hsu WM, Huang HC, Huang MC (2011b). Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor. Cancer Res. 71, 7270-7279.
Wu Z, Jiang H, Zhang L, Xu X, Zhang X, Kang Z, Song D, Zhang J, Guan M, Gu Y (2012). Molecular analysis of RNF213 gene for moyamoya disease in the Chinese Han population. PLoS. ONE. 7, e48179.
Wullner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur MK, Barth S (2008). Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2. Curr. Cancer Drug Targets. 8, 554-565.
Xia LM, Tian DA, Zhang Q, Yan W, Wang B, Liu M, Li PY, Chen B (2008). [Inhibition of HSP70-2 expression by RNA interference induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells]. Zhonghua Gan Zang. Bing. Za Zhi. 16, 678-682.
Xiao L, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Chen J, Turner DJ, Passaniti A, Wang JY (2007). Induced JunD in intestinal epithelial cells represses CDK4 transcription through its proximal promoter region following polyamine depletion. Biochem. J 403, 573-581.
Xie Y, Wolff DW, Wei T, Wang B, Deng C, Kirui JK, Jiang H, Qin J, Abel PW, Tu Y (2009). Breast cancer migration and invasion depend on proteasome degradation of regulator of G-protein signaling 4. Cancer Res 69, 5743-5751. Xiong D, Li G, Li K, Xu Q, Pan Z, Ding F, Vedell P, Liu P, Cui P, Hua X, Jiang H, Yin Y, Zhu Z, Li X, Zhang B, Ma D, Wang Y, You M (2012). Exome sequencing identifies MXRA5 as a novel cancer gene frequently mutated in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. Carcinogenesis 33, 1797-1805.
Yamada H, Yanagisawa K, Tokumaru S, Taguchi A, Nimura Y, Osada H, Nagino M, Takahashi T (2008). Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at 21q11-21 in human lung cancer. Genes Chromosomes. Cancer 47, 810-818.

Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, Yasui W, Kikuchi A (2010). Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. Oncogene 29, 2036-2046.
Yamazaki H, Nishida H, Iwata S, Dang NH, Morimoto C (2009). CD90 and CD110 correlate with cancer stem cell potentials in human T-acute lymphoblastic leukemia cells. Biochem. Biophys. Res Commun. 383, 172-177.
Yang S, Shin J, Park KH, Jeung HC, Rha SY, Noh SH, Yang WI, Chung HC (2007). Molecular basis of the differences between normal and tumor tissues of gastric cancer. Biochim. Biophys. Acta 1772, 1033-1040.
Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C (2003). E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. Expert. Rev. Mol. Diagn. 3, 617-633.
Yasukawa M, Ishida K, Yuge Y, Hanaoka M, Minami Y, Ogawa M, Sasaki T, Saito M, Tsuji T (2013). Dpysl4 is involved in tooth germ morphogenesis through growth regulation, polarization and differentiation of dental epithelial cells. Int. J Biol. Sci. 9, 382-390.
Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, Mao L, Wong DT, Zhou X (2008). Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. BMC. Genomics 9, 69.
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.
Yoon H, Liyanarachchi S, Wright FA, Davuluri R, Lockman JC, de la CA, Pellegata NS (2002). Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 15632-15637.
Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M (2010). CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. J Cell Sci. 123, 225-235.
Yu JM, Jun ES, Jung JS, Suh SY, Han JY, Kim JY, Kim KW, Jung JS (2007). Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells. Cancer Lett. 257, 172-181.
Yuzugullu H, Benhaj K, Ozturk N, Senturk S, Celik E, Toylu A, Tasdemir N, Yilmaz M, Erdal E, Akcali KC, Atabey N, Ozturk M (2009). Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells. Mol. Cancer 8, 90.
Zaka R, Dion AS, Kusnierz A, Bohensky J, Srinivas V, Freeman T, Williams CJ (2009). Oxygen tension regulates the expression of ANK (progressive ankylosis) in an HIF-1-dependent manner in growth plate chondrocytes. J Bone Miner. Res. 24, 1869-1878.
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.
Zhang H, Jia Y, Cooper JJ, Hale T, Zhang Z, Elbein SC (2004). Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. J Clin Endocrinol. Metab 89, 748-755.
Zhang J, Valianou M, Cheng JD (2010a). Identification and characterization of the promoter of fibroblast activation protein. Front Biosci. (Elite. Ed) 2, 1154-1163.
Zhang X, Berger FG, Yang J, Lu X (2011a). USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1. EMBO J 30, 2177-2189.
Zhang Y, Zhang G, Li J, Tao Q, Tang W (2010b). The expression analysis of periostin in human breast cancer. J Surg Res 160, 102-106.
Zhang ZC, Satterly N, Fontoura BM, Chook YM (2011b). Evolutionary development of redundant nuclear localization signals in the mRNA export factor NXF1. Mol. Biol. Cell 22, 4657-4668.
Zhao C, Bellur DL, Lu S, Zhao F, Grassi MA, Bowne SJ, Sullivan LS, Daiger SP, Chen LJ, Pang CP, Zhao K, Staley JP, Larsson C (2009). Autosomal-dominant retinitis pigmentosa caused by a mutation in SNRNP200, a gene required for unwinding of U4/U6 snRNAs. Am. J Hum. Genet. 85, 617-627.
Zhao Z, Lee CC, Baldini A, Caskey CT (1995). A human homologue of the Drosophila polarity gene frizzled has been identified and mapped to 17q21.1. Genomics 27, 370-373.
Zheng PS, Wen J, Ang LC, Sheng W, Viloria-Petit A, Wang Y, Wu Y, Kerbel RS, Yang BB (2004). Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. FASEB J 18, 754-756.
Zhu CQ, Popova SN, Brown ER, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D, Tsao MS (2007). Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 104, 11754-11759.
Zhu JH, Hong DF, Song YM, Sun LF, Wang ZF, Wang JW (2013). Suppression of Cellular Apoptosis Susceptibility (CSE1L) Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. Asian Pac. J Cancer Prev. 14, 1017-1021.
Zlobec I, Terracciano L, Tornillo L, Gunthert U, Vuong T, Jass JR, Lugli A (2008). Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer. Gut 57, 1413-1419.
Zou JN, Wang SZ, Yang JS, Luo XG, Xie JH, Xi T (2009). Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. Cancer Lett. 280, 78-85.
Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Olaru A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ (2002). Application of cDNA micromatrices to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. Oncogene 21, 4855-4862.
Allander SV, Illei PB, Chen Y, Antonescu CR, Bittner M, Ladanyi M, Meltzer PS (2002). Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA micromatrices: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. Am. J Pathol. 161, 1587-1595.
Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice.

Nat Genet. 36, 744-749.
Balla A, Kim YJ, Varnai P, Szentpetery Z, Knight Z, Shokat KM, Balla T (2008). Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. Mol. Biol. Cell 19, 711-721.
Barembaum M, Moreno TA, LaBonne C, Sechrist J, Bronner-Fraser M (2000). Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. Nat Cell Biol. 2, 219-225.
Bhogaraju S, Cajanek L, Fort C, Blisnick T, Weber K, Taschner M, Mizuno N, Lamla S, Bastin P, Nigg EA, Lorentzen E (2013). Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. Science 341, 1009-1012.
Blumental-Perry A, Haney CJ, Weixel KM, Watkins SC, Weisz OA, Aridor M (2006). Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. Dev. Cell 11, 671-682.
Cantor JM, Ginsberg MH (2012). CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. J Cell Sci. 125, 1373-1382.
Cave H, Suciu S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, Malet M, Boutard P, Benoit Y, Mauvieux L, Lutz P, Mechinaud F, Grardel N, Mazingue F, Dupont M, Margueritte G, Pages MP, Bertrand Y, Plouvier E, Brunie G, Bastard C, Plantaz D, Vande V, I, Hagemeijer A, Speleman F, Lessard M, Otten J, Vilmer E, Dastugue N (2004). Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. Blood 103, 442-450.
Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM (1996). Nuclear cap binding protein maps close to the xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA) locus in human and mouse. Genomics 35, 632-633.
Cornen S, Guille A, Adelaide J, Addou-Klouche L, Finetti P, Saade MR, Manai M, Carbuccia N, Bekhouche I, Letessier A, Raynaud S, Charafe-Jauffret E, Jacquemier J, Spicuglia S, de TH, Viens P, Bertucci F, Birnbaum D, Chaffanet M (2014). Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. PLoS. ONE. 9, e81843.
Dear TN, Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH (1993). The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90, 4431-4435.
Deves R, Boyd CA (2000). Surface antigen CD98(4F2): not a single membrane protein, but a family of proteins with multiple functions. J Membr. Biol. 173, 165-177.
Ferrando AA, Herblot S, Palomero T, Hansen M, Hoang T, Fox EA, Look AT (2004). Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood 103, 1909-1911.
Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA (1998). C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. J Cell Biol. 141, 1563-1574.
Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. Mol. Cancer Res. 5, 1-10.
Garbarino JE, Gibbons IR (2002). Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. BMC. Genomics 3, 18. Gomez-Ferreria MA, Bashkurov M, Mullin M, Gingras AC, Pelletier L (2012). CEP192 interacts physically and functionally with the K63-deubiquitinase CYLD to promote mitotic spindle assembly. Cell Cycle 11, 3555-3558.
Gomez-Ferreria MA, Rath U, Buster DW, Chanda SK, Caldwell JS, Rines DR, Sharp DJ (2007). Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. Curr. Biol. 17, 1960-1966.
Hinck L (2004). The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis. Dev. Cell 7, 783-793.
Ilboudo A, Nault JC, Dubois-Pot-Schneider H, Corlu A, Zucman-Rossi J, Samson M, Le SJ (2014). Overexpression of phosphatidylinositol 4-kinase type IIIalpha is associated with undifferentiated status and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. BMC. Cancer 14, 7. Kaira K, Oriuchi N, Imai H, Shimizu K, Yanagitani N, Sunaga N, Hisada T, Ishizuka T, Kanai Y, Nakajima T, Mori M (2009). Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in stage I pulmonary adenocarcinoma. Lung Cancer 66, 120-126. Kataoka N, Ohno M, Kangawa K, Tokoro Y, Shimura Y (1994). Cloning of a complementary DNA encoding an 80 kilodalton nuclear cap binding protein. Nucleic Acids Res. 22, 3861-3865.
Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS (2001). Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. Nat Med. 7, 673-679.
Kim HJ, Cho JH, Quan H, Kim JR (2011). Down-regulation of Aurora B kinase induces cellular senescence in human fibroblasts and endothelial cells through a p53-dependent pathway. FEBS Lett. 585, 3569-3576.
Kulkarni NH, Karavanich CA, Atchley WR, Anholt RR (2000). Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. Genet. Res. 76, 41-50.
Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Honda S, Kobayashi O, Hatakeyama K, Ushio Y, Saya H, Hirota T (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. Dev. Cell 5, 853-864.
Lampson MA, Kapoor TM (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. Nat Cell Biol. 7, 93-98.
Latil A, Chene L, Cochant-Priollet B, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O (2003). Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors. Int. J Cancer 103, 306-315.
Lee Y, Yoon KA, Joo J, Lee D, Bae K, Han JY, Lee JS (2013). Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer: a genome-wide association study. Carcinogenesis 34, 307-313.
Lemaitre G, Gonnet F, Vaigot P, Gidrol X, Martin MT, Tortajada J, Waksman G (2005). CD98, a novel marker of transient amplifying human keratinocytes. Proteomics. 5, 3637-3645.
Lucker BF, Behal RH, Qin H, Siron LC, Taggart WD, Rosenbaum JL, Cole DG (2005). Characterization of the intraflagellar transport complex B core: direct interaction of the IFT81 and IFT74/72 subunits. J Biol. Chem. 280, 27688-27696.
Malureanu LA, Jeganathan KB, Hamada M, Wasilewski L, Davenport J, van Deursen JM (2009). BubR1 N terminus acts

as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. Dev. Cell 16, 118-131.
Matsuura S, Matsumoto Y, Morishima K, Izumi H, Matsumoto H, Ito E, Tsutsui K, Kobayashi J, Tauchi H, Kajiwara Y, Hama S, Kurisu K, Tahara H, Oshimura M, Komatsu K, Ikeuchi T, Kajii T (2006). Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. Am. J Med. Genet. A 140, 358-367.
Mayor T, Hacker U, Stierhof YD, Nigg EA (2002). The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. J Cell Sci. 115, 3275-3284.
Minogue S, Waugh MG (2012). The Phosphatidylinositol 4-Kinases: Don't Call it a Comeback. Subcell. Biochem. 58, 1-24.
Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Ohira M, Kawarabayasi Y, Ohara O, Tanaka A, Kotani H, Miyajima N, Nomura N (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. DNA Res. 3, 321-354. Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H, Kaufmann AM, Schneider A, Durst M, Mansukhani M, Pothuri B, Murty VV (2006). Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. Mol. Cancer 5, 16. Pandey A, Blagoev B, Kratchmarova I, Fernandez M, Nielsen M, Kristiansen TZ, Ohara O, Podtelejnikov AV, Roche S, Lodish HF, Mann M (2002). Cloning of a novel phosphotyrosine binding domain containing molecule, Odin, involved in signaling by receptor tyrosine kinases. Oncogene 21, 8029-8036.
Perumal D, Singh S, Yoder SJ, Bloom GC, Chellappan SP (2012). A novel five gene signature derived from stem-like side population cells predicts overall and recurrence-free survival in NSCLC. PLoS. ONE. 7, e43589.
Pokrovskaya ID, Willett R, Smith RD, Morelle W, Kudlyk T, Lupashin VV (2011). Conserved oligomeric Golgi complex specifically regulates the maintenance of Golgi glycosylation machinery. Glycobiology 21, 1554-1569.
Qian Y, Fritzsch B, Shirasawa S, Chen CL, Choi Y, Ma Q (2001). Formation of brainstem (nor)adrenergic centers and first-order relay visceral sensory neurons is dependent on homeodomain protein Rnx/Tlx3. Genes Dev. 15, 2533-2545.
Reynders E, Foulquier F, Leao TE, Quelhas D, Morelle W, Rabouille C, Annaert W, Matthijs G (2009). Golgi function and dysfunction in the first COG4-deficient CDG type II patient. Hum. Mol. Genet. 18, 3244-3256.
Schmid BC, Rezniczek GA, Fabjani G, Yoneda T, Leodolter S, Zeillinger R (2007). The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. Breast Cancer Res. Treat. 106, 333-342.
Sharma G, Mirza S, Prasad CP, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R (2007). Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients. Life Sci. 80, 1873-1881.
Shin J, Gu C, Park E, Park S (2007). Identification of phosphotyrosine binding domain-containing proteins as novel downstream targets of the EphA8 signaling function. Mol. Cell Biol. 27, 8113-8126.
Suzuki M, Shiraishi K, Eguchi A, Ikeda K, Mori T, Yoshimoto K, Ohba Y, Yamada T, Ito T, Baba Y, Baba H (2013). Aberrant methylation of LINE-1, SLIT2, MAL and IGFBP7 in non-small cell lung cancer. Oncol Rep. 29, 1308-1314. Ungar D, Oka T, Brittle EE, Vasile E, Lupashin VV, Chatterton JE, Heuser JE, Krieger M, Waters MG (2002). Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function. J Cell Biol. 157, 405-415.
Ungar D, Oka T, Vasile E, Krieger M, Hughson FM (2005). Subunit architecture of the conserved oligomeric Golgi complex. J Biol. Chem. 280, 32729-32735.
Whyte JR, Munro S (2001). The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic. Dev. Cell 1, 527-537.
Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Chan SC, Ho TW, Wong KW, Yu MY, Wang VW, Li C, Gardner GJ, Bonome T, Johnson WB, Smith DI, Chung TK, Birrer MJ (2007). Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. Oncogene 26, 1971-1982.
Wu L, Chang W, Zhao J, Yu Y, Tan X, Su T, Zhao L, Huang S, Liu S, Cao G (2010). Development of autoantibody signatures as novel diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 16, 3760-3768.
Bobos M, Hytiroglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS (2006). Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. Am. J Dermatopathol. 28, 99-104.
Mena H, Morrison AL, Jones RV, Gyure KA (2001). Central neurocytomas express photoreceptor differentiation. Cancer 91, 136-143.
Schleicher RL, Hunter SB, Zhang M, Zheng M, Tan W, Bandea CI, Fallon MT, Bostwick DG, Varma VA (1997). Neurofilament heavy chain-like messenger RNA and protein are present in benign prostate and down-regulated in prostatic carcinoma. Cancer Res. 57, 3532-3536.
Segal A, Carello S, Caterina P, Papadimitriou JM, Spagnolo DV (1994). Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. Pathology 26, 439-447.
Szebenyi G, Smith GM, Li P, Brady ST (2002). Overexpression of neurofilament H disrupts normal cell structure and function. J Neurosci. Res. 68, 185-198.
Tanaka Y, Ijiri R, Kato K, Kato Y, Misugi K, Nakatani Y, Hara M (2000). HMB-45/melan-A and smooth muscle actin-positive clear-cell epithelioid tumor arising in the ligamentum teres hepatis: additional example of clear cell 'sugar' tumors. Am. J Surg. Pathol. 24, 1295-1299.

Listado de secuencias

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Nueva inmunoterapia contra varios tumores, como cáncer de pulmón, incluido NSCLC
<130> I32387WO

<150> GB1313987.8
<151> 2013-08-05

<150> US61/862,213
<151> 2013-08-05

<150> GB1403297.3
<151> 2014-02-25

<160> 92

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Leu Phe Glu Ile Asn Pro Lys Leu
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys Ile Gln Glu Met Gln His Phe Leu
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Leu Asp Glu Asn Leu His Gln Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Leu Ile Glu Lys Ser Ile Tyr Leu
1 5

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

<400> 5

Thr Leu Ser Ser Ile Lys Val Glu Val
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Lys Leu Asp Glu Thr Asn Asn Thr Leu
1 5

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

<400> 7

Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Val
1 5

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

<400> 8

Ser Met Ser Gly Tyr Asp Gln Val Leu
1 5

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Leu Met Asp Lys Glu Gly Leu Thr Ala Leu
1 5 10

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

<400> 10

Val Leu Ser Val Val Glu Val Thr Leu
1 5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr Leu
1 5 10

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

<400> 12

Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Tyr Leu Ile His Phe Pro Val Ser Val
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Phe Gln Tyr Asp His Glu Ala Phe Leu
1 5

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

<400> 15

Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Val Ile Gly Phe Leu Leu Pro Phe Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Leu Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala Asp Ile Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Leu Tyr Pro His Thr Ser Gln Val
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Val Val Glu Phe Leu Thr Ser Val
1 5

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

<400> 20

Ala Leu Val Asp His Thr Pro Tyr Leu
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Leu Asp Thr Leu Tyr Glu Val
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
Phe Leu Ile Pro Ile Tyr His Gln Val
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Phe Leu His His Leu Glu Ile Glu Leu
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Phe Leu Val Asp Gly Ser Trp Ser Val
1 5

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

<400> 25
Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val
1 5 10

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr Tyr Leu
1 5

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Thr Val Ala Glu Val Ile Gln Ser Val
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Ser Ile Ser Asp Val Ile Ala Gln Val
1 5

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Leu Glu Glu Asp Asp Gly Asp Val Ala Met
1 5 10

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

<400> 30

Lys Ile Tyr Asn Glu Phe Ile Ser Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Ala Ile Asp Gly Asn Asn His Glu Val
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Lys Leu Ser Trp Asp Leu Ile Tyr Leu
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Leu Leu Arg Thr Val Val Ser Val
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Ala Leu Gly Ala Gly Ile Glu Arg Met
1 5

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

<400> 35

Val Leu Phe Pro Asn Leu Lys Thr Val
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Thr Leu Val Ala Ile Val Val Gly Val
1 5

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

<400> 37

Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu
1 5

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

<400> 38

Ser Leu His Phe Leu Ile Leu Tyr Val
1 5

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

<400> 39

Arg Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Leu
1 5

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

<400> 40

Gly Leu Thr Asp Asn Ile His Leu Val
1 5

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Ser Ile Leu Thr Ile Glu Asp Gly Ile Phe Glu Val
1 5 10

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

<400> 42

Ser Leu Trp Gly Gly Asp Val Val Leu
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Leu Phe Pro His Leu Leu Gln Pro Val
1 5 10

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

<400> 44

Asn Leu Leu Ala Glu Ile His Gly Val
1 5

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ile Met Gly Phe Ile Gly Phe Phe Val
1 5 10

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

<400> 46

Thr Leu Thr Asn Ile Ile His Asn Leu
1 5

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

<400> 47

Gly Val Leu Glu Asn Ile Phe Gly Val
1 5

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

<400> 48

Gly Leu Ile Glu Ile Ile Ser Asn Ala
1 5

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

<400> 49

Arg Leu Leu Ala Ala Glu Asn Phe Leu
1 5

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Leu Leu Pro Val Asp Ile Arg Gln Tyr Leu
1 5 10

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

<400> 51

Tyr Leu Ala Pro Phe Leu Arg Asn Val
1 5

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

<400> 52

Ala Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Ser Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Tyr Leu Pro His Ala Pro Pro Phe Ala
1 5

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

<400> 54

Lys Leu Val Glu Phe Asp Phe Leu Gly Ala
1 5 10

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

<400> 55

Ser Leu Ala Asp Phe Met Gln Glu Val
1 5

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

<400> 56

Ser Leu Tyr Lys Gly Leu Leu Ser Val
1 5

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Gly Leu Ala Glu Asp Ile Asp Lys Gly Glu Val
1 5 10

<210> 58
<211> 9
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ser Leu Ile Asp Ala Asp Pro Tyr Leu
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Ile Leu Val Ser Trp Leu Pro Arg Leu
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Val Asp Lys Thr Leu Leu Leu Val
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Thr Leu Ile Ser Arg Leu Pro Ala Val
1 5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Ile Leu Phe Pro Asp Ile Ile Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Leu Ala Gly Asp Val Ala Leu Gln Gln Leu
1 5 10

<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Met Leu Ala Val Leu His Thr Val
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Lys Val Leu Glu Ile Leu His Arg Val
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Ile Leu Gln Asp Arg Leu Asn Gln Val
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Lys Ile Leu Glu Asp Val Val Gly Val
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Lys Leu Leu Glu Tyr Ile Glu Glu Ile
1 5

<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Lys Leu Leu Thr Glu Val His Ala Ala
1 5

<210> 73
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5

<210> 74
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

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

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Leu Tyr Asp Ser Val Ile Leu Leu
1 5

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Ile Asn Asn Tyr Thr Pro Asp Met Asn Arg Glu Asp Val Asp Tyr Ala
1 5 10 15

Ile Arg

<210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr Asn Gly Val Ile His Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp
1 5 10 15

Thr

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Ser Leu Tyr Asp Asn Gln Ile Thr Thr Val
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Ser Leu Ala Pro Ala Gly Val Ile Arg Val
1 5 10

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

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

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Leu Tyr Gly Arg Leu Glu Val Val
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

Ala Leu Trp Glu Lys Asn Thr His Leu
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Leu Ala Asn Gln Lys Leu Tyr Ser Val
1 5 10

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

<400> 84

Ile Leu Met Gly Thr Glu Leu Thr Gln Val
1 5 10

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

<400> 85

Lys Ile Val Asp Phe Ser Tyr Ser Val
1 5

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Ala Met Ala Thr Glu Ser Ile Leu His Phe Ala
1 5 10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Arg Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Gln Ser Val
1 5 10

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Ser Leu Leu Glu Ser Asn Lys Asp Leu Leu Leu
1 5 10

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

<400> 89

Ala Leu Ala Ser Val Ile Lys Glu Leu
1 5

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

Ser Leu Val Ala Val Glu Leu Glu Lys Val
1 5 10

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

Ala Met Phe Glu Asn Phe Val Ser Val
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92

His Leu Leu Glu Asp Ile Ala His Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 5 (MXRA5-001), en donde dicho péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano clase I.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.

3. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido es parte de una proteína de fusión y está fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariante de HLA-DR asociada al antígeno (Ii), o está fusionado con un anticuerpo.

4. Un ácido nucleico que codifica un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, que es ADN, ADNc, ANP, ARN o combinaciones de estos, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.

5. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4 para usar en medicina.

6. Una célula huésped, que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.

7. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha célula huésped es una célula presentadora de antígeno, tal como, por ejemplo, una célula dendrítica.

8. Un agente de unión aislado que se une específicamente al péptido de acuerdo con la reivindicación 1, o al péptido de acuerdo con la reivindicación 1 comprendido en un complejo de dicho péptido con una molécula de MHC.

9. El agente de unión aislado de acuerdo con la reivindicación 8, que se selecciona de un anticuerpo o fragmento de este, un receptor de células T (TCR) y un TCR soluble (sTCR) o fragmento de este, en donde dicho fragmento de dicho anticuerpo, dicho TCR o dicho sTCR mantiene la propiedad de unirse específicamente al péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Una composición farmacéutica o una sal farmacéuticamente aceptable de esta que comprende el péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4 o el agente de unión aislado de acuerdo con la reivindicación 8 o la 9, y al menos otro componente seleccionado del grupo de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

11. Un método in vitro para producir un linfocito T citotóxico (CTL) activado o una célula T cooperadora (célula Th), el método comprende poner en contacto in vitro un CTL o una célula Th con moléculas de MHC humano clase I cargadas con antígeno y expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un período de tiempo suficiente para activar dicho CTL de una manera específica del antígeno, en donde dicho antígeno es el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

12. Un linfocito T citotóxico (CTL) activado o célula T cooperadora (célula Th), producidos mediante el método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho CTL o célula Th reconoce selectivamente una célula que presenta un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

13. Una célula T citotóxica (CTL) humana autóloga o alogénica o célula T cooperadora (célula Th), transfectada de manera recombinante con un receptor de células T de acuerdo con la reivindicación 8 o la 9.

14. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, el linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la reivindicación 12 o el anticuerpo o TCR o sTCR de acuerdo con la reivindicación 8 o la 9 para su uso en el tratamiento del cáncer.

15. El péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3, el ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4, la célula de acuerdo con la reivindicación 6 o la 7, el linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la reivindicación 12 o el anticuerpo o TCR o sTCR de acuerdo con la reivindicación 8 o la 9 para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho cáncer se selecciona de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer gástrico y glioblastoma.

Figura 1:

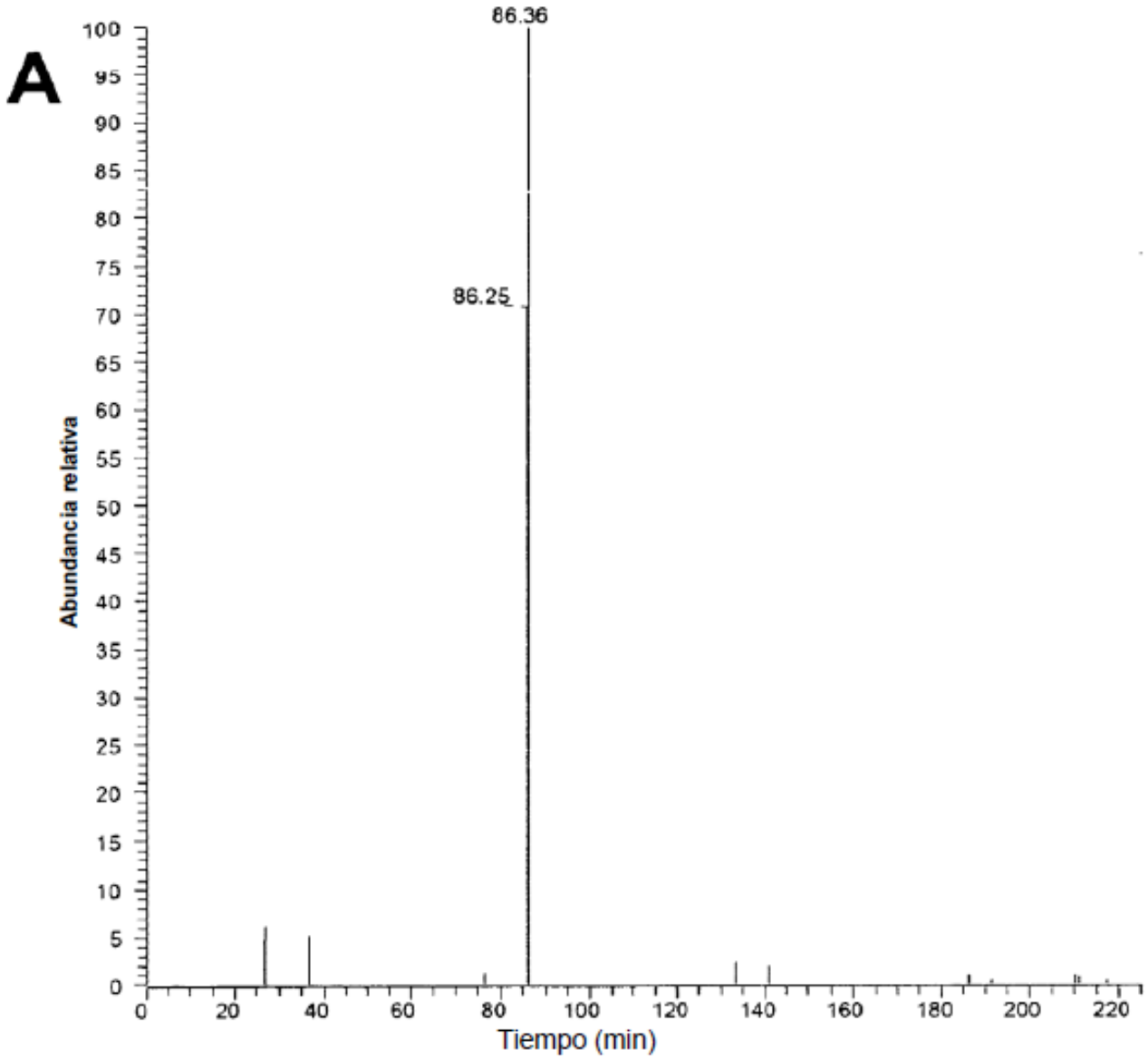

A
86.36
86.25
Abundancia relativa
Tiempo (min)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220

Figura 1 (continuación):

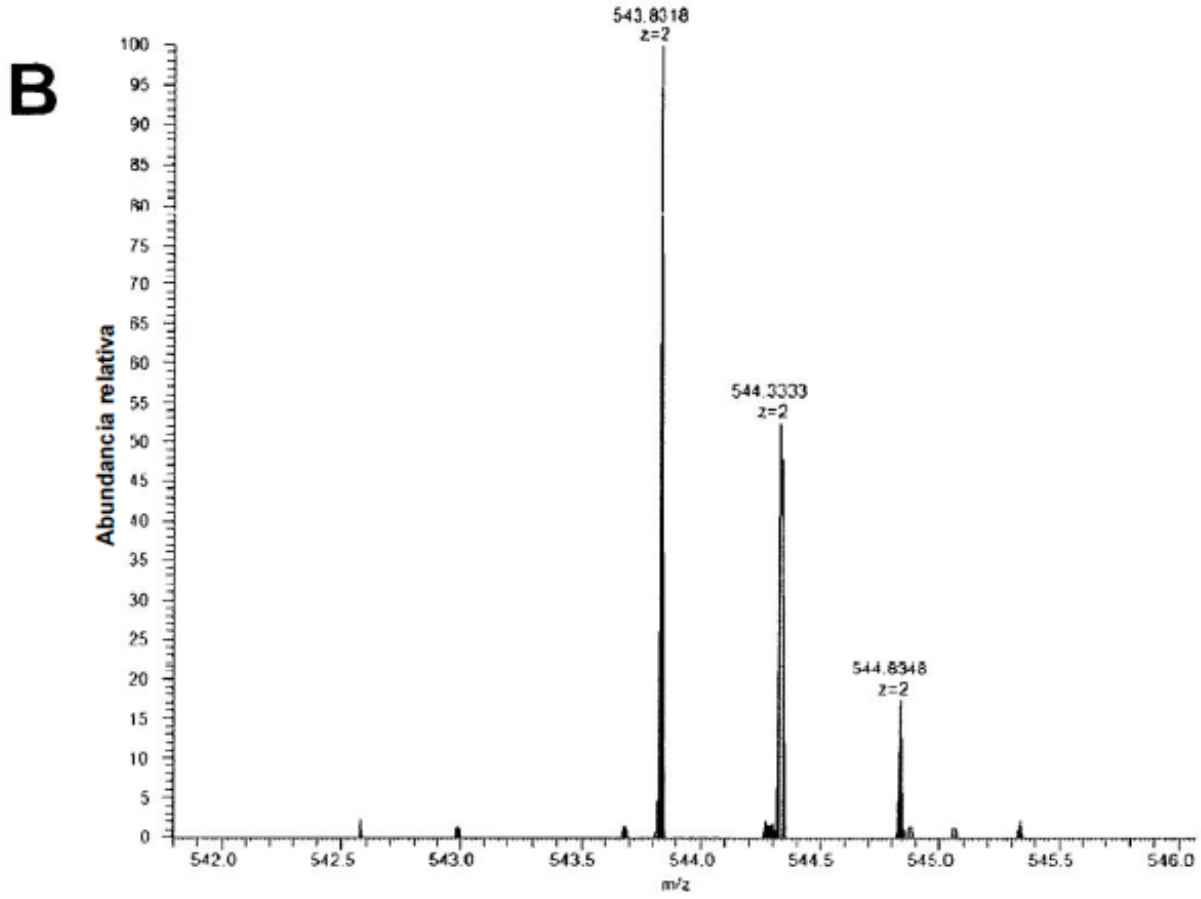


Figura 1 (continuación):

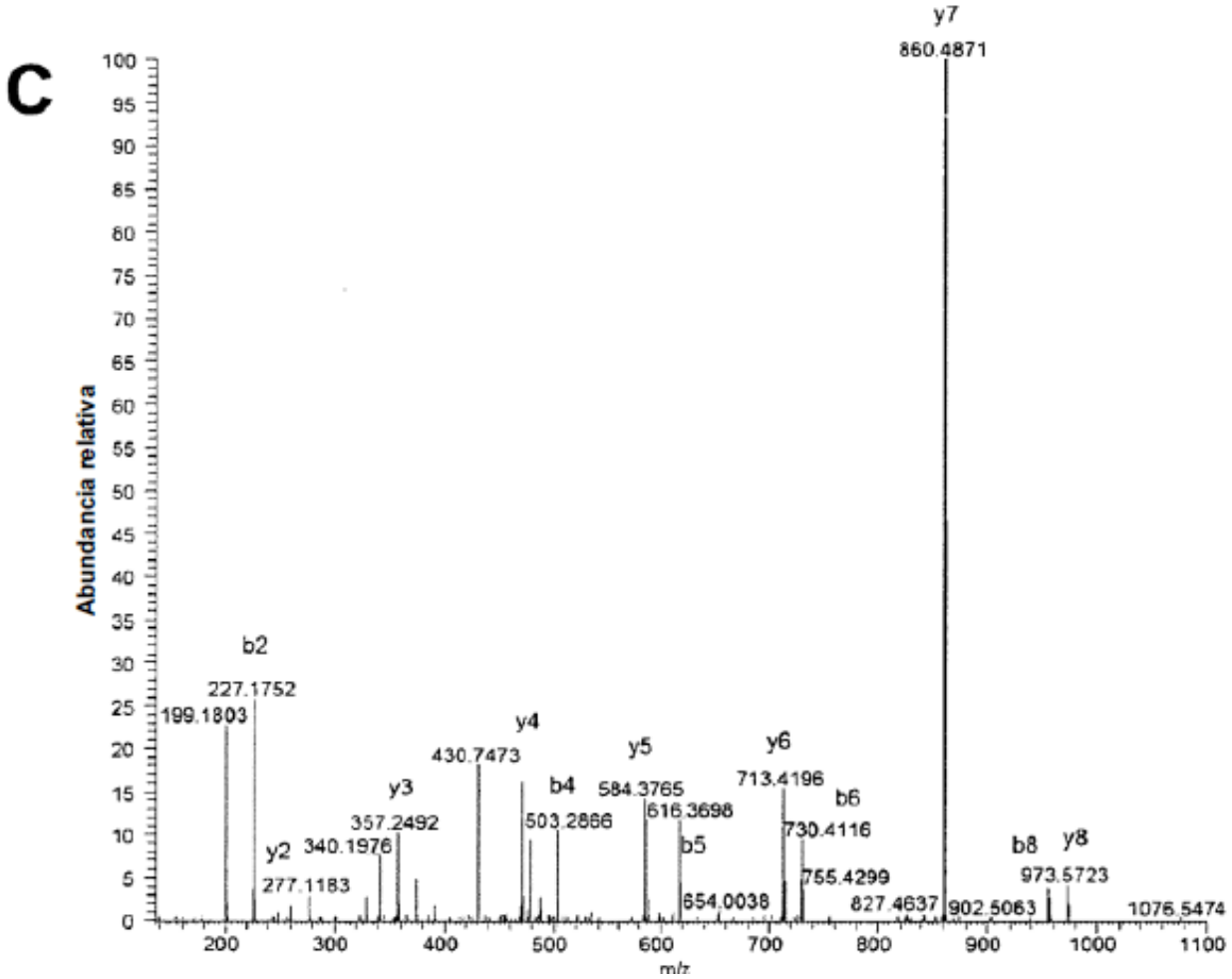


Figura 1 (continuación):

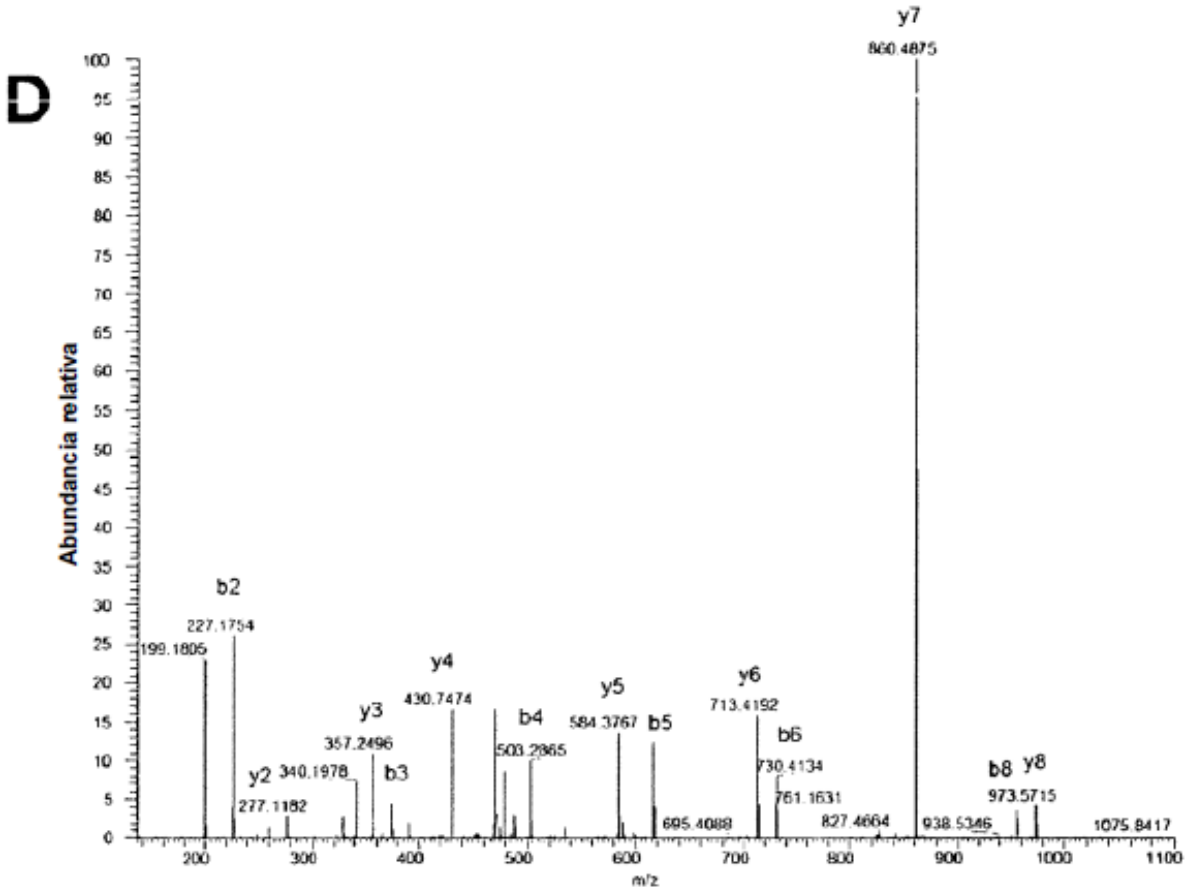


Figura 2a:

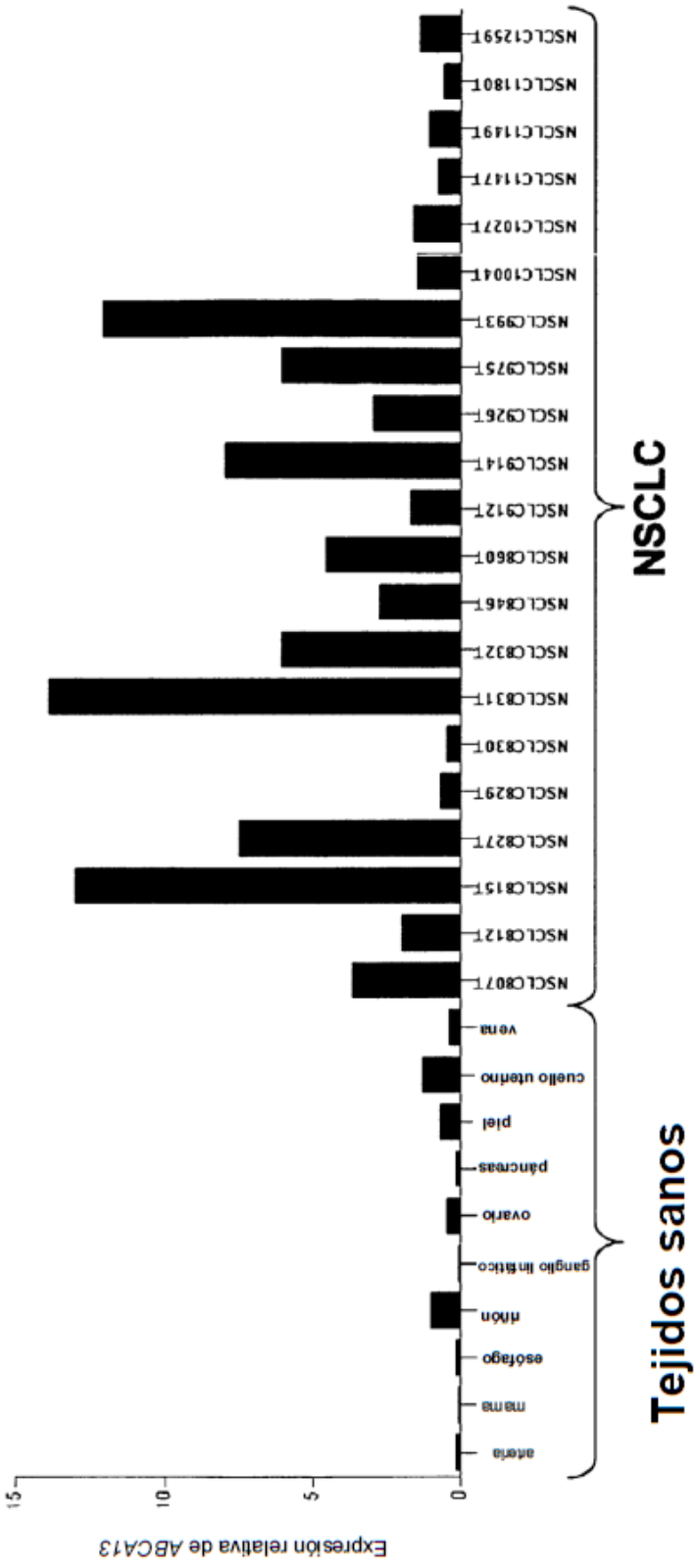

Expresión relativa de ABCA13
15
10
5
0
Tejidos sanos
NSCLC
aórta
mama
esófago
riñón
ganglio linfático
ovario
páncreas
piel
cuello uterino
vena
NSCLC807T
NSCLC812T
NSCLC815T
NSCLC827T
NSCLC829T
NSCLC830T
NSCLC831T
NSCLC832T
NSCLC846T
NSCLC860T
NSCLC912T
NSCLC914T
NSCLC926T
NSCLC975T
NSCLC993T
NSCLC1004T
NSCLC1027T
NSCLC1147T
NSCLC1149T
NSCLC1180T
NSCLC1259T

Figura 2b:

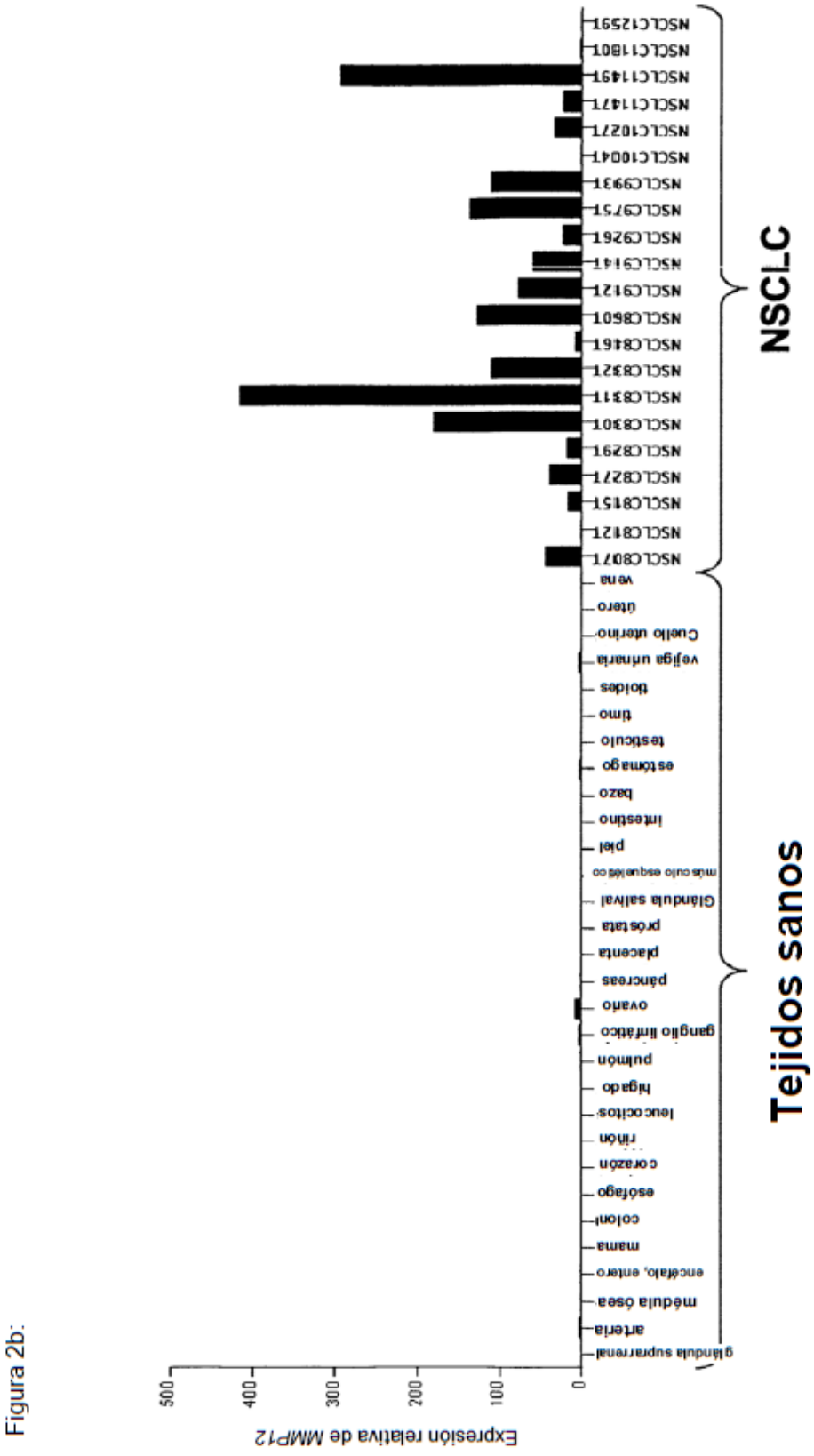
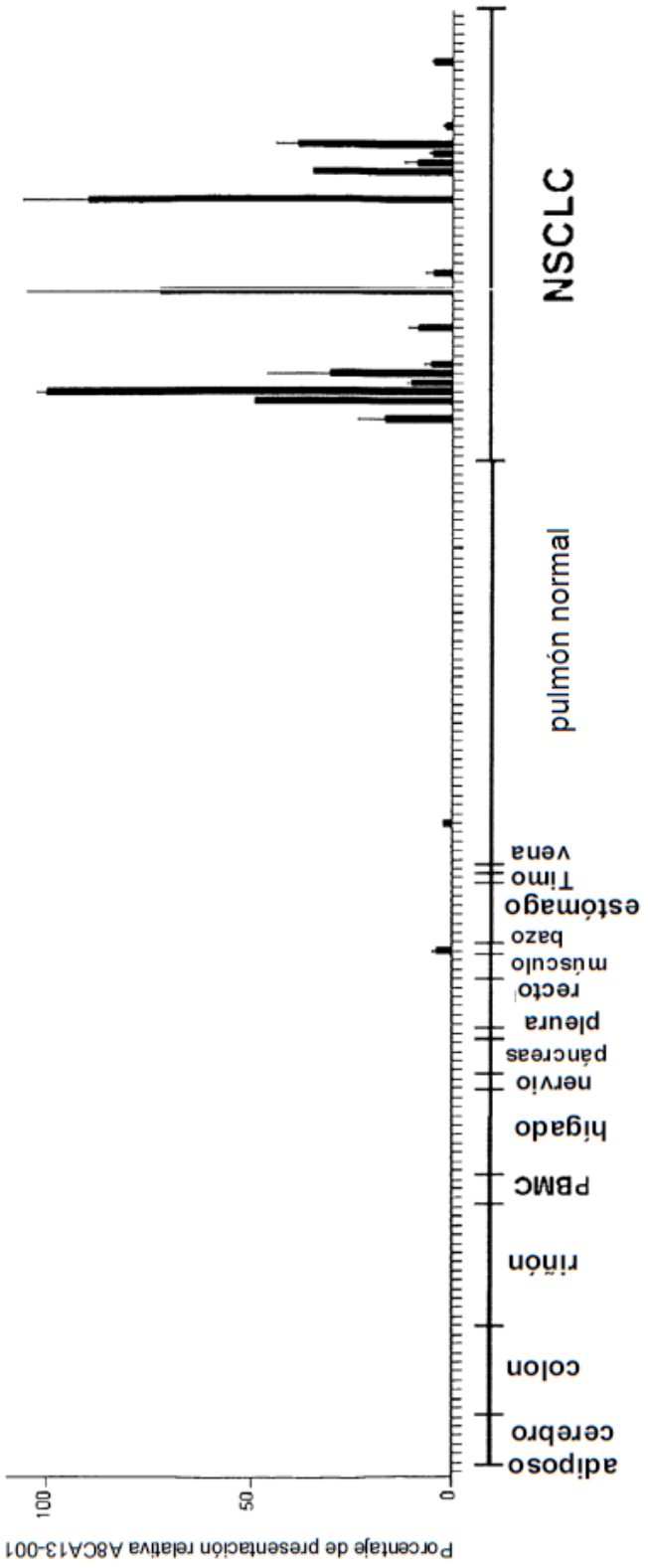

Expresión relativa de MMP-12
0
100
200
300
400
500
glándula suprarrenal
arteria
médula ósea
encéfalo, entero
mama
colon
esófago
corazón
riñón
leucocitos
hígado
pulmón
ganglio linfático
ovario
páncreas
placenta
próstata
Glándula salival
músculo esquelético
piel
intestino
bazo
estómago
testículo
timo
tiroides
vejiga urinaria
Cuello uterino
útero
vena
NSCLC
Tejidos sanos
NSCLC8071
NSCLC8121
NSCLC8151
NSCLC8271
NSCLC8291
NSCLC8301
NSCLC8311
NSCLC8321
NSCLC8461
NSCLC8501
NSCLC9121
NSCLC9141
NSCLC9261
NSCLC9751
NSCLC9931
NSCLC10041
NSCLC10271
NSCLC11471
NSCLC11491
NSCLC11801
NSCLC12591

Figura 3a:


Porcentaje de presentación relativa A8CA13-001
100
50
0
adiposo
cerebro
colon
riñón
PBMC
hígado
nervio
páncreas
pleura
recto
músculo
bazo
estómago
Timo
vena
pulmón normal
NSCLC

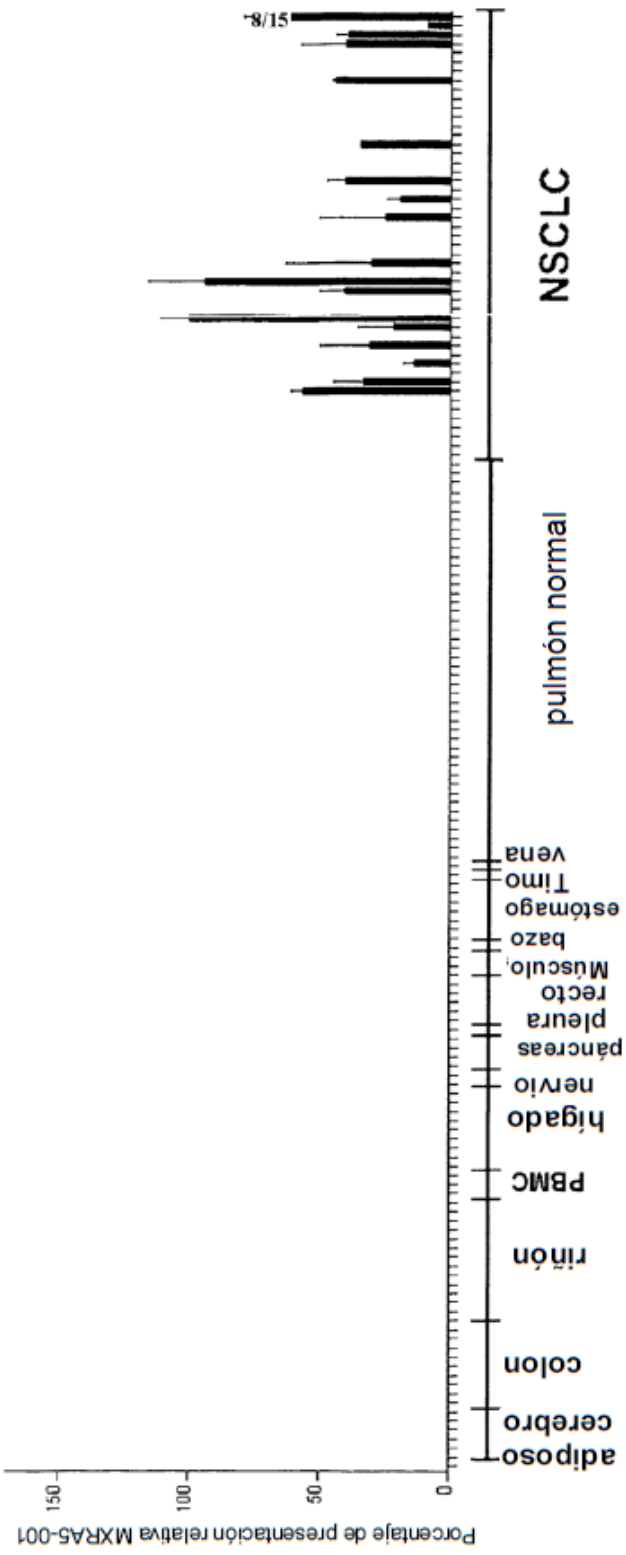

8/15
NSCLC
pulmón normal
vena
Timo
estómago
bazo
Músculo
recto
pleura
páncreas
nervio
hígado
PBMC
riñón
colon
cerebro
adiposo
0
50
100
150
Porcentaje de presentación relativa MXRA5-001

Figura 3b:

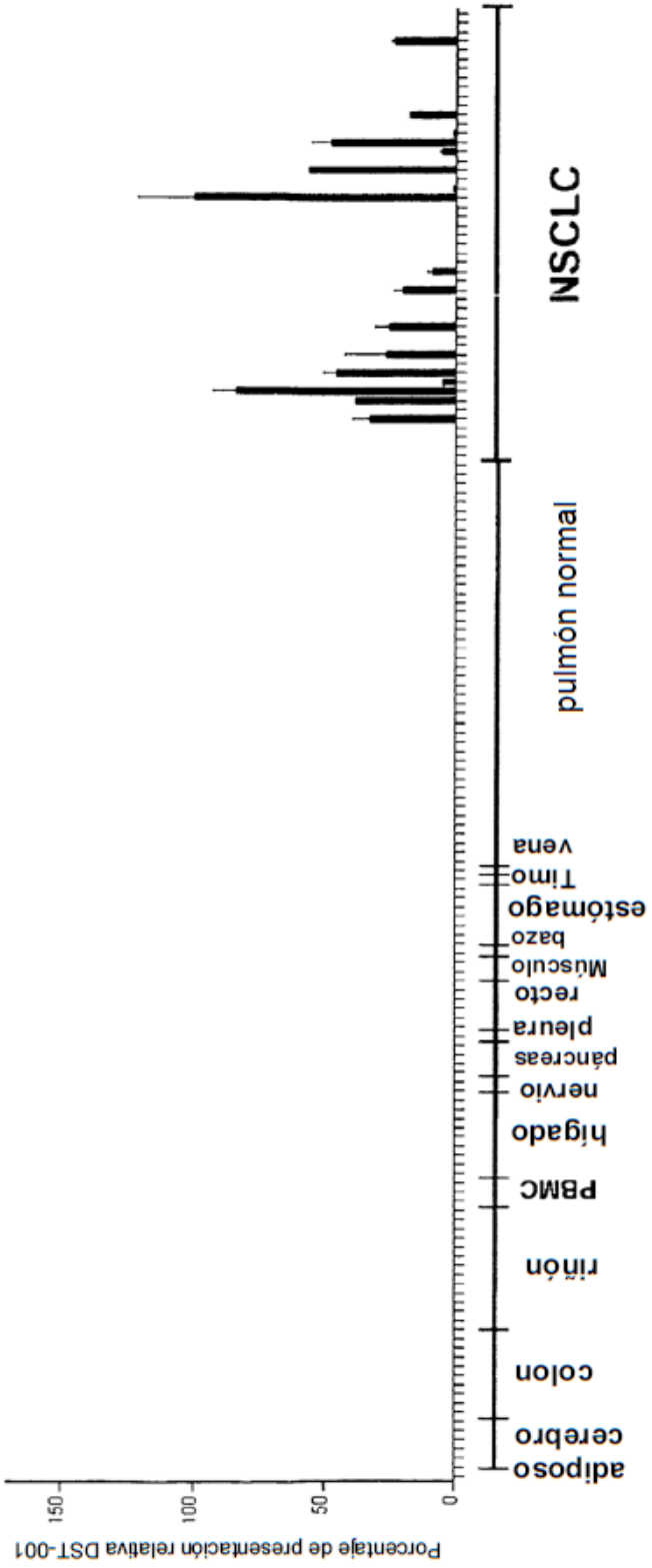

Porcentaje de presentación relativa DST-001
150
100
50
0
adiposo
cerebro
colon
riñón
PBMC
hígado
nervio
páncreas
pleura
recto
Músculo
bazo
estómago
Timo
vena
pulmón normal
NSCLC

Figura 3c:

Figura 4:

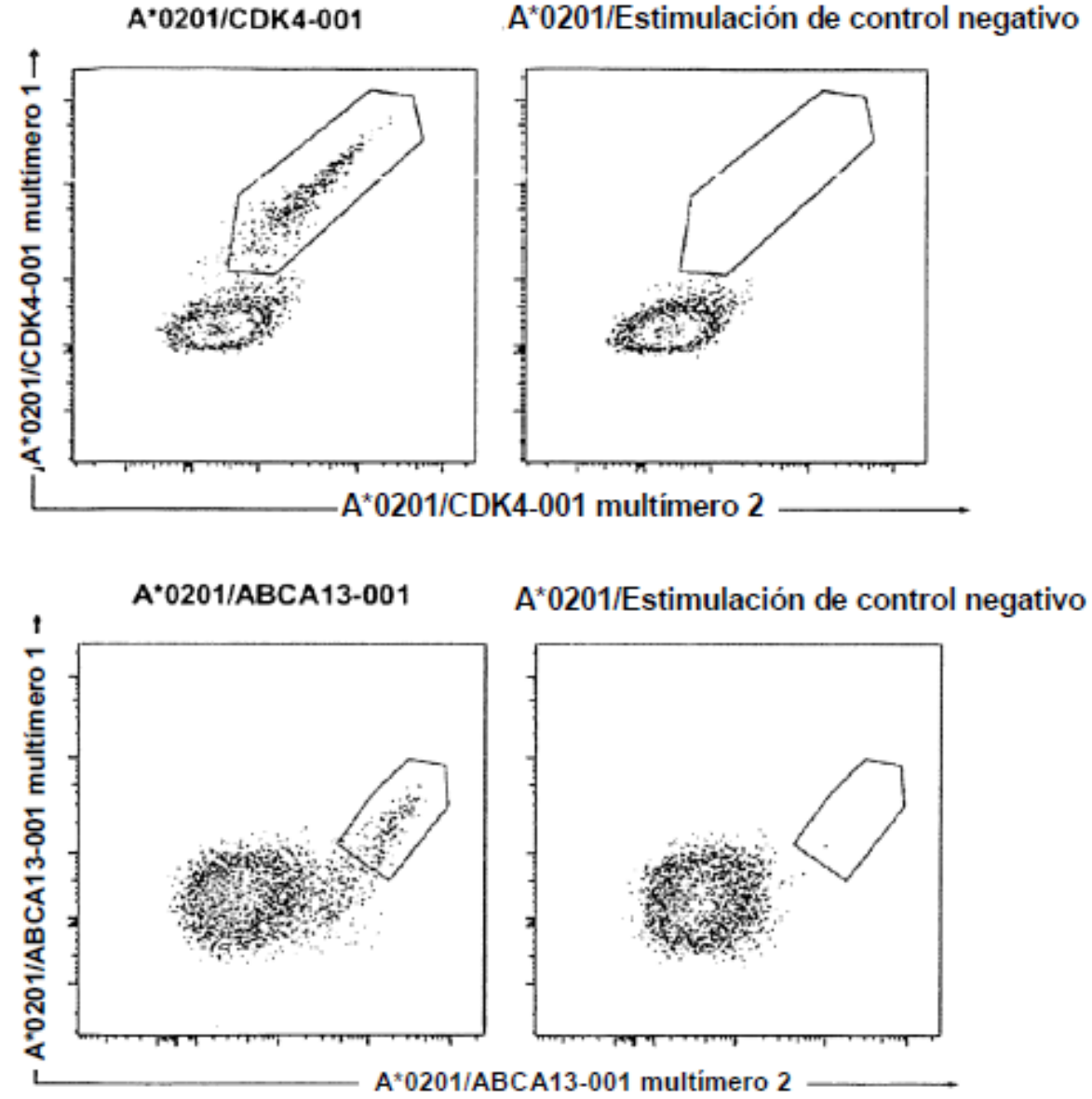

A*0201/CDK4-001
A*0201/Estimulación de control negativo
A*0201/CDK4-001 multímero 1
A*0201/CDK4-001 multímero 2
A*0201/ABCA13-001
A*0201/Estimulación de control negativo
A*0201/ABCA13-001 multímero 1
A*0201/ABCA13-001 multímero 2

Figura 5:

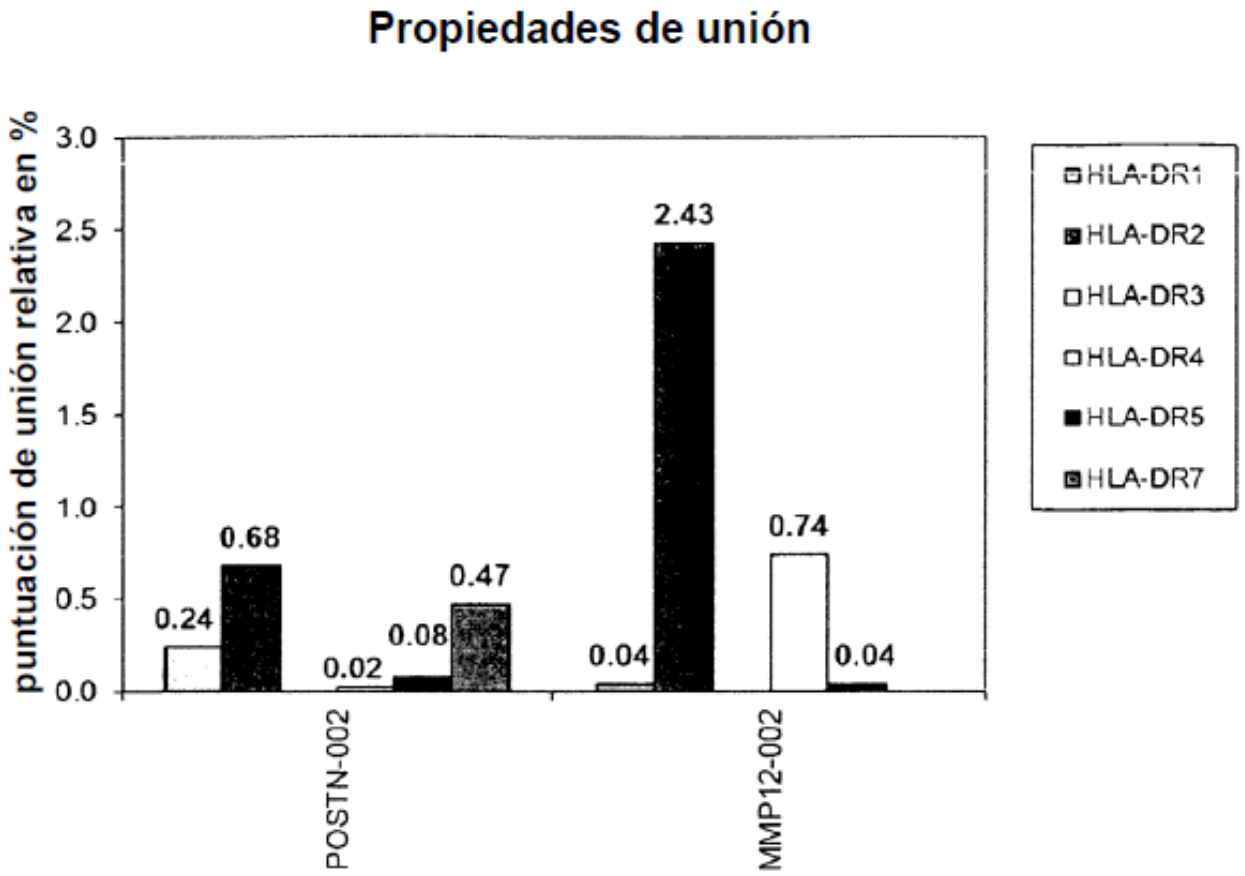

Propiedades de unión
puntuación de unión relativa en %
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.24
0.68
0.02
0.08
0.47
0.04
2.43
0.74
0.04
POSTN-002
MMP12-002
HLA-DR1
HLA-DR2
HLA-DR3
HLA-DR4
HLA-DR5
HLA-DR7

Figura 6:

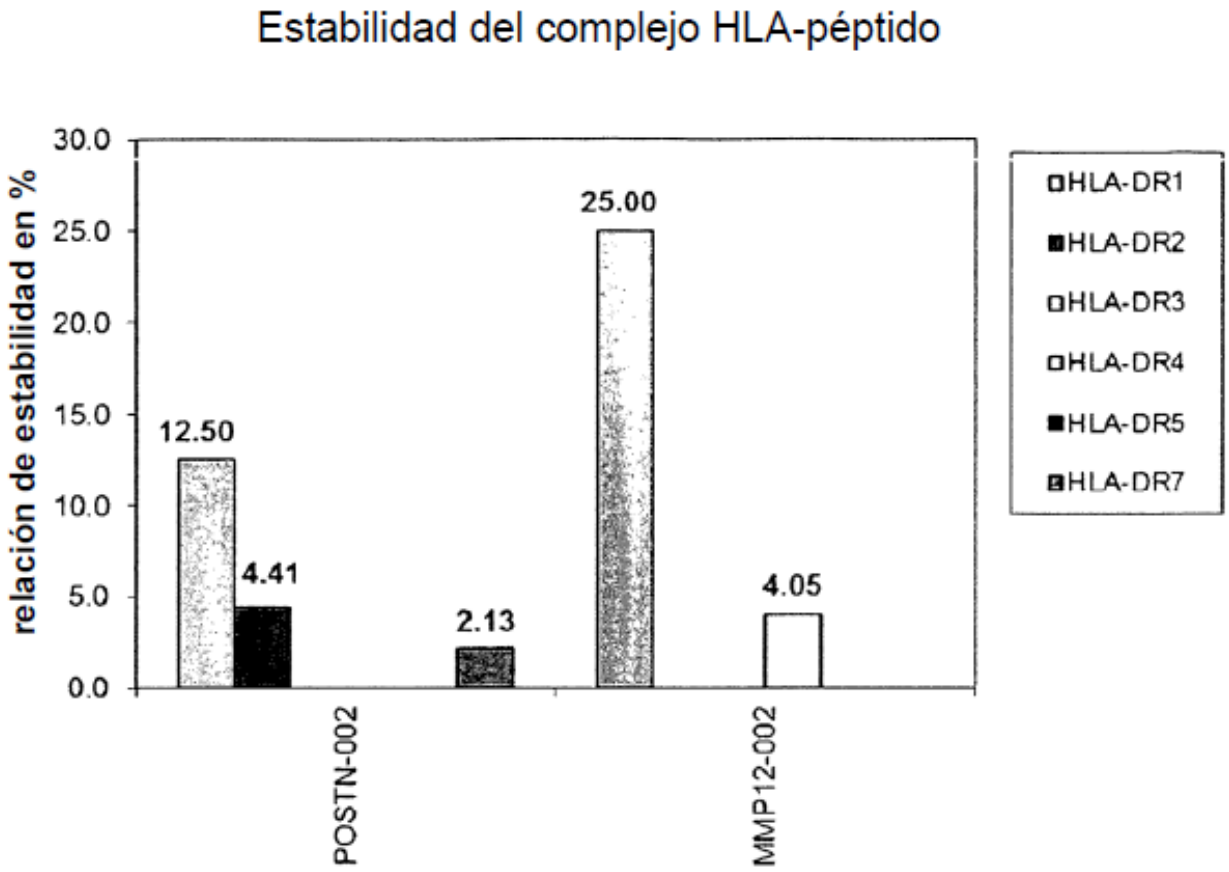

Estabilidad del complejo HLA-péptido
relación de estabilidad en %
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
12.50
4.41
2.13
25.00
4.05
POSTN-002
MMP12-002
HLA-DR1
HLA-DR2
HLA-DR3
HLA-DR4
HLA-DR5
HLA-DR7

Figura 7:

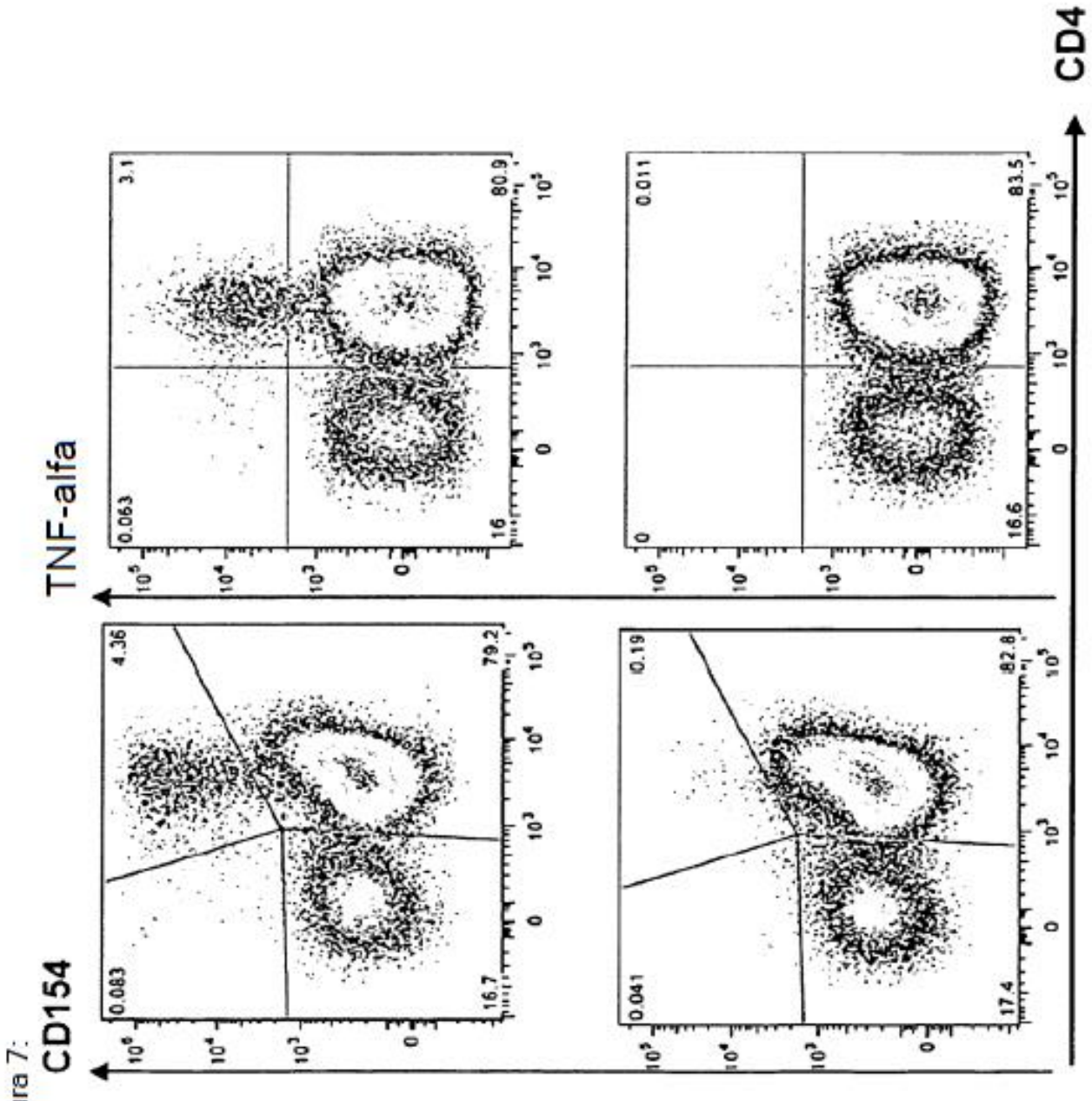

CD154
TNF-alfa
CD4
0.083
4.36
16.7
79.2
0.063
3.1
16
80.9
0.041
0.19
17.4
82.8
0
0.011
16.6
83.5

Figura 7 (continuación):

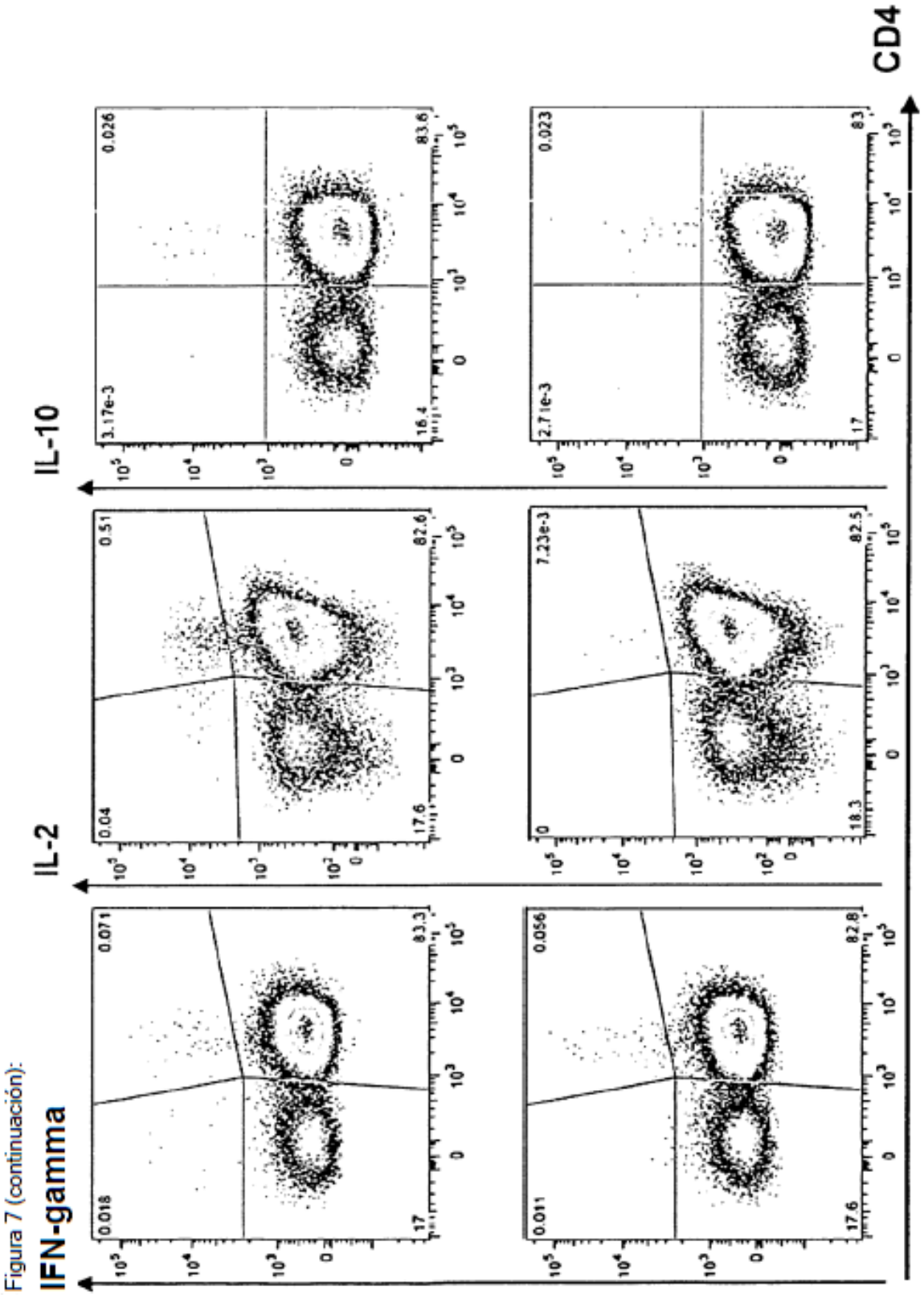
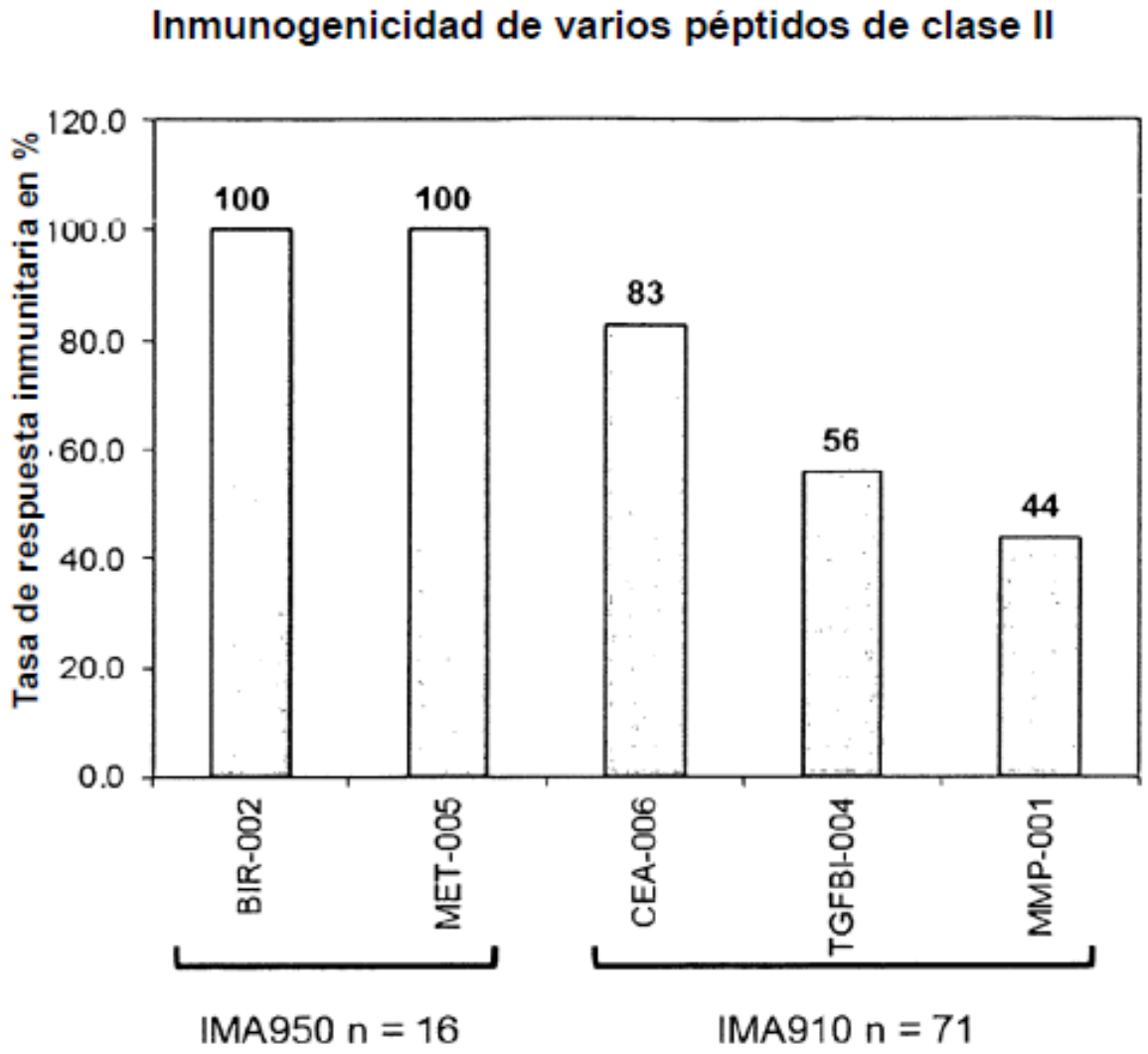


Figura 8:


Inmunogenicidad de varios péptidos de clase II
Tasa de respuesta inmunitaria en %
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
100
100
83
56
44
BIR-002
MET-005
CEA-006
TGFBI-004
MMP-001
IMA950 n = 16
IMA910 n = 71