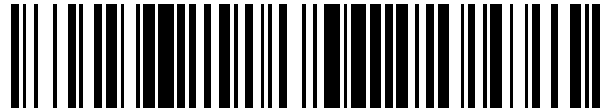


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 825**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.1999 E 10183767 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2374814**

54 Título: **Péptidos que provocan inmunidad celular T**

30 Prioridad:

08.05.1998 NO 982097

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

29.05.2014

73 Titular/es:

**GEMVAX AS (100.0%)
Drammensveien 100
0273 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**GAUDERNACK, GUSTAV;
ERIKSEN, JON AMUND;
MØLLER, MONA;
GJERTSEN, MARIANNE KLEMP y
SÆTERDAL, INGVIL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 463 825 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos que provocan inmunidad celular T.

Sumario de la invención

5 La presente invención se refiere a usos terapéuticos de péptidos que son fragmentos de productos de proteínas que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes, cuyos péptidos provocan inmunidad celular T, y a vacunas contra el cáncer y composiciones para el tratamiento contra el cáncer que comprenden dichos péptidos.

10 La invención también se refiere a tales usos de secuencias de ADN que codifican al menos un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura, y vectores que comprenden al menos un sitio de inserción que contiene una secuencia de ADN que codifica al menos un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura.

15 Adicionalmente, la invención permite procedimientos para el tratamiento o profilaxis de cánceres asociados a mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes por administración de al menos un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura o un vector de virus recombinante que comprende al menos un sitio de inserción que contiene una secuencia de ADN que codifica al menos un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura, o una secuencia de ADN aislada que comprende una secuencia de ADN que codifica al menos un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura.

La presente invención representa otro desarrollo del tratamiento contra el cáncer o profilaxis basado en el uso de péptidos para generar la activación y fortalecimiento de la actividad anticancerígena del brazo celular T del propio sistema inmunitario del cuerpo.

20 Antecedentes de la técnica

Antígenos de tumor, estado:

25 Los antígenos de linfocitos T definidos se han caracterizado ahora en un amplio espectro de tipos de cáncer. Estos antígenos pueden dividirse en varios grupos principales, dependiendo de su expresión. Los dos grupos principales están constituidos por antígenos relacionados con la diferenciación del desarrollo (antígenos de tumor-testículo, antígenos oncofetales, etc., tales como antígenos MAGE y CEA) y antígenos de diferenciación específicos para tejido (tiroxinasa, gp100, etc.). El grupo que contiene los antígenos específicos para tumor verdaderos contiene proteínas que están alteradas debido a mutaciones en los genes que las codifican. En la mayoría de estas, las mutaciones son únicas y se han detectado en un único o en un pequeño número de tumores. Varios de estos antígenos parecen desempeñar una función en la oncogénesis.

30 Vacunas contra el cáncer, estado:

La atención en el desarrollo de las vacunas contra el cáncer ha sido en antígenos expresados en un alto grado dentro de una forma de cáncer (tal como melanoma) o en muchos tipos de cánceres. Un motivo para esto es el elevado reclutamiento de pacientes en protocolos clínicos. El campo está en rápido crecimiento, ilustrado por la tabla adjunta que enumera los protocolos de vacunas contra el cáncer actualmente registrados en la base de datos PDQ de NCI.

35 Prueba de genes de cáncer hereditario/cáncer:

40 Las formas heredadas de cáncer se producen con una cierta frecuencia en la población. Para varias de estas formas de cáncer, los defectos genéticos subyacentes se han mapeado. Esto también es el caso en cánceres por síndrome de Lynch, que constituyen un grupo importante de cáncer hereditario. En familias infligidas con este síndrome, los miembros de la familia heredan genes defectuosos que codifican enzimas reparadoras del emparejamiento incorrecto (MMR) de ADN. Portadores de tales defectos de MMR frecuentemente desarrollan cáncer colorrectal (HNPCC) y otras formas de cáncer (¿lista?). Las mutaciones en enzimas MMR pueden detectarse usando el listado de genes de la misma forma que pueden detectarse otros genes relacionados con el cáncer.

45 La prueba génica de grupos de riesgo representa en este caso un dilema ético, ya que no existen formas aceptables de tratamiento profiláctico. Actualmente, la cirugía para extirpar el órgano en peligro de desarrollar cáncer ha sido la única opción de tratamiento. En estos pacientes, las vacunas contra el cáncer serán una forma (muy) interesante de profilaxis, dado que pueden desarrollarse vacunas eficaces.

50 La falta de reparación eficiente de ADN incorrectamente emparejado produce deleciones e inserciones en una cadena de ADN, y esto ocurre preferencialmente en estiramientos de ADN que contienen unidades repetidas (secuencias de repetición). Hasta ahora, el objetivo han sido secuencias en forma de sitios de microsatélite no codificantes. De hecho, la inestabilidad de microsatélites es el distintivo de cánceres resultantes de defectos de MMR. Los presentes inventores han tomado otro enfoque, y se han concentrado en mutaciones con desplazamiento del marco de lectura que se

producen en secuencias de ADN que codifican proteínas relacionadas con el proceso oncogénico. Tales mutaciones con desplazamiento del marco de lectura producen secuencias de aminoácidos completamente nuevas en la parte del extremo C de las proteínas, terminando prematuramente donde aparece un novedoso codón de terminación. Esto produce dos consecuencias importantes:

5 1) La proteína truncada resultante del desplazamiento del marco de lectura es generalmente no funcional, produciendo en la mayoría de los casos "inactivación" de una función celular importante. Las proteínas anómalas también pueden adquirir nuevas funciones tales como la capacidad para agregarse y formar placas. En ambos casos, el desplazamiento del marco de lectura produce enfermedad.

10 2) La nueva secuencia de aminoácidos del extremo C corta resultante del desplazamiento en el marco de lectura (la "secuencia de desplazamiento del marco de lectura") es extraña al cuerpo. No existe antes de la mutación, y solo existe en células que tienen la mutación, es decir, en células tumorales y sus progenitores premalignos. Como son completamente novedosas y, por tanto, extrañas al sistema inmunitario del portador, pueden ser reconocidas por linfocitos T en el repertorio del portador. Hasta la fecha, nadie se ha centrado en este aspecto de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura, y no existen informes de la caracterización de péptidos con desplazamiento
15 del marco de lectura de regiones codificantes de proteínas como antígenos tumorales. Por tanto, este concepto es novedoso y forma la base para desarrollar vacunas basándose en estas secuencias. De esto resulta que tales vacunas también puedan usarse profilácticamente en personas que heredan enzimas defectuosas que pertenecen a la maquinaria de MMR. Por tanto, tales vacunas llenarán un espacio vacío en el armamento terapéutico contra formas heredadas del cáncer.

20 Se ha mostrado que sustituciones de un único aminoácido en "auto"-proteínas intracelulares pueden dar lugar a antígenos de rechazo tumoral, que consiste en péptidos que se diferencian en su secuencia de aminoácidos del péptido normal. Los linfocitos T que reconocen estos péptidos en el contexto de moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre la superficie de las células tumorales pueden destruir las células tumorales y así rechazar el tumor del huésped.

25 A diferencia de anticuerpos producidos por los linfocitos B, que normalmente reconocen un antígeno libre en su conformación nativa y adicionalmente reconocen posiblemente casi cualquier sitio expuesto sobre la superficie del antígeno, los linfocitos T reconocen un antígeno solo si el antígeno está unido y es presentado por una molécula de MHC. Normalmente, esta unión tendrá lugar solo después del procesamiento apropiado de antígenos, que comprende una fragmentación proteolítica de la proteína, de manera que el fragmento de péptido resultante se ajusta en la ranura
30 de la molécula de MHC. Así, también se permite que los linfocitos T reconozcan péptidos derivados de proteínas intracelulares. Los linfocitos T pueden así reconocer péptidos anómalos derivados de cualquier parte en la célula tumoral, en el contexto de moléculas de MHC sobre la superficie de la célula tumoral, y pueden posteriormente activarse para eliminar la célula tumoral que aloja el péptido anómalo.

35 M. Barinaga, Science, 257, 880-881, 1992, ofrece una breve revisión de cómo el MHC se une a péptidos. Una explicación más completa de los antecedentes técnicos de la presente invención puede encontrarse en D. Male y col., Advanced Immunology, 1987, J. B. Lippincott Company, Filadelfia.

Las moléculas de MHC en seres humanos normalmente se denominan moléculas de HLA (antígeno leucocitario humano). Están codificadas por la región de HLA sobre el cromosoma humano nº 6.

40 Las moléculas de HLA aparecen como dos clases distintas dependiendo de por qué región del cromosoma estén codificadas y con qué subpoblaciones de linfocitos T interaccionen y así se activan principalmente. Las moléculas de clase I están codificadas por los subsitios A, B y C de HLA y principalmente activan linfocitos T citotóxicos CD8+. Las moléculas de clase II de HLA están codificadas por los subsitios DR, DP y DQ y principalmente activan linfocitos T CD4+, tanto células colaboradoras como células citotóxicas.

45 Normalmente, cada individuo tiene seis moléculas de clase I de HLA, normalmente dos de cada uno de los tres grupos A, B y C. Correspondientemente, todos los individuos tienen su propia selección de moléculas de clase II de HLA, de nuevo dos de cada uno de los tres grupos DP, DQ y DR. Cada uno de los grupos A, B, C y DP, DQ y DR se dividen de nuevo en varios subgrupos. En algunos casos, el número de moléculas de clase I o II de HLA diferentes se reduce debido al solapamiento de dos subgrupos de HLA.

50 Todos los productos génicos son altamente polimórficos. Así, diferentes individuos expresan distintas moléculas de HLA que se diferencian de aquellas de otros individuos. Esto es la base de las dificultades en encontrar donantes de órganos de HLA coincidente en trasplantes. La significancia de la variación genética de las moléculas de HLA en inmunobiología se refleja por su función como genes de la respuesta inmunitaria. Mediante su capacidad de unión a péptido, la presencia o ausencia de ciertas moléculas de HLA gobierna la capacidad de un individuo para responder a epítopes de péptidos. Como consecuencia, las moléculas de HLA determinan la resistencia o susceptibilidad a
55 enfermedad.

5 Los linfocitos T pueden controlar el desarrollo y crecimiento del cáncer mediante una variedad de mecanismos. Los linfocitos T citotóxicos, tanto CD8+ limitado a la clase I de HLA como CD4+ limitado a la clase II de HLA, pueden destruir directamente células tumorales que llevan los antígenos tumorales apropiados. Los linfocitos T colaboradores CD4+ se necesitan para respuestas de linfocitos T CD8+ citotóxicos, además de para respuestas de anticuerpos, y para inducir destrucción de macrófagos y de células LAK.

10 Un requisito para la unión de tanto la clase I como II de HLA es que los péptidos deban contener un motivo de unión, que normalmente es diferente para diferentes grupos y subgrupos de HLA. Un motivo de unión se caracteriza por el requisito de aminoácidos de un cierto tipo, por ejemplo, los que llevan grupos laterales grandes e hidrófobos o positivamente cargados, en posiciones definidas del péptido de manera que se logre un estrecho ajuste con los bolsillos del surco de unión de HLA. El resultado de esto, tomado conjuntamente con la restricción de longitud del péptido de 8-10 aminoácidos dentro del surco de unión, es que es bastante poco probable que una unión de péptido a un tipo de moléculas de la clase I de HLA también se una a otro tipo. Así, por ejemplo, es muy posible que el motivo de unión a péptido para los subgrupos HLA-A1 y HLA-A2, que ambos pertenecen al género clase I, sea tan diferente como los motivos para las moléculas HLA-A1 y HLA-B1.

15 Por los mismos motivos no es probable que exactamente la misma secuencia de aminoácidos se localice en el surco de unión de las diferentes moléculas de clase II. En el caso de moléculas de la clase II de HLA, las secuencias de unión de péptidos pueden ser más largas, y se ha encontrado que normalmente contienen de 10 a 16 aminoácidos, algunos de los cuales, en uno o ambos extremos, no son una parte del motivo de unión para el surco de HLA.

20 Sin embargo, puede producirse un solapamiento de los diferentes motivos de unión a péptido de varias moléculas de la clase I y clase II de HLA. Se dice que los péptidos que tienen un solapamiento en las secuencias de unión para al menos dos moléculas de HLA diferentes contienen "epítopes de linfocitos T anidados". Los diversos epítopes contenidos en un "péptido de epítopo anidado" pueden formarse por procesamiento del péptido por células presentadoras de antígeno y presentarse más adelante a linfocitos T unidos a diferentes moléculas de HLA. La variedad individual de moléculas de HLA en seres humanos hace que los péptidos que contienen epítopes anidados sean más útiles como vacunas generales que los péptidos que solo pueden unirse a un tipo de molécula de HLA.

La vacunación eficaz de un individuo puede solo lograrse si al menos un tipo de molécula de la clase I y/o II de HLA en el paciente puede unirse a un péptido de la vacuna tanto en su longitud completa como procesado y recortado por las propias células presentadoras de antígeno del paciente.

30 La utilidad de un péptido como vacuna general para la mayoría de la población aumenta con el número de diferentes moléculas de HLA a las que puede unirse, tanto en su longitud completa como después del procesamiento por células presentadoras de antígeno.

35 Con el fin de usar péptidos derivados de una proteína codificada por un gen mutado como vacunas o agentes antineoplásicos para generar linfocitos T anti-CD4+ y/o CD8+ tumorales, es necesario investigar la proteína mutante en cuestión e identificar péptidos que puedan, eventualmente después del procesamiento a péptidos más cortos por las células presentadoras de antígeno, estimular linfocitos T.

Técnica anterior

40 En la solicitud internacional del solicitante PCT/N092/00032 (publicada como WO92/14756), los presentes inventores describieron péptidos sintéticos y fragmentos de productos de proteínas oncogénicas que tenían un punto de mutación o translocaciones con respecto a su proto-oncogén o proteína de gen supresor de tumores. Estos péptidos se corresponden con, cubren completamente o son fragmentos del fragmento de proteína oncogénica procesada o fragmento del gen supresor de tumores como se presenta por células cancerosas u otras células presentadoras de antígeno, y se presentan como complejo de HLA-péptido por al menos un alelo en cada individuo. También se mostró que estos péptidos inducían respuestas de linfocitos T específicas para el fragmento de proteína oncogénica real producido por la célula por procesamiento y presentado en la molécula de HLA. En particular, los presentes inventores describieron péptidos derivados de la proteína p21 *ras* se tenían mutaciones puntuales en posiciones de aminoácidos particulares, concretamente la posición 12, 13 y 61. Se ha mostrado que estos péptidos son eficaces en regular el crecimiento de células cancerosas *in vitro*. Además, se mostró que los péptidos provocaban inmunidad de linfocitos T CD4+ contra células cancerosas que alojaban la proteína oncogénica p21 *ras* mutada mediante la administración de tales péptidos en esquemas de vacunación o de terapia para el cáncer. Después, los presentes inventores han mostrado que estos péptidos también provocan inmunidad de linfocitos T CD8+ contra células cancerosas que alojan la proteína oncogénica p21 *ras* mutada mediante la administración mencionada anteriormente.

55 Sin embargo, los péptidos descritos anteriormente serán útiles solo en ciertos números de cánceres, concretamente aquellos que implican oncogenes con mutaciones puntuales o translocación en un proto-oncogén o gen supresor de tumores. Por tanto, hay una fuerte necesidad de un tratamiento contra el cáncer o vacuna que sea eficaz contra una variedad más general de cánceres.

En general, los tumores son muy heterogéneos con respecto a las alteraciones genéticas encontradas en las células tumorales. Esto implica que tanto la posible fuerza del efecto terapéutico como profiláctico de una vacuna contra el cáncer aumentará con el número de dianas contra las que la vacuna puede provocar inmunidad de linfocitos T. Una vacuna para múltiples dianas también reducirá el riesgo de la nueva formación de tumores mediante el tratamiento de variantes de escape del tumor primario.

Definición del problema a resolver por la invención

Existe una necesidad continua de nuevos agentes antineoplásicos basados en péptidos antigénicos que dan lugar a respuestas celulares T específicas y toxicidad contra tumores y células cancerosas que llevan genes con mutaciones relacionadas con el cáncer. La presente invención contribuirá ampliamente al suministro de nuevos péptidos que puedan tener un uso en el combate y la prevención del cáncer como componentes en una vacuna anticancerígena de múltiples dianas.

Otro problema resuelto por la presente invención es que una protección o tratamiento puede ofrecerse a los individuos que pertenecen a familias o grupos con alto riesgo de cánceres hereditarios. Los cánceres hereditarios están en muchos casos asociados a genes susceptibles a mutaciones con desplazamiento del marco de lectura como se describe en la presente invención (es decir, mutaciones en genes de reparación de emparejamiento incorrectos). Hoy en día es posible diagnosticar el riesgo de tener cáncer hereditario, pero no está disponible ningún procedimiento farmacéutico para la protección contra la aparición del cáncer.

Definición de la invención

Un objetivo principal de la invención es utilizar péptidos correspondientes a fragmentos de péptidos de proteínas mutantes producidas por células cancerosas que pueden usarse para estimular linfocitos T.

Otro objetivo principal de la invención es desarrollar una terapia para el cáncer para cánceres basados en la inmunidad de linfocitos T que puede inducirse en pacientes estimulando sus linfocitos T tanto *in vivo* como *in vitro* con los péptidos según la invención.

Un tercer objetivo principal de la invención es desarrollar una vacuna para prevenir el establecimiento de o para erradicar cánceres basados únicamente o parcialmente en péptidos correspondientes a péptidos de la presente invención que pueden usarse para generar y activar linfocitos T que producen inmunidad de linfocitos T citotóxicos contra células que alojan los genes mutados.

Un cuarto objetivo principal de la invención es diseñar un tratamiento contra el cáncer o profilaxis específicamente adaptado a un individuo humano en necesidad de tal tratamiento o profilaxis, que comprende administrar al menos un péptido según la presente invención.

Estos y otros objetivos de la invención se alcanzan por las reivindicaciones adjuntas.

Como las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura producen codones de terminación prematuros y, por tanto, la delección en grandes partes de las proteínas, generalmente no se ha considerado que las proteínas con mutaciones con desplazamiento del marco de lectura sean inmunogénicas y, por tanto, no se han considerado como dianas para inmunoterapia. Así, ahora se ha encontrado sorprendentemente que un grupo completo de nuevos péptidos resultantes de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes relevantes para tumores son útiles para provocar respuestas de linfocitos T contra células cancerosas que alojan genes con tales mutaciones con desplazamiento del marco de lectura.

Los genes que contienen una secuencia de repetición de bases de mononucleósidos de al menos cinco residuos, por ejemplo, de ocho bases de desoxiadenosina (AAAAAAAA), o una secuencia de repetición de bases de di-nucleósidos de al menos cuatro unidades de base de di-nucleósidos, por ejemplo, de dos unidades de desoxiadenosina-desoxicitosina (ACAC), son susceptibles a mutaciones con desplazamiento del marco de lectura. Las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura se producen, respectivamente, tanto por inserción de uno o dos de los residuos de bases de mono-nucleósidos como de una o dos de las unidades de bases de di-nucleósidos en la secuencia de repetición, o por delección de uno o dos de los residuos de bases de mono-nucleósidos o de una o dos de las unidades de bases de di-nucleósidos de la secuencia de repetición. Un gen con una mutación con desplazamiento del marco de lectura codificará el punto de mutación de una proteína con una secuencia de aminoácidos nueva y totalmente diferente con respecto al producto génico normal. Esta proteína mutante con la nueva secuencia de aminoácidos en el extremo carboxi será específica para todas las células que llevan el gen modificado.

En el resto de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones la denominación péptidos mutantes por desplazamiento del marco de lectura comprenderá tales proteínas y fragmentos de péptido de las mismas.

Ahora se ha encontrado según la presente invención que las secuencias de proteínas que se producen a partir de

mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes en células cancerosas dan lugar a antígeno de rechazo tumoral que son reconocidos por linfocitos T en el contexto de moléculas de HLA.

5 Se ha encontrado adicionalmente según la presente invención un grupo de péptidos correspondientes a fragmentos de proteínas mutantes que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes en células cancerosas que puede usarse para generar linfocitos T. Por tanto, dichos péptidos también pueden usarse para producir una activación de linfocitos T contra células cancerosas que alojan un gen con una mutación con desplazamiento del marco de lectura como se ha descrito anteriormente.

10 Estos péptidos tienen al menos 8 aminoácidos de longitud y se corresponden, tanto en su longitud completa como después del procesamiento por células presentadoras de antígeno, con los productos génicos mutantes o fragmentos de los mismos producidos por células cancerosas en un paciente humano afectado con cáncer.

Un péptido para su uso en la invención se define generalmente en la reivindicación 1.

Los péptidos de la presente invención contienen preferentemente 8-25, 9-20, 9-16, 8-12 ó 20-25 aminoácidos. Pueden, por ejemplo, contener 9, 12, 13, 16 ó 21 aminoácidos.

15 Es más preferido que los péptidos de la presente invención tengan al menos 9 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 9-18 aminoácidos de longitud, pero debido a la posibilidad de procesamiento de las células presentadoras de antígeno también péptidos más largos son muy adecuados para la presente invención. Así, la secuencia de aminoácidos mutante completa puede usarse como péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura según la presente invención, si comprende 8 aminoácidos o más.

20 La invención permite adicionalmente un procedimiento para la vacunación de una persona predispuesta al cáncer, asociado a una mutación con desplazamiento del marco de lectura en un gen, que consiste en administrar al menos un péptido de la invención una o más veces en una cantidad suficiente para la inducción de inmunidad de células T a las proteínas mutantes codificadas por el gen mutado con desplazamiento del marco de lectura.

25 La invención también permite un procedimiento para el tratamiento de un paciente afectado con cáncer asociado a una mutación con desplazamiento del marco de lectura en genes, que consiste en administrar al menos un péptido de la invención una o más veces en una cantidad suficiente para la inducción de inmunidad de linfocitos T a proteínas mutantes que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en los genes de células cancerosas.

30 Además, la invención también permite un procedimiento para identificar nuevos péptidos que se corresponden con fragmentos de proteínas que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes. Este procedimiento se caracteriza por las siguientes etapas:

1) identificar un gen en una célula cancerosa susceptible a mutación con desplazamiento del marco de lectura por tener una secuencia de repetición de bases de mononucleósidos de al menos cinco residuos, o una secuencia de repetición de bases de di-nucleósidos de al menos cuatro unidades de bases de di-nucleósidos;

y

35 2) eliminar, respectivamente, un residuo de bases de nucleósidos o una unidad de bases de di-nucleósidos de la secuencia de repetición e identificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia de genes alterada en tanto que incluya un nuevo codón de terminación;

y/o

40 3) eliminar, respectivamente, dos residuos de bases de nucleósidos o dos unidades de bases de di-nucleósidos de la secuencia de repetición e identificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia de genes alterada en tanto que incluya un nuevo codón de terminación;

y/o

45 4) insertar, respectivamente, un residuo de bases de nucleósidos o una unidad de bases de di-nucleósidos en la secuencia de repetición e identificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia de genes alterada en tanto que incluya un nuevo codón de terminación;

y/o

5) insertar, respectivamente, dos residuos de bases de nucleósidos o dos unidades de bases de di-nucleósidos en la secuencia de repetición e identificar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por la secuencia de genes alterada en tanto que incluya un nuevo codón de terminación.

Con el fin de determinar si los péptidos así identificados son o no útiles para el tratamiento o profilaxis de cáncer, debe realizarse la siguiente etapa adicional:

6) determinar si el nuevo péptido, tanto en su longitud completa como fragmentos más cortos de los péptidos, puede estimular o no linfocitos T.

5 Opcionalmente puede añadirse otra etapa del siguiente modo:

7) determinar péptidos que contienen epítopes anidados para diferentes moléculas de la clase I de HLA y/o la clase II de HLA principales.

Descripción detallada de la invención

10 En la presente descripción y reivindicaciones, los aminoácidos se representan por su abreviatura de una letra como se conoce en la técnica.

Los péptidos de la presente invención deben ejemplificarse explícitamente basándose en mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en el gen BAX:

l) Gen BAX

15 Se ha establecido que el gen BAX participa en la regulación de la supervivencia o muerte de células promoviendo la apoptosis. El gen BAX humano contiene una secuencia de repetición de ocho bases de desoxiguanosina (G8) en el tercer exón, que atraviesa los codones 38 a 41 (ATG GGG GGG GAG).

20 Se han observado mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en esta repetición G8, tanto como repeticiones G7 (ATG GGG GGG AGG) como G9 (ATG GGG GGG GGA), ambas en células de cáncer de colon y células de cáncer de próstata. La aparición es superior al 50 % de los casos examinados (Rampino, N. y col., "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype", Science (Washington CD), 275: 967-969, 1997). Los productos génicos BAX modificados son incapaces de promover la apoptosis y así hace posible el progreso adicional del tumor. Además, los productos génicos modificados solo se encuentran en células cancerosas y, por tanto, son dianas para inmunoterapia específica.

25 Según la presente invención, péptidos correspondientes a los productos de proteínas BAX transformados que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en el gen BAX pueden usarse como agentes terapéuticos antineoplásicos o vacunas con la función de desencadenar el brazo celular del sistema inmunitario (linfocitos T) contra células cancerosas en pacientes afectados con cánceres asociados a un gen BAX modificado.

30 Las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en el gen BAX producen secuencias de péptidos mutantes con el primer aminoácido de la secuencia alterado en la posición 41 con respecto a la proteína BAX normal (Tabla 1, SEC ID N° 1 a 4).

Tabla 1

<i>pos de aminoácido</i>	41	51	61	71
péptido bax normal;	EAPELALDPV	PQDASTKKLS	ECLKRIGDEL	
DS...				
SEC ID N° 1(bax-1G);	RHPSWPWTRC	LRMRPPRS		
SEC ID N° 4(bax+2G);	GRHPSWPWTR	CLRMPPRS		
SEC ID N° 2(bax-2G);	GTRAGPGPGA	SGCVHQEAER	VSQAHRGRTG	Q
SEC ID N° 3(bax+1G);	GGTRAGPGPG	ASGCVHQEAE	RVSQAHRGRT	GQ

La Tabla 2 muestra un grupo de péptidos según la presente invención:

Tabla 2

SEC ID N° 5:	IQDRAGRMGGRHPSWPWTRCLMRPPRS
SEC ID N° 6:	IQDRAGRMGGGRHPSWPWT
SEC ID N° 7:	IQDRAGRMGGGGTRAGPGPGASGCVHQAERVSQAHRGRTGQ
SEC ID N° 8:	IQDRAGRMGGGTRAGPGPG

Los péptidos enumerados en la Tabla 3 se usaron para la generación *in vitro* de linfocitos T que reconocen péptidos BAX mutantes.

Tabla 3

SEC ID N°	1:	RHPSWPWTRCLMRPPRS
SEC ID N°	9:	IQDRAGRMGGRHPSWPWTRCLR
SEC ID N°	6:	IQDRAGRMGGGRHPSWPWT
SEC ID N°	10:	ASGCVHQAERVSQAHRGRTGQ
SEC ID N°	11:	GGTRAGPGPGASGCVHQAERV
SEC ID N°	12:	IQDRAGRMGGGGTRAGPGPGAS
SEC ID N°	8:	IQDRAGRMGGGTRAGPGPG

5 Los péptidos más preferidos según esta realización de la presente invención se enumeran en la Tabla 4:

Tabla 4

SEC ID N°	1:	RHPSWPWTRCLMRPPRS
SEC ID N°	2:	GTRAGPGPGASGCVHQAERVSQAHRGRTGQ
SEC ID N°	3:	GGTRAGPGPGASGCVHQAERVSQAHRGRTGQ
SEC ID N°	4:	GRHPSWPWTRCLMRPPRS
SEC ID N°	5:	IQDRAGRMGGRHPSWPWTRCLMRPPRS
SEC ID N°	6:	IQDRAGRMGGGRHPSWPWT
SEC ID N°	7:	IQDRAGRMGGGGTRAGPGPGASGCVHQAERVSQAHRGRTGQ
SEC ID N°	8:	IQDRAGRMGGGTRAGPGPG
SEC ID N°	9:	IQDRAGRMGGRHPSWPWTRCLR
SEC ID N°	10:	ASGCVHQAERVSQAHRGRTGQ
SEC ID N°	11:	GGTRAGPGPGASGCVHQAERV
SEC ID N°	12:	IQDRAGRMGGGGTRAGPGPGAS

Otro ejemplo, que no es parte de la presente invención, es TGFβRII:

2) TGFβRII

10 Se ha establecido que el gen TGFβRII participa en la regulación del crecimiento celular. TGFβRII es un receptor de TGFβ que regula por disminución el crecimiento celular. El gen humano que codifican TGFβRII contiene una secuencia de repetición de diez bases de desoxiadenosina (A10) de la base n° 709 a la base n° 718 (GAA AAA AAA AAG CCT). En cánceres de colon y cánceres pancreáticos se han observado mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en esta repetición A10, tanto como repeticiones A9 (GAA AAA AAA AGC CT) como A11 (GAA AAA AAA AAA GCC), en aproximadamente el 80 % de los casos examinados (Yamamoto, H., "Somatic frameshift mutations in DNA mismatch and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer", Cancer Research 58, 997-1003, 1 de marzo 15 1998). Los productos génicos de TGFβRII modificados son inestables para unirse a TGFβ y la señal para la regulación

por disminución del crecimiento celular se elimina y así hace posible el progreso adicional del tumor. Además, los productos génicos modificados solo se encuentran en células cancerosas y, por tanto, son dianas para inmunoterapia.

5 Por consiguiente, péptidos correspondientes a los productos de proteínas de TGFβRII modificados que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en el gen TGFβRII pueden usarse como agentes terapéuticos antineoplásicos o vacunas con la función de desencadenar el brazo celular del sistema inmunitario (linfocitos T) contra células cancerosas en pacientes afectados con cánceres asociados a un gen TGFβRII modificado.

Las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en el gen TGFβRII producen secuencias de péptidos mutantes con el primer aminoácido de la secuencia alterado en tanto la posición 133 (delecciones de una y dos bases) como 134 (inserciones de una y dos bases) con respecto a la proteína TGFβRII normal (Tabla 5, SEC ID N° 13 y 21).

10

Tabla 5

<i>pos. de aminoácidos</i>	133
TGFβRII normal;	K PGETFFMCSC SSDECNDNII FSEEYNTSNP DLLL
SEC ID N° 13(-1A);	S LVRLSSCVPV ALMSAMTTSS SQKNITPAIL TCC
SEC ID N° 13(+2A);	SLVRLSSCVP VALMSAMTTS SSQKNITPAI LTCC
TGFβRII + 1A) ;	AW
TGFβRII - 2A) ;	A W

La Tabla 6 muestra grupos de péptidos de la presente invención:

Tabla 6

SEC ID N°	14:	SPKCIMKEKKSLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	15:	PKCIMKEKKKSLVRLSSCV
SEC ID N°	19:	SPKCIMKEKKAW
SEC ID N°	20:	PKCIMKEKKKAW

La Tabla 7 presenta péptidos que se usaron para la generación *in vitro* de linfocitos T que reconocen péptidos TGFβRII mutantes.

15

Tabla 7

SEC ID N°	15:	PKCIMKEKKKSLVRLSSCV
SEC ID N°	16:	ALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	17:	SLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQ
SEC ID N°	18:	SPKCIMKEKKSLVRLSSCVPVA
SEC ID N°	19:	SPKCIMKEKKAW
SEC ID N°	20:	PKCIMKEKKKAW
SEC ID N°	21:	AMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	428:	SLVRLSSCV

Otros péptidos son:

Tabla 8

SEC ID N°	13:	SLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	14:	SPKCIMKEKKSLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	15:	PKCIMKEKKSLVRLSSCV
SEC ID N°	16:	ALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	17:	SLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQ
SEC ID N°	18:	SPKCIMKEKKSLVRLSSCVPVA
SEC ID N°	19:	SPKCIMKEKKAW
SEC ID N°	20:	PKCIMKEKKAW
SEC ID N°	21:	AMTTSSSQKNITPAILTCC
SEC ID N°	428:	SLVRLSSCV

Otros péptidos interesantes pueden ser fragmentos de los péptidos enumerados en las Tablas 1-8 anteriores. Tales fragmentos tiene lo más normalmente de 9-16 aminoácidos de longitud e incluyen al menos un aminoácido de la parte mutante de la proteína.

- 5 Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones, el término fragmento pretende especificar una parte más corta de un péptido más largo o de una proteína.

Otros genes asociados al cáncer que contienen secuencias de repetición de una base de nucleósido y que, por tanto, son susceptibles a mutaciones con desplazamiento del marco de lectura y, por consiguiente, son posibles candidatos para péptidos útiles (las SEC ID N° según la Tabla 9 se facilitan en paréntesis en cada caso) son los siguientes:

- 10 Gen TGF- β -2 humano (hTGF β 2) (SEC ID N° 22-29)
 Gen deletado en cáncer colorrectal (DCC) (SEC ID N° 30-34)
 Gen de susceptibilidad al cáncer de mama y de ovario humano (BRCA1) (SEC ID N° 378-387)
 Gen de susceptibilidad al cáncer de mama humano (BRCA2) (SEC ID N° 35-94)
 Gen de la proteína tirosina fosfatasa humana (hPTP) (SEC ID N° 95-102)
- 15 Gen de ADN topoisomerasa II (top2) (SEC ID N° 103-108)
 Gen de cinasa humana (TTK) (SEC ID N° 109-120)
 Gen represor de la transcripción humana (CTCF) (SEC ID N° 121-127)
 Gen de proteasa similar a ICE/CED-3 homólogo a FADD humano (SEC ID N° 128-133)
- 20 Gen de la proteína de reparación del emparejamiento incorrecto/unión putativa humana (hMSH3) (SEC ID N° 134-147)
 Gen de la proteína 1 de unión a retinoblastoma humano isoforma I (hRBP1) (SEC ID N° 148-156)
 Gen FMR1 humano (hFMR1) (SEC ID N° 157-161)
 Gen TINUR humano (SEC ID N° 162-169)
 Oncogén de b-raf (SEC ID N° 170-175)
- 25 Gen de neurofibromina humana (NF1) (SEC ID N° 176-181)
 Gen n-myc de la línea germinal humana (SEC ID N° 182-188)
 Gen n-myc humano (SEC ID N° 189-194)
 Gen del inhibidor de ras humano (SEC ID N° 195-199)

ES 2 463 825 T3

- Gen hMSH6 humano (SEC ID N° 200-203 y 293-297)
- Gen BNLF-1 del VEB de carcinoma nasofaríngeo humano (SEC ID N° 204-210)
- Gen p300 de la proteína reguladora del ciclo humano celular (proteína de unión a E1A) (SEC ID N° 211-218)
- Gen codificado por la proteína de linfoma de linfocitos B 3 humano (bcl-3) (SEC ID N° 219-226)
- 5 Producto génico inducido por el factor de crecimiento beta-transformante humano (BIGH3) (SEC ID N° 227-232)
- Gen ETV1 del factor de transposición humano (SEC ID N° 233-239)
- Gen de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina humano (IGFBP4) (SEC ID N° 240-246)
- Gen MUC1 humano (SEC ID N° 247-266)
- Gen de la proteína tirosina cinasa humana (JAK1) (SEC ID N° 267-271)
- 10 Gen de la proteína tirosina cinasa humana (JAK3) (SEC ID N° 272-279)
- Gen Flt4 humano (para tirosina cinasa transmembrana) (SEC ID N° 280-284)
- Gen asociado a p53 humano (SEC ID N° 285-292)
- Gen can humano (hCAN) (SEC ID N° 298-300)
- Proto-oncogén DBL humano (hDBL) / gen MCF2PO humano (hMCF2PO) (SEC ID N° 301-306)
- 15 Gen dek humano (hDEK) (SEC ID N° 307-309)
- Gen de la proteína relacionada con el retinoblastoma humano (p107) (SEC ID N° 310-313)
- Gen del receptor acoplado a la proteína G humana (hGPR1) (SEC ID N° 314-319)
- Gen de la proteína de unión a ARN putativa humana (hRBP56) (SEC ID N° 320-325)
- Gen del factor de transcripción humano (hITF-2) (SEC ID N° 326-327)
- 20 Gen supresor de la metástasis de melanoma maligno humano (hKiSS-1) (SEC ID N° 328-334)
- Gen de la proteína asociada a telomerasa humana TP-1 (hTP-1) (SEC ID N° 335-348)
- Gen FDF-5 humano (hFDF-5) (SEC ID N° 349-356)
- Gen asociado a metástasis humana mta1 (mMTA1) (SEC ID N° 357-362)
- Gen de la subunidad de 90 kDa del factor de transcripción humano TFIIB (hTFIIB90) (SEC ID N° 363-369)
- 25 Gen supresor tumoral humano (hLUCA-1) (SEC ID N° 370-377)
- Proteína asociada al tumor de Wilms humano (WIT-1) (SEC ID N° 388-393)
- Gen de la cisteína proteasa humana (ICERel-III) (SEC ID N° 394-398 y 459)
- Gen del ligando de Fas humano (FasL) (SEC ID N° 399-403)
- Gen de la proteína del dominio RING asociado a BRCA1 humano (BARD1) (SEC ID N° 404-417)
- 30 Gen mcf.2 humano (hMCF.2) (SEC ID N° 418-422)
- Gen del antígeno de Fas humano (fas) (SEC ID N° 423-427)
- Gen DPC4 humano (SEC ID N° 429-437).

Los péptidos mutantes que son los resultados de mutación con desplazamiento del marco de lectura en estos genes se enumeran en la Tabla 9.

Tabla 9

SEC ID Nº	22;	TVGRPHISC
SEC ID Nº	23;	KTVGRPHISC
SEC ID Nº	24;	KQWEDPTSPANVIALLOT
SEC ID Nº	25;	QWEDPTSPANVIALLOT
SEC ID Nº	26;	QKTIKSTRKKTVGRPHISC
SEC ID Nº	27;	QKTIKSTRKKKTVGRPHISC
SEC ID Nº	28;	QKTIKSTRKKKQWEDPTSPANVIALLOT
SEC ID Nº	29;	QKTIKSTRKKQWEDPTSPANVIALLOT
SEC ID Nº	30;	AADLQQQFVHFLDCWDVSSIPFTLHLPQAQDITT
SEC ID Nº	31;	GKDAKEKSS
SEC ID Nº	32;	GKDAKEKKSS
SEC ID Nº	33;	GKDAKEKKAADLQQQFVHFLDCWDVSSIPFTLHLPQAQDITT
SEC ID Nº	34;	GKDAKEKAADLQQQFVHFLDCWDVSSIPFTLHLPQAQDITT
SEC ID Nº	35;	FSMKQTLMNVKNLKTK
SEC ID Nº	36;	KFSMKQTLMNVKNLKTK
SEC ID Nº	37;	VRTSKTRKKFSMKQTLMNVKNLKTK
SEC ID Nº	38;	VRTSKTRKKKFSMKQTLMNVKNLKTK
SEC ID Nº	39;	VRTSKTRKKNFP
SEC ID Nº	40;	VRTSKTRKNFP
SEC ID Nº	41;	IKKKLLQFQK
SEC ID Nº	42;	KIKKKLLQFQK
SEC ID Nº	43;	KSRRNYFNFKNNCQSRL
SEC ID Nº	44;	SRRNYFNFKNNCQSRL
SEC ID Nº	45;	TNLRVIQKIKKKLLQFQK
SEC ID Nº	46;	TNLRVIQKIKKKLLQFQK
SEC ID Nº	47;	TNLRVIQKKSRRNYFNFKNNCQSRL
SEC ID Nº	48;	TNLRVIQKSRRNYFNFKNNCQSRL
SEC ID Nº	49;	KIMIT
SEC ID Nº	50;	NIDKIPEKIMIT
SEC ID Nº	51;	NIDKIPEKKIMIT
SEC ID Nº	52;	IINAN
SEC ID Nº	53;	KIINAN
SEC ID Nº	54;	NDKTVSEKIINAN
SEC ID Nº	55;	NDKTVSEKKIINAN

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID Nº	56;	NGLEKEYLMVNQKE
SEC ID Nº	57;	SQTSLLEAKNGLEKEYLMVNQKE
SEC ID Nº	58;	SQTSLLEAKKNGLEKEYLMVNQKE
SEC ID Nº	59;	SQTSLLEAKKMA
SEC ID Nº	60;	SQTSLLEAKMA
SEC ID Nº	61;	TLVFPK
SEC ID Nº	62;	KTLVFPK
SEC ID Nº	63;	LKNVEDQKTLVFPK
SEC ID Nº	64;	LKNVEDQKKTLVFPK
SEC ID Nº	65;	LKNVEDQKKH
SEC ID Nº	66;	LKNVEDQKH
SEC ID Nº	67;	KKIQLY
SEC ID Nº	68;	KKKIQLY
SEC ID Nº	69;	RKRFSYTEYLASIIRFIFSVNRRKEIQNLSSCNFKI
SEC ID Nº	70;	LRIVSYSKKKKIQLY
SEC ID Nº	71;	LRIVSYSKKKKIQLY
SEC ID Nº	72;	LRIVSYSKRRKRFSYTEYLASIIRFIFSVNRRKEIQNLS-- -SCNFKI
SEC ID Nº	73;	LRIVSYSKRRKRFSYTEYLASIIRFIFSVNRRKEIQNLS-- -SCNFKI
SEC ID Nº	74;	QDLPLSSICQTIVTIYWQ
SEC ID Nº	75;	KQDLPLSSICQTIVTIYWQ
SEC ID Nº	76;	NRTCPFRLFVRRMLQFTGNKVLDRP
SEC ID Nº	77;	GFVSVVKKQDLPLSSICQTIVTIYWQ
SEC ID Nº	78;	GFVSVVKKKQDLPLSSICQTIVTIYWQ
SEC ID Nº	79;	GFVSVVKKNRTCPFRLFVRRMLQFTGNKVLDRP
SEC ID Nº	80;	GFVSVVKNRTCPFRLFVRRMLQFTGNKVLDRP
SEC ID Nº	81;	YRKTKNQN
SEC ID Nº	82;	KYRKTKNQN
SEC ID Nº	83;	NTERPKIRTN
SEC ID Nº	84;	DETFYKGKKYRKTKNQN
SEC ID Nº	85;	DETFYKGKKKYRKTKNQN
SEC ID Nº	86;	DETFYKGKNTERPKIRTN
SEC ID Nº	87;	DETFYKGKNTERPKIRTN

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 88; LSINNYRFQMKFYFRFTSHGSPFTSANF
 SEC ID N° 89; KLSINNYRFQMKFYFRFTSHGSPFTSANF
 SEC ID N° 90; NSVSTTTGFR
 SEC ID N° 91; NIQLAATKKLSINNYRFQMKFYFRFTSHGSPFTSANF
 SEC ID N° 92; NIQLAATKKKLSINNYRFQMKFYFRFTSHGSPFTSANF
 SEC ID N° 93; NIQLAATKKNSVSTTTGFR
 SEC ID N° 94; NIQLAATKNSVSTTTGFR
 SEC ID N° 95; MEHVAPGRMSASPQSPTQ
 SEC ID N° 96; KMEHVAPGRMSASPQSPTQ
 SEC ID N° 97; KWSTWLQAECQHLHSPQRS DKPQQAGLDQQHHC FALDS-
 -SPGPRPVFLQLLGLMGQGRHD
 SEC ID N° 98; WSTWLQAECQHLHSPQRS DKPQQAGLDQQHHC FALDS-
 -SPGPRPVFLQLLGLMGQGRHD
 SEC ID N° 99; TFSVWAEKMEHVAPGRMSASPQSPTQ
 SEC ID N° 100; TFSVWAEKKMEHVAPGRMSASPQSPTQ
 SEC ID N° 101; TFSVWAEKKWSTWLQAECQHLHSPQRS DKPQQAGLDQ-
 -QHHC FALDSSPGPRPVFLQLLGLMGQGRHD
 SEC ID N° 102; TFSVWAEKWSTWLQAECQHLHSPQRS DKPQQAGLDQ-
 -QHHC FALDSSPGPRPVFLQLLGLMGQGRHD
 SEC ID N° 103; HKWLKFCLLRLVKESFHE
 SEC ID N° 104; KHKWLKFCLLRLVKESFHE
 SEC ID N° 105; KGGKAKGKKHKWLKFCLLRLVKESFHE
 SEC ID N° 106; KGGKAKGKKKHKWLKFCLLRLVKESFHE
 SEC ID N° 107; KGGKAKGKNTNG
 SEC ID N° 108; KGGKAKGKNTNG
 SEC ID N° 109; VNNFFKKL
 SEC ID N° 110; KVNNFFKKL
 SEC ID N° 111; LSQGNVKKVNNFFKKL
 SEC ID N° 112; LSQGNVKKVNNFFKKL
 SEC ID N° 113; GEKNDLQLFVMSDRRYKIYWTVILLNPCGNLHLKTTSL
 SEC ID N° 114; KGEKNDLQLFVMSDRRYKIYWTVILLNPCGNLHLKTTSL
 SEC ID N° 115; KGKMICSYS
 SEC ID N° 116; GKMICSYS

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 117; SSKTFEKKGEKNDLQLFVMSDRRYKIYWTVILLNPCGN-
-LHLKTTSL

SEC ID N° 118; SSKTFEKKKGEKNDLQLFVMSDRRYKIYWTVILLNPCGN-
-LHLKTTSL

SEC ID N° 119; SSKTFEKKKGKMKICSYS

SEC ID N° 120; SSKTFEKKGKMKICSYS

SEC ID N° 121; QRKPKRANCVIQRRAKM

SEC ID N° 122; KQRKPKRANCVIQRRAKM

SEC ID N° 123; NKENQKEQTALLYRGGQRCRCVCLRF

SEC ID N° 123; NKENQKEQTALLYRGGQRCRCVCLRF

SEC ID N° 124; PDYQPPAKKQRKPKRANCVIQRRAKM

SEC ID N° 125; PDYQPPAKKKQRKPKRANCVIQRRAKM

SEC ID N° 126; PDYQPPAKKNKENQKEQTALLYRGGQRCRCVCLRF

SEC ID N° 127; PDYQPPAKNKENQKEQTALLYRGGQRCRCVCLRF

SEC ID N° 128; NLSSLLI

SEC ID N° 129; TCLPF

SEC ID N° 130; QPTFTLRKNLSSLLI

SEC ID N° 131; QPTFTLRKKNLSSLLI

SEC ID N° 132; QPTFTLRKKTCLPF

SEC ID N° 133; QPTFTLRKTCLPF

SEC ID N° 134; RATFLLSLWECSLPQARLCLIVSRTGLLVQS

SEC ID N° 135; GQHFYW HCGSAACHRRGCV

SEC ID N° 136; KENVRDKKRATFLLSLWECSLPQARLCLIVSRTGLLVQS

SEC ID N° 137; KENVRDKKKRATFLLSLWECSLPQARLCLIVSRTGLLVQS

SEC ID N° 138; KENVRDKKKGQHFYW HCGSAACHRRGCV

SEC ID N° 139; KENVRDKKGQHFYW HCGSAACHRRGCV

SEC ID N° 140; ITHTRWGITTWDSWSVRMKANWIAQQNKSLILSPSFTK

SEC ID N° 141; KITHTRWGITTWDSWSVRMKANWIAQQNKSLILSPSFTK

SEC ID N° 142; KLLTPGGELPHGILGQ

SEC ID N° 143; LLTPGGELPHGILGQ

SEC ID N° 144; PPVCELEKITHTRWGITTWDSWSVRMKANWIAQQNKSLILSPSFTK-
-LILSPSFTK

SEC ID N° 145; PPVCELEKKITHTRWGITTWDSWSVRMKANWIAQQNKSLILSPSFTK-
-LILSPSFTK

SEC ID N° 146; PPVCELEKLLTPGGELPHGILGQ

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID Nº	147;	PPVCELEKLLTPGGELPHGILGQ
SEC ID Nº	148;	SLKDELEKMKI
SEC ID Nº	149;	SLKDELEKMKI
SEC ID Nº	150;	LGQSSPEKKNKN
SEC ID Nº	151;	LGQSSPEKKNKN
SEC ID Nº	152;	RLRRINGRGSQIRSRNAFNRSEE
SEC ID Nº	153;	EPKVKEEKKT
SEC ID Nº	154;	EPKVKEEKKKT
SEC ID Nº	155;	EPKVKEEKRLRRINGRGSQIRSRNAFNRSEE
SEC ID Nº	156;	EPKVKEEKRLRRINGRGSQIRSRNAFNRSEE
SEC ID Nº	157;	TFRYKKGQHPFFST
SEC ID Nº	158;	GPNAPEEKNH
SEC ID Nº	159;	GPNAPEEKKNH
SEC ID Nº	160;	GPNAPEEKKTFRYKKGQHPFFST
SEC ID Nº	161;	GPNAPEEKKTFRYKKGQHPFFST
SEC ID Nº	162;	MQNTCV
SEC ID Nº	163;	KMQNTCV
SEC ID Nº	164;	KCKIRVFSK
SEC ID Nº	165;	CKIRVFSK
SEC ID Nº	166;	FFKRTVQKMQNTCV
SEC ID Nº	167;	FFKRTVQKKMQNTCV
SEC ID Nº	168;	FFKRTVQKKCKIRVFSK
SEC ID Nº	169;	FFKRTVQKCKIRVFSK
SEC ID Nº	170;	LPHYLAH
SEC ID Nº	171;	CLITWLTN
SEC ID Nº	172;	GSTTGLSATPLPHYLAH
SEC ID Nº	173;	GSTTGLSATPPLPHYLAH
SEC ID Nº	174;	GSTTGLSATPPCLITWLTN
SEC ID Nº	175;	GSTTGLSATPCLITWLTN
SEC ID Nº	176;	RFADKPRPN
SEC ID Nº	177;	DLPTSPDQTRSGPVHVSVEP
SEC ID Nº	178;	DSAAGCSGTPRFADKPRPN
SEC ID Nº	179;	DSAAGCSGTPPRFADKPRPN
SEC ID Nº	180;	DSAAGCSGTPDLPTSPDQTRSGPVHVSVEP

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 181; DSAAGCSGTPDLPTSPDQTRSGPVHVSVEP

SEC ID N° 182; AHPETPAQNRLRIPCSRREVRSRACKPPGAQGSDER-
-RGKASPRDCDVRTGRP

SEC ID N° 183; PAHPETPAQNRLRIPCSRREVRSRACKPPGAQGSDER-
-RGKASPRDCDVRTGRP

SEC ID N° 184; RPTRRHPRRIASGSPAVGGR

SEC ID N° 185; VAIRGHPRPPAHPETPAQNRLRIPCSRREVRSRACKP-
-PGAQGSDERRGKASPRDCDVRTGRP

SEC ID N° 186; VAIRGHPRPPP AHPETPAQNRLRIPCSRREVRSRACKP-
-PGAQGSDERRGKASPRDCDVRTGRP

SEC ID N° 187; VAIRGHPRPPRPTRRHPRRIASGSPAVGGR

SEC ID N° 188; VAIRGHPRPPRPTRRHPRRIASGSPAVGGR

SEC ID N° 189; RGRTSGRSLSCRRPRCRPAVASRSTAPSPRAGSR-
-RCCLRTSCGAARPRRTRSACGDWVASPPTRSS-
-SRTACGAASPPARSWSAP

SEC ID N° 190; GGGHLEEV

SEC ID N° 191; YFGGPDSTPRGRTSGRSLSCRRPRCRPAVASR-
-STAPSPRAGSRRCCLRTSCGAARPRRTRSACGD-
-WVASPPTRSSSRTACGAASPPARSWSAP

SEC ID N° 192; YFGGPDSTPPRGRTSGRSLSCRRPRCRPAVASR-
-STAPSPRAGSRRCCLRTSCGAARPRRTRSACGDW-
-VASPPTRSSSRTACGAASPPARSWSAP

SEC ID N° 193; YFGGPDSTPPGGGHLEEV

SEC ID N° 194; YFGGPDSTPPGGGHLEEV

SEC ID N° 195; HRVADP

SEC ID N° 196; LSQSSELDPPSSR

SEC ID N° 197; LSQSSELDPPPSSR

SEC ID N° 198; LSQSSELDPPHRVADP

SEC ID N° 199; LSQSSELDPPHRVADP

SEC ID N° 200; VILLPEDTPPS

SEC ID N° 201; VILLPEDTPPPS

SEC ID N° 202; VILLPEDTPLLRA

SEC ID N° 203; VILLPELDPLLRA

SEC ID N° 204; PSPLP

SEC ID N° 205; PLLFHRPCSPSPALGATVLAVYRYE

SEC ID N° 206; LLFHRPCSPSPALGATVLAVYRYE

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 207; APRPPLGPPSPLP
SEC ID N° 208; APRPPLGPPPSPLP
SEC ID N° 209; APRPPLGPPPLL FHRPCSPSPALGATVLAVYRYE
SEC ID N° 210; APRPPLGPPPLL FHRPCSPSPALGATVLAVYRYE
SEC ID N° 211; TQVLPQGCSLSLLHTTFPHRQVPHILDW
SEC ID N° 212; PTQVLPQGCSLSLLHTTFPHRQVPHILDW
SEC ID N° 213; PLQSF PKDAASAFSTPRFPTDKFPTSWTGSCPGQPHGT-
-RAFCQPGPEFNAFSAC
SEC ID N° 214; LQSF PKDAASAFSTPRFPTDKFPTSWTGSCPGQPHGT-
-RAFCQPGPEFNAFSAC
SEC ID N° 215; PSPRPQSQPPTQVLPQGCSLSLLHTTFPHRQVPHILDW
SEC ID N° 216; PSPRPQSQPPTQVLPQGCSLSLLHTTFPHRQVPHILDW
SEC ID N° 217; PSPRPQSQPPLQSF PKDAASAFSTPRFPTDKFPTS-
-WTGSCPGQPHGTRAFQPGPEFNAFSAC
SEC ID N° 218; PSPRPQSQPPLQSF PKDAASAFSTPRFPTDKFPTS-
-WTGSCPGQPHGTRAFQPGPEFNAFSAC
SEC ID N° 219; TAWPGRRRFTTPEPYCLCTPLGPWAPRFLW
SEC ID N° 220; PTAWPGRRRFTTPEPYCLCTPLGPWAPRFLW
SEC ID N° 221; PRPGPAGGALLPRSLTAFVPHSGHGLPVSSGEPAYTPIPH-
-HDVPHGTPPFC
SEC ID N° 222; RGPAGGALLPRSLTAFVPHSGHGLPVSSGEPAYTPIPH-
-DVPHTGTPPFC
SEC ID N° 223; DLPAVPGPPTAWPGRRRFTTPEPYCLCTPLGPWAPRFLW
SEC ID N° 224; DLPAVPGPPPTAWPGRRRFTTPEPYCLCTPLGPWAPRFLW
SEC ID N° 225; DLPAVPGPPRPGPAGGALLPRSLTAFVPHSGHGLPVSSG-
-EPAYTPIPHDVPHTGTPPFC
SEC ID N° 226; DLPAVPGPPRPGPAGGALLPRSLTAFVPHSGHGLPVSSG-
-EPAYTPIPHDVPHTGTPPFC
SEC ID N° 227; QWGLSWMS
SEC ID N° 228; NGDCHGCPEGRQSL
SEC ID N° 229; FTMDRVLTPQWGLSWMS
SEC ID N° 230; FTMDRVLTPPWGLSWMS
SEC ID N° 231; FTMDRVLTPNGDCHGCPEGRQSL
SEC ID N° 232; FTMDRVLTPNGDCHGCPEGRQSL

ES 2 463 825 T3

(continuación)

- SEC ID N° 233; HHPARQCPHCIMHLQTQLIHRNLTGPSQLTSLHRS-
-PYQIAATPWTTDFAASFFLNPVTPFLLCRRCQGKDV-
-LCTNARCLSQTSPSHHKALSRTTTQCMNT-
-TPWLAVRPAKAFPLL
- SEC ID N° 234; PHHPARQCPHCIMHLQTQLIHRNLTGPSQLTSLHRS-
-PYQIAATPWTTDFAASFFLNPVTPFLLCRRCQK-
-DVLCTNARCLSQTSPSHHKALSRTTTQCMNTTP-
-WLAVRPAKAFPLL
- SEC ID N° 235; HTIQHASVPTASCISKLNSYTEN
- SEC ID N° 236; PQVGMRPSNPPHHPARQCPHCIMHLQTQLIHRNLT-
-GPSQLTSLHRSPYQIAATPWTTDFAASFFLNPVTPFL-
-LCRRÇQKDVLCNTNARCLSQTSPSHHKALSRTTTQC-
-MNTTPWLAVRPAKAFPLL
- SEC ID N° 237; PQVGMRPSNP PPHHPARQCPHCIMHLQTQLIHRNLTGPS-
-QLTSLHRSPYQIAATPWTTDFAASFFLNPVTPFLLCRRC-
-QGKDVLCNTNARCLSQTSPSHHKALSRTTTQCMNTTPWLA-
-VRPAKAFPLL
- SEC ID N° 238; PQVGMRPSNPHTIQHASVPTASCISKLNSYTEN
- SEC ID N° 239; PQVGMRPSNPHTIQHASVPTASCISKLNSYTEN
- SEC ID N° 240; WAARSWCERRAAAVAPLAPWAWGCPAGCTPPVAARAC-
-AATRPEGWRSPCTH
- SEC ID N° 241; PWAARSWCERRAAAVAPLAPWAWGCPAGCTPPVAA-
-RACAATRPEGWRSPCTH
- SEC ID N° 242; RGLRGAGARGGLRLLRHLRPGLGDALRGVHPPLR-
-LGPALLPAPRGGEAPAHTDARARRVHGAGDRGHGPAAL
- SEC ID N° 243; EEKLARCRPPWAARSWCERRAAAVAPLAPWAWGCPAGC-
-TPPVAARACAATRPEGWRSPCTH
- SEC ID N° 244; EEKLARCRPPPWAARSWCERRAAAVAPLAPWAWGCPA-
-GCTPPVAARACAATRPEGWRSPCTH
- SEC ID N° 245; EEKLARCRPPRGLRGAGARGGLRLLRHLRPGLGDA-
-LRGVHPPLRLGPALLPAPRGGEAPAHTDARARRVHGAGG-
-DRGHGPAAL
- SEC ID N° 246; EEKLARCRPRGLRGAGARGGLRLLRHLRPGLGDALRG-
-VHPPLRLGPALLPAPRGGEAPAHTDARARRVHGAGG-
-DRGHGPAAL

ES 2 463 825 T3

(continuación)

- SEC ID N° 247; QPPVSPRRRPGRPRAPPPPQPMVSPRRRTTGPPW-
 -RPPPLQSTMSPPPQALHQAQLLLWCTTAPLPGLPQPQ-
 -PARALHSQFPATTLILLPPLPAIAPRLMPVALTIARYL-
 -LSPPPITALLPSCLLGSLSFSCFLTTFQTSSLIPLW-
 -KIPAPTTTKSCRETFWK
- SEC ID N° 248; SPGCHLPGDQAAPGLHRPPSPWCHLGAGQQARLGVHR-
 -PSSPQCHLGLRLCIRLSFYSGAQRHLCQGYHNPSQQEHS-
 -ILNSQPPL
- SEC ID N° 249; KPAPGSTAPQPPVSPRRRPGRPRAPPPPQPMVSPRR-
 -RTTGPPWRPPPLQSTMSPPPQALHQAQLLLWCTTAP-
 -LPGLPQPQPARALHSQFPATTLILLPPLPAIAPRLMPVA-
 -LTIARYLLSPPPITALLPSCLLGSLSFSCFLTTFQTS-
 -SLIPLWKIPAPTTTKSCRETFWK
- SEC ID N° 250; KPAPGSTAPPQPPVSPRRRPGRPRAPPPPQPMVSPR-
 -RRTTGPPWRPPPLQSTMSPPPQALHQAQLLLWCT-
 -TAPLPGLPQPQPARALHSQFPATTLILLPPLPAIAP-
 -RLMPVALTIARYLLSPPPITALLPSCLLGSLSFSCFLT-
 -TFQTSSLIPLWKIPAPTTTKSCRETFWK
- SEC ID N° 251; KPAPGSTAPPSPGCHLPGDQAAPGLHRPPSPWCHL-
 -GAGQQARLGVHRPSSPQCHLGLRLCIRLSFYSGA-
 -QRHLCQGYHNPSQQEHSILNSQPPL
- SEC ID N° 252; KPAPGSTAPSPGCHLPGDQAAPGLHRPPSPWCHL-
 -GAGQQARLGVHRPSSPQCHLGLRLCIRLSFYSGAQ-
 -RHLCQGYHNPSQQEHSILNSQPPL
- SEC ID N° 253; QPMVSPRRRTTGPPWRPPPLQSTMSPPPQALHQAQL-
 -LLWCTTAPLPGLPQPQPARALHSQFPATTLILLPPLP-
 -AIAPRLMPVALTIARYLLSPPPITALLPSCLLGSL-
 -SFSCFLTTFQTSSLIPLWKIPAPTTTKSCRETFWK
- SEC ID N° 254; SPWCHLGAGQQARLGVHRPSSPQCHLGLRLCIRLSF-
 -YSGAQRHLCQGYHNPSQQEHSILNSQPPL
- SEC ID N° 255; RPPPGSTAPQPMVSPRRR
- SEC ID N° 256; RPPPGSTAPPQPMVSPRRR
- SEC ID N° 257; RPPPGSTAPPSPWCHLGA
- SEC ID N° 258; RPPPGSTAPSPWCHLGA
- SEC ID N° 259; RPRAPPPSPWCHL
- SEC ID N° 260; RPRAPPPSPWC
- SEC ID N° 261; RPRAPPPAHGVTSAP

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 262; RPRAPPPPAHGV
 SEC ID N° 263; APGLHRPPQPMVSP
 SEC ID N° 264; AAPGLHRPQPMVSPR
 SEC ID N° 265; PGLHRPPPAHGV
 SEC ID N° 266; APGLHRPPAHGVTS
 SEC ID N° 267; VDRPQHTEWLSWSNLYRIRHQ
 SEC ID N° 268; HYLCTDVAPR
 SEC ID N° 269; HYLCTDVAPPR
 SEC ID N° 270; HYLCTDVAPPVDRPQHTEWLSWSNLYRIRHQ
 SEC ID N° 271; HYLCTDVAPVDRPQHTEWLSWSNLYRIRHQ
 SEC ID N° 272; SAYLSPLGTTWLRTCACRLPRPAASCLCTTPSLLW-
 -PRRTCPAGSPRATSSPWRMPAPKSCCTTGLAFTS-
 -PIGLGWSATASGYARIWPVLSLTCQSWSTSLPSTAVTW
 SEC ID N° 273; PSAYLSPLGTTWLRTCACRLPRPAASCLCTTPSLLWP-
 -RRTCPAGSPRATSSPWRMPAPKSCCTTGLAFTSP-
 -IGLGWSATASGYARIWPVLSLTCQSWSTSLPSTAVTW
 SEC ID N° 274; PAPIFLLWGPLG
 SEC ID N° 275; APIFLLWGPLG
 SEC ID N° 276; LPARAPGPPSAYLSPLGTTWLRTCACRLPRPAASCL-
 -CTTPSLLWPRRTCPAGSPRATSSPWRMPAPKSCC-
 -TTGLAFTSPIGLGWSATASGYARIWPVLSLT-
 -CQSWSTSLPSTAVTW
 SEC ID N° 277; LPARAPGPPSAYLSPLGTTWLRTCACRLPRPAAS-
 -CLCTTPSLLWPRRTCPAGSPRATSSPWRMPAPKSCC-
 -TTGLAFTSPIGLGWSATASGYARIWPVLSLTC-
 -QSWSTSLPSTAVTW
 SEC ID N° 278; LPARAPGPPAPIFLLWGPLG
 SEC ID N° 279; LPARAPGPPAPIFLLWGPLG
 SEC ID N° 280; DLEHHGGVTRHRHR
 SEC ID N° 282; LVSDYSMTPRP
 SEC ID N° 282; LVSDYSMTPPRP
 SEC ID N° 283; LVSDYSMTPPDLEHHGGVTRHRHR
 SEC ID N° 284; LVSDYSMTDLEHHGGVTRHRHR
 SEC ID N° 285; FHHIATDVGPFVVRIGFLKIKGKIKGKSLRKPW-
 -KTQHKLKRALMFLIVKKL

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID Nº 286; PFHHIATDVGPFVVRIGFLKIKGKIKGKSLRKPNWK-
-TQHKLKRALMFLIVKKL

SEC ID Nº 287; PSITLQQMLAPS

SEC ID Nº 298; SITLQQMLAPS

SEC ID Nº 289; TSCNEMNPPFHIIATDVGPFVVRIGFLKIKGKIKGKSL-
-RKPNWKTQHKLKRALMFLIVKKL

SEC ID Nº 290; TSCNEMNPPPFHIIATDVGPFVVRIGFLKIKGKIKG-
-KSLRKPNWKTQHKLKRALMFLIVKKL

SEC ID Nº 291; TSCNEMNPPSITLQQMLAPS

SEC ID Nº 292; TSCNEMNPPSITLQQMLAPS

SEC ID Nº 293; LEMILFLMTF

SEC ID Nº 294; HPCITKTFLEMILFLMTF

SEC ID Nº 295; HPCITKTFLEMILFLMTF

SEC ID Nº 296; HPCITKTFWR

SEC ID Nº 297; HPCITKTFWR

SEC ID Nº 298; LMFESQMRLNSKNAHLPIISF

SEC ID Nº 299; EYGSIIAFLMFESQMRLNSKNAHLPIISF

SEC ID Nº 300; EYGSIIAFFLMFESQMRLNSKNAHLPIISF

SEC ID Nº 301; HLNKGRRLGDKIRAT

SEC ID Nº 302; FHLNKGRRLGDKIRAT

SEC ID Nº 303; VTSGTPFFHLNKGRRLGDKIRAT

SEC ID Nº 304; VTSGTPFFFHLNKGRRLGDKIRAT

SEC ID Nº 305; VTSGTPFFFI

SEC ID Nº 306; VTSGTPFFI

SEC ID Nº 307; CEIERIHFFF

SEC ID Nº 308; CEIERIHFFSK

SEC ID Nº 309; CEIERIHFSK

SEC ID Nº 310; FRYISKSI

SEC ID Nº 311; RYISKSI

SEC ID Nº 312; FKKYEPIFFRYISKSI

SEC ID Nº 313; FKKYEPIFRYISKSI

SEC ID Nº 314; FPDSDQPGPLYPLDPSCLISSASNPQELSDCHYIH-
-LAFGFSNWRSCPVLPGHCGVQ

ES 2 463 825 T3

(continuación)

- SEC ID N° 315; PDS DQPGPLYPLDP SCLISSASNPQELSDCHYIHL-
-AFGFSNWRSCPVLPGHCGVQ
- SEC ID N° 316; LNM FASVFS
- SEC ID N° 317; LNM FASVFFS
- SEC ID N° 318; LNM FASVFFPDS DQPGPLYPLDP SCLISSASNPQE-
-LSDCHYIHLAFGFSNWRSCPVLPGHCGVQ
- SEC ID N° 319; LNM FASVFFPDS DQPGPLYPLDP SCLISSASNPQELS-
-DCHYIHLAFGFSNWRSCPVLPGHCGVQ
- SEC ID N° 320; AMEETVVVAVATVETEVEAMEETGVVAAMEETE VGAT-
-EETEVEAMEAKWEEETTTEMI SATDHT
- SEC ID N° 321; LWVRPWLWEWLRWRPKWRLWRRQEWRLWRRPRWGL-
-RRRPRWLWRENGRKKRLQK
- SEC ID N° 322; YGGDRSRGĀMEETVVVAVATVETEVEAMEETGVVAAM-
-EETE VGATEETEVEAMEAKWEEETTTEMI SATDHT
- SEC ID N° 323; YGGDRSRGGAMEETVVVAVATVETEVEAMEETGVVA-
-AMEETE VGATEETEVEAMEAKWEEETTTEMI SATDHT
- SEC ID N° 324; YGGDRSRGGLWVRPWLWEWLRWE PKWRLWRRQEW-
-RLWRRPRWGLRRRPRWLWRENGRKKRLQK
- SEC ID N° 325; YGGDRSRGLWVRPWLWEWLRWE PKWRLWRRQEWWR-
-LWRRPRWGLRRRPRWLWRENGRKKRLQK
- SEC ID N° 326; EFGGRRQK
- SEC ID N° 327; EFGGRRQK
- SEC ID N° 328; RRAKGGGAGASNPRQ
- SEC ID N° 329; GRRAKGGGAGASNPRQ
- SEC ID N° 330; DVGLREGALELPTRGNKRVA
- SEC ID N° 331; MRGGGGVGGRRAKGGGAGASNPRQ
- SEC ID N° 332; MRGGGGVGGRRAKGGGAGASNPRQ
- SEC ID N° 333; MRGGGGVGGDVGLREGALELPTRGNKRVA
- SEC ID N° 334; MRGGGGVGGDVGLREGALELPTRGNKRVA
- SEC ID N° 335; VWQLAGPMLAGWRS LGSWFCRMYGI
- SEC ID N° 336; CGSWPALCWRAGGVWAVGSAGCMEYDPEALPAAWGP-
-AAAATVHPRR
- SEC ID N° 337; RRYPCWGVVWQLAGPMLAGWRS LGSWFCRMYGI
- SEC ID N° 338; RRYPCWGGVWQLAGPMLAGWRS LGSWFCRMYGI

ES 2 463 825 T3

(continuación)

- SEC ID N° 339; RRYPCWGGCGSWPALCWRAGGVWAVGSAGCMEYD-
-EALPAAWGPAAAATVHPRR
- SEC ID N° 340; RRYPCWGGCGSWPALCWRAGGVWAVGSAGCMEYDPE-
-ALPAAWGPAAAATVHPRR
- SEC ID N° 341; LWLWAGWTVVWWSGCGPGEKGGWPSLPTMALLLRFSCM-
-RVASY
- SEC ID N° 342; GLWLWAGWTVVWWSGCGPGEKGGWPSLPTMALLL-
-RFSCMRVASY
- SEC ID N° 343; GCGCGPAGQYGGAVGLARRGTAGCLPCPPWLCCCCAF-
-PACGLPGTDGWRGWQSGCVRVSGSAPWAPGFPPFSP-
-PCPLCGTQPRW
- SEC ID N° 344; CGCGPAGQYGGAVGLARRGTAGCLPCPPWLCCCCAF PACG-
-LPGTDGWRGWQSGCVRVSGSAPWAPGFPPFSPPC-
-PLCGTQPRW
- SEC ID N° 345; LAFNVPGGGLWLWAGWTVVWWSGCGPGEKGGWPSLPTMA-
-LLLLLRFSCMRVASY
- SEC ID N° 346; LAFNVPGGGLWLWAGWTVVWWSGCGPGEKGGWPSLPTM-
-ALLLRFSCMRVASY
- SEC ID N° 347; LAFNVPGGGCGCGPAGQYGGAVGLARRGTAGCLPCPP-
-WLCCCCAF PACGLPGTDGWRGWQSGCVRVSGSAPW-
-APGFPPFSPPCPLCGTQPRW
- SEC ID N° 348; LAFNVPGGGCGCGPAGQYGGAVGLARRGTAGCLPCPPW-
-LCCCCAF PACGLPGTDGWRGWQSGCVRVSGSAPWA-
-PGFPPFSPPCPLCGTQPRW
- SEC ID N° 349; PMPMPGQREAPGRQEA
- SEC ID N° 350; GPPMPMPGQREAPGRQEA
- SEC ID N° 351; GHQCQCQGKGRHRADRRPDQAEE
- SEC ID N° 352; HQQCQCQGKGRHRADRRPDQAEE
- SEC ID N° 353; GGHSYGGGPPMPMPGQREAPGRQEA
- SEC ID N° 354; GGHSYGGGPPMPMPGQREAPGRQEA
- SEC ID N° 355; GGHSYGGGHQCQCQGKGRHRADRRPDQAEE
- SEC ID N° 356; GGHSYGGGHQCQCQGKGRHRADRRPDQAEE
- SEC ID N° 357; APCPQSSGGG
- SEC ID N° 358; LPAPSQAAADELDRRPG
- SEC ID N° 359; TKVRLIRGAPCPQSSGGG
- SEC ID N° 360; TKVRLIRGGAPCPQSSGGG

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 361; TKVRLIRGGLPAPSQAAADELDRRPG
SEC ID N° 362; TKVRLIRGLPAPSQAAADELDRRPG
SEC ID N° 363; CSLAKDGSTEDTVSSLCGEEDTEDEELEEAAASHLNK-
-DLYRELLGG
SEC ID N° 364; GCSLAKDGSTEDTVSSLCGEEDTEDEELEEAAASHLNK-
-DLYRELLGG
SEC ID N° 365; AAWQKMAPRTPRPACVARR
SEC ID N° 366; ENSRPKRGGCSLAKDGSTEDTVSSLCGEEDTEDEELEE-
-AAASHLNKDLYRELLGG
SEC ID N° 367; ENSRPKRGGGCSLAKDGSTEDTVSSLCGEEDTEDE-
-ELEEAAASHLNKDLYRELLGG
SEC ID N° 368; ENSRPKRGGAAAWQKMAPRTPRPACVARR
SEC ID N° 369; ENSRPKRGGAAAWQKMAPRTPRPACVARR
SEC ID N° 370; HCVLAASGAS
SEC ID N° 371; GHCVLAASGAS
SEC ID N° 372; GTASSRPLGLPKPHLHRPVPIRHPSCP
SEC ID N° 373; TASSRPLGLPKPHLHRPVPIRHPSCP
SEC ID N° 374; AGTLQLGGHCVLAASGAS
SEC ID N° 375; AGTLQLGGGHCVLAASGAS
SEC ID N° 376; AGTLQLGGGTASSRPLGLPKPHLHRPVPIRHPSCP
SEC ID N° 377; AGTLQLGGTASSRPLGLPKPHLHRPVPIRHPSCP
SEC ID N° 378; R RTPSTEKR
SEC ID N° 379; R RTPSTEKKR
SEC ID N° 380; R RTPSTEKKRSEC
SEC ID N° 381; R RTPSTEKKRSEC
SEC ID N° 382; STTKCQSGTAETYNSWKVKNLQLEPRRVTSQMNROVK-
-DMTAILSQS
SEC ID N° 384; SSEEIKKKSTTKCQSGTAETYNSWKVKNLQLEPRRV-
-TSQMNROVKDMTAILSQS
SEC ID N° 385; SSEEIKKKSTTKCQSGTAETYNSWKVKNLQLEPRR-
-VTSQMNROVKDMTAILSQS
SEC ID N° 386; SSEEIKKKVQPNASQAQKPTTHGR
SEC ID N° 387; SSEEIKKKVQPNASQAQKPTTHGR
SEC ID N° 388; NRGWVGAGE
SEC ID N° 389; IEAG

ES 2 463 825 T3

(continuación)

SEC ID N° 390; VHNYCNMKNRGWVGAGE
SEC ID N° 391; VHNYCNMKKNRGWVGAGE
SEC ID N° 392; VHNYCNMKKIEAG
SEC ID N° 393; VHNYCNMKIEAG
SEC ID N° 394; QLRCWNTWAKMFFMVFLIIWQNTMF
SEC ID N° 395; VKKDNHKKQLRCWNTWAKMFFMVFLIIWQNTMF
SEC ID N° 396; VKKDNHKKKQLRCWNTWAKMFFMVFLIIWQNTMF
SEC ID N° 397; VKKDNHKKKNS
SEC ID N° 398; VKKDNHKKNS
SEC ID N° 399; GAEESGPFNRQVQLKVHASGMGRHLWNCPAFWSEV
SEC ID N° 400; HPSPPPEKRS
SEC ID N° 401; HPSPPPEKKRS
SEC ID N° 402; HPSPPPEKKGAEESGPFNRQVQLKVHASGMGRHLW-
-NCPAFWSEV
SEC ID N° 403; HPSPPPEKGAEESGPFNRQVQLKVHASGMGRHLWN-
-CPAFWSEV
SEC ID N° 404; MQVLSKTHMNLFPQVLLQMFLRGLKRLLDLEKSKKRKL
SEC ID N° 405; RCKSARLI
SEC ID N° 406; VQTQPAIKKMQVLSKTHMNLFPQVLLQMFLRGLKRLD-
-DLEKSKKRKL
SEC ID N° 407; VQTQPAIKKMQVLSKTHMNLFPQVLLQMFLRGLKRL-
-LDLEKSKKRKL
SEC ID N° 408; VQTQPAIKKRCKSARLI
SEC ID N° 409; VQTQPAIKRCKSARLI
SEC ID N° 410; ARSGKKQKRKL
SEC ID N° 411; ARSGKKQKRKL
SEC ID N° 412; ARSGKKQKKNFS
SEC ID N° 413; ARSGKKQKKNFS
SEC ID N° 414; KASARSGKSKKRKL
SEC ID N° 415; KASARSGKSKKRKL
SEC ID N° 416; KASARSGKAKKENSF
SEC ID N° 417; KASARSGKAKKENSF
SEC ID N° 418; HLNKGRRLGDKIRAT
SEC ID N° 419; VTSGTPFFHLNKGRRLGDKIRAT
SEC ID N° 420; VTSGTPFFHLNKGRRLGDKIRAT

(continuación)

SEC ID N°	421;	VTSGTPFFFI
SEC ID N°	422;	VTSGTPFFI
SEC ID N°	423;	VTLLYVNTVTLAPNVNMESSRNAHSPATPSAKRK- -DPDLTWGGFVFFFCQFH
SEC ID N°	424;	KCRCKPNFFVTLTYVNTVTLAPNVNMESSRNAHSP- -ATPSAKRKDPDLTWGGFVFFFCQFH
SEC ID N°	425;	KCRCKPNFFVTLTYVNTVTLAPNVNMESSRNAH- -SPATPSAKRKDPDLTWGGFVFFFCQFH
SEC ID N°	426;	KCRCKPNFFL
SEC ID N°	427;	KCRCKPNFL
SEC ID N°	429;	LVKKLKEKKMNWIL
SEC ID N°	430;	LVKKLKEKKMNWIL
SEC ID N°	431;	LVKKLKEKKR
SEC ID N°	432;	LVKKLKEKR
SEC ID N°	433;	AAIVKDCCR
SEC ID N°	434;	SQPASILGRKL
SEC ID N°	435;	SQPASILGKRKL
SEC ID N°	436;	SQPASILGAAIVKDCCR
SEC ID N°	437;	SQPASILGAAIVKDCCR
SEC ID N°	459;	NTWAKMFFMVFLIHWQNTMF

5 Ejemplos de cánceres particularmente adecuados para el tratamiento con uno o una combinación de varios de estos compuestos son: cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de hígado (primario y secundario), cáncer renal, melanoma, cáncer de ovario, cáncer del cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de próstata y leucemias y linfomas.

A continuación se enumeran algunos ejemplos de dónde estas mutaciones pueden producir productos génicos que producen el desarrollo de tumores:

10 Se cree que el desarrollo de cánceres colorrectales resulta de una serie de alteraciones genéticas. El gen deletado en cáncer colorrectal (SEC ID N° 30-34), gen de la cisteína proteasa humana (ICERel-III) (SEC ID N° 394-398 y 459), gen de la proteína de reparación del emparejamiento incorrecto/unión putativa humana (hMSH3) (SEC ID N° 134-147), gen hMSH6 humano (SEC ID N° 201-204 y 295-299), gen n-myc humano (SEC ID N° 190-195), gen TGFβ2 humano (hTGFβ2) (SEC ID N° 22-29), gen asociado a p53 humano (SEC ID N° 287-294) pueden mejorarse en cáncer colorrectal.

15 El gen de susceptibilidad al cáncer de mama humano (BRCA2) (SEC ID N° 35-94) y de la proteína del dominio RING asociado a BRCA1 humano (BARD1) (SEC ID N° 404-413) participan en cáncer de mama y cáncer de ovario. El gen hMSH6 (SEC ID N° 201-204 y 295-299) pueden mejorarse en tumores cerebrales.

La alteración de genes es frecuente en muchos tipos de adenocarcinomas, debajo se enumeran algunos genes que están mutados en muchos cánceres:

20 Gen de susceptibilidad al cáncer de mama humano (BRCA2) (SEC ID N° 35-94), gen deletado en cáncer colorrectal (DCC) (SEC ID N° 30-34), gen de la proteína de reparación del emparejamiento incorrecto/unión putativa humana (hMSH3) (SEC ID N° 134-147), gen hMSH6 humano (SEC ID N° 201-204 y 295-299), gen N-MYC humano (SEC ID N° 190-195), gen TGFβ2 humano (hTGFβ2) (SEC ID N° 22-29), gen asociado a p53 humano (SEC ID N° 287-294), gen

MUC1 humano (SEC ID N° 248-267), gen n-myc de la línea germinal humana (SEC ID N° 184-195), proteína asociada al tumor de Wilms humano (WIT-1) (SEC ID N° 388-393), gen BNLF-1 del VEB de carcinoma nasofaríngeo humano (SEC ID N° 205-211), producto génico inducido por el factor de crecimiento beta-transformante humano (BIGH3) (SEC ID N° 228-233).

- 5 Muchos de los genes mutados pueden producir el desarrollo de leucemias y linfomas: gen de neurofibromina humana (NF1) (SEC ID N° 178-183), oncogén b-raf (SEC ID N° 172-177), gen de la proteína tirosina cinasa humana (JAK1) (SEC ID N° 268-272), gen de la proteína tirosina cinasa humana (JAK3) (SEC ID N° 273-280) son ejemplos.

Genes que participan en melanoma maligno: gen supresor de la metástasis de melanoma maligno humano (hKiSS-1) (SEC ID N° 331-337), genes que participan en metástasis: gen asociado a metástasis humana mta1 (mMTA1) (SEC ID N° 360-365).

El control del ciclo celular y la transducción de señales están estrictamente regulados. Las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en estos genes pueden producir crecimiento celular incontrolado. Ejemplos de genes que pueden ser susceptibles son: gen de la proteína humana tirosina fosfatasa (hPTP) (SEC ID N° 95-102), gen de cinasa humana (TTK) (SEC ID N° 109-121), gen del represor transcripcional humano (CTCF) (SEC ID N° 122-128), gen p300 de la proteína reguladora del ciclo humano celular (proteína de unión a E1A) (SEC ID N° 212-219), producto génico inducido por el factor de crecimiento beta-transformante humano (BIGH3) (SEC ID N° 228-233), gen Flt4 humano (para tirosina cinasa transmembrana (SEC ID N° 281-286), gen del receptor acoplado a la proteína G humana (hGPR1) (SEC ID N° 317-322), gen del factor de transcripción humano (hITF-2) (SEC ID N° 329-330), gen de la proteína asociada a telomerasa humana TP-1 (hTP-1) (SEC ID N° 338-351), gen de la subunidad de 90 kDa del factor de transcripción humano (hTFIIIB90) (SEC ID N° 366-373), gen de proteasa similar a ICE/CED-3 homólogo a FADD humano (SEC ID N° 129-133)

Las mutaciones en las enzimas de síntesis o reparación de ADN pueden también conducir a crecimiento celular incontrolado. Gen de ADN topoisomerasa II (top2) (SEC ID N° 103-108) y el gen de la proteína de reparación del emparejamiento incorrecto/unión putativa humana (hMSH3) (SEC ID N° 134-147) y el gen (hMSH6) (SEC ID N° 201-204 y 205-299).

Lo siguiente son genes supresores de tumores, gen de la proteína 1 de unión a retinoblastoma humano isoforma I (hRBP1) (SEC ID N° 148-158), gen de neurofibromina humana (NF1) (SEC ID N° 178-183), gen asociado a p53 humano (SEC ID N° 287-294), gen de la proteína relacionada con el retinoblastoma humano (p107) (SEC ID N° 312-316), gen supresor tumoral humano (hLUCA-1) (SEC ID N° 374-381), mutaciones en estos genes pueden producir el desarrollo de cáncer.

Lo siguiente son oncogenes, proto-oncogenes u oncogenes putativos; gen n-myc de la línea germinal humana (SEC ID N° 184-189), gen n-myc humano (SEC ID N° 190-195), gen can humano (hCAN) (SEC ID N° 300-302), gen dek humano (hDEK) (SEC ID N° 309-311), oncogén de b-raf (SEC ID N° 172-177), proto-oncogén DBL humano (hDBL) / gen MCF2PO humano (hMCF2PO) (SEC ID N° 303-308). Mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en estos genes pueden conducir al desarrollo de cáncer.

EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS

Descripción de las figuras

FIG. 1:

Se ha demostrado que los linfocitos T de donantes normales pueden estimularse con una mezcla de péptidos que contiene tanto péptidos de BAX mutantes como de TGFβRII mutantes. La proliferación de linfocitos T dependiente de la mezcla de péptidos en muestras de sangre de seis donantes diferentes se muestra en la Figura 1. Los resultados se obtuvieron estimulando células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de cada donante con una mezcla de péptidos de BAX mutantes (SEC ID N° 1, 9-12) y péptidos de TGFβRII mutantes (SEC ID N° 15-21). La concentración de cada péptido individual en la mezcla fue 20 μM. Después de dos semanas, y semanalmente más adelante, los cultivos en masa se reestimularon con CMSP autólogas pulsadas con 10-25 μM de la mezcla de péptidos. Después de 4-5 reestimulaciones los cultivos en masa se probaron en un ensayo estándar de proliferación con CMSP solas o como control o CMSP pulsadas con 25 μM de los péptidos como células presentadoras de antígeno (CPA).

FIG. 2:

Se ha encontrado adicionalmente que clones de linfocitos T pueden generarse contra péptidos separados de la mezcla usada en los experimentos de estimulación en masa. La Figura 2 muestra la proliferación del clon de linfocitos T 521-2 que se obtuvo clonando el cultivo en masa del donante 1 (Figura 1) sembrando 5 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U y usando CMSP autólogas pulsadas con 25 μM

del péptido BAX mutante con SEC ID N° 12 como células nodrizas. Se usaron células linfoblastoides B autólogas como CPA en el ensayo de proliferación.

FIG. 3:

5 En la Figura tres se muestra que péptidos de BAX mutantes y péptidos de TGFβRII mutantes pueden usarse para estimular linfocitos T (CMSP) de un paciente con cáncer de mama. Células dendríticas (CD) de la misma paciente con cáncer se usaron como CPA. La estimulación de linfocitos T (Figura 3) se obtuvo pulsando CD por separado con una mezcla de péptidos de BAX mutantes (SEC ID N° 1, 9-12) y una mezcla de péptidos de TGFβRII mutantes (SEC ID N° 15-21), seguido de la adición de CMSP autólogas y 10 ng/ml de factor de necrosis tumoral. La concentración de cada péptido en las mezclas usadas para pulsar fue 25 μM. Las CMSP y las CD se obtuvieron por leucofóresis de un paciente con cáncer de mama que había estado con tratamiento con un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Las células CD34+ se aislaron del producto de células antes de que las CD se derivaran usando procedimientos convencionales.

FIG. 4:

15 La Figura 4 muestra la capacidad de linfocitos T obtenidos de líquido ascítico de un paciente con cáncer pancreático para reconocer y proliferar a diferentes péptidos sintéticos derivados de BAX mutante (SEC ID N° 1, 9-12) y TGFβRII mutante (SEC ID N° 15, 17-21). La línea de linfocitos T se obtuvo después de la expansión de linfocitos T presentes en el líquido ascítico de un paciente con adenocarcinoma pancreático. La línea de linfocitos T se expandió *in vitro* cultivando con 100 U/ml de interleucina-2 recombinante (rIL-2) (Amersham, Aylesbury, RU) durante una semana antes de probarse en un ensayo de proliferación.

20 CMSP irradiadas (30 Gy) autólogas se sembraron 5×10^4 en placas de 96 pocillos con fondo en u (Costar, Cambridge, MA) y se pulsaron con péptidos sintéticos individuales a 20 μM durante 2 h. Los linfocitos T se añadieron 5×10^4 por pocillo y las placas se incubaron durante cuatro días a 37 °C con adición de $18,5 \times 10^4$ Bq/ml de ³H-timidina durante las 12 últimas horas antes de la recogida. Las placas se contaron en un contador de centelleo líquido (Packard Topcount). Los datos representan proliferación específica para los péptidos sintéticos diferentes y los valores se expresan como la media de cultivos por triplicado. Estos resultados muestran que los linfocitos T aislados de un paciente con cáncer pancreático pueden responder a un panel de péptidos que lleva secuencias de aminoácidos derivadas de BAX y TGFβRII mutantes.

FIG. 5:

30 La Figura 5 demuestra adicionalmente la capacidad de linfocitos T de otro paciente con cáncer pancreático para reconocer y proliferar a diferentes péptidos sintéticos derivados de BAX mutante y TGFβRII mutante. La línea de linfocitos T se obtuvo después de la expansión de linfocitos T presentes en el líquido ascítico de un paciente con adenocarcinoma pancreático. El experimento se configuró de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Los datos representan la proliferación específica para los diferentes péptidos sintéticos y los valores se expresan como la media de cultivos por triplicado.

35 Con el fin de investigar la respuesta de linfocitos T del último paciente con cáncer pancreático se clonaron linfocitos T respondedores. Se irradiaron macrófagos peritoneales (30 Gy) y se sembraron 1×10^4 en placas de 96 pocillos con fondo en U (Costar) junto con 25 μM de cada péptido. Se contaron los blastos de linfocitos T en un microscopio y se añadieron 5 blastos por pocillo junto con 100 U/ml de interleucina-2 recombinante humana (rIL-2) (Amersham, Aylesbury, RU) en un volumen total de 200 ml. Después de 14 días los clones de linfocitos T se transfirieron sobre placas de 24 pocillos (Costar) con 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Wellcome, Dartford, RU), 100 U/ml de rIL-2 y CMSP irradiadas alógenas como células nodrizas y se cribaron para la especificidad de péptidos después de 7 y 14 días.

FIG. 6:

45 Se seleccionaron clones de linfocitos T 520.5, 520.7 y 520.8 para la caracterización adicional y expresan el fenotipo de la superficie celular CD3+, CD8+ y TcR+. La Figura 6 muestra el reconocimiento y citotoxicidad de los clones de linfocitos T 520.5, 520.7 y 520.8 contra células diana autólogas pulsadas con péptidos con el péptido de SEC ID N° 10. Se marcaron linfocitos B transformados con virus de Epstein-Barr (VEB) autólogos con ³H-timidina ($9,25 \times 10^4$ Bq/ml) durante la noche, se lavaron una vez y se sembraron 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos con o sin 25 mM de péptido sintético (SEC ID N° 10) y 1 % de DMSO en medio. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C las placas se lavaron antes de la adición de linfocitos T. Las placas se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 4 horas y luego se recogieron antes de contar en un contador de centelleo líquido (Packard Topcount). Los datos representan el porcentaje de lisis específica de células diana pulsadas con péptido marcado con ³H-timidina a una relación de efector/diana de 10/1. Los valores se expresan como la media de cultivos por triplicado. Estos resultados demuestran que los tres clones de linfocitos T diferentes obtenidos de líquido ascítico de un paciente con carcinoma pancreático presentan citotoxicidad específica de dianas de VEB

autólogas pulsadas con el péptido relevante (SEC ID N° 10) derivado de BAX mutante.

FIG. 7:

La Figura 7 muestra las propiedades citolíticas de tres clones de linfocitos T diferentes obtenidos del mismo paciente. Estos clones de linfocitos T se cultivaron y expandieron como se ha descrito anteriormente, pero se generaron contra un péptido sintético, el péptido de SEC ID N° 17 que lleva las secuencias de aminoácidos derivadas de TGFβRII mutante. Los clones de linfocitos T 538.1, 538.3 y 538.4 muestran todos el fenotipo específico para la superficie celular CD3+, CD8+ y TcR+. Las condiciones experimentales fueron como se han descrito anteriormente (Figura 6). Los datos representan el porcentaje de lisis específica de células diana pulsadas con péptidos marcados con ³H-timidina con el péptido de SEC ID N° 428 a una relación de efector/diana de 10/1. Los valores se expresan como la media de los cultivos por triplicado. Estos resultados demuestran que los tres clones de linfocitos T diferentes obtenidos de líquido ascítico de un paciente con carcinoma pancreático presentan citotoxicidad específica de dianas del VEB autólogo pulsadas con el péptido relevante (SEC ID N° 428) derivado de TGFβRII mutante.

FIG. 8:

La Figura 8 muestra la especificidad de dos clones de linfocitos T CD4+, IMT8 e IMT9, obtenidos de una biopsia de tumor tomada de un paciente con un adenocarcinoma localizado en el colon proximal. La inmunohistoquímica reveló que el paciente tenía un abundante infiltrado de linfocitos T, predominantemente CD4+, muchos de los cuales llevaban marcadores de activación. En áreas de islotes de infiltración de linfocitos T CD4 de HLA se observaron células tumorales positivas para DR. Los clones de linfocitos T se obtuvieron del componente de linfocitos infiltrantes de tumor que crecieron de la biopsia tras el cultivo en medio que contenía 15 U/ml de IL-2 humana recombinante durante 16 días. Los linfocitos T de este cultivo se clonaron por dilución limitante (1 célula/pocillo) en placas de Terasaki con CPA pulsadas con péptidos irradiados y 100 U/ml de IL-2. La pulsación de CPA autólogas se realizó con una mezcla de los péptidos con desplazamiento del marco de lectura de TGFβRII con identidad de secuencias n° 15, 17 y 18 a 1 µg/ml de cada péptido en presencia de 3 µg/ml de microglobulina β2 humana purificada y 10 ng/ml de TNFα humano recombinante durante 3 h a 37 °C De los 14 clones que pudieron expandirse las pruebas preliminares mostraron que dos de los clones fueron reactivos con la mezcla de péptidos usados para la clonación. Después de la expansión los clones se cribaron para reactividad con los péptidos individuales en un ensayo proliferativo convencional. Los resultados muestran que IMT8 y IMT9 reaccionan ambos específicamente con el péptido con desplazamiento del marco de lectura de TGFβRII con SEC ID N° 17, no se observó reactividad con los dos otros péptidos con desplazamiento del marco de lectura probados.

La figura (Fig. 8) representa los resultados de ensayos proliferativos de linfocitos T convencionales, en los que linfocitos T clonados (5×10^4) y CPA irradiadas (5×10^4) se co-cultivaron durante 3 días por triplicado antes de la recogida. Para medir la capacidad proliferativa de los cultivos, ³H-timidina ($3,7 \times 10^4$ Bq/pocillo) se añadió al cultivo durante la noche antes de la recogida. Los valores se facilitan como cuentas medias por minuto (cpm) de los triplicados.

FIG. 9:

La Figura 9 demuestra que la reactividad específica de los dos clones de linfocitos T IMT8 y IMT9 contra el péptido con SEC ID N° 17 se bloqueó completamente por tratamiento de las células con un anticuerpo que se une específicamente a moléculas de HLA-DR, ya que la reactividad después del bloqueo es la misma que la reactividad del ruido de fondo de los clones con CPA en ausencia del péptido. Por otra parte, los anticuerpos para los isotipos HLA-DQ y -DP de la clase II de HLA dejaron de bloquear la reactividad de los clones con CPA pulsadas con péptidos. Este experimento identifica inequívocamente HLA-DR como la molécula responsable de presentar el péptido a estos dos clones de linfocitos T. Los experimentos de bloqueo de anticuerpos se realizaron usando la línea celular transformada con VEB homocigótica 9061 (nomenclatura IHWS9) como CPA. Las CPA se pulsaron con péptido a una concentración de 15 µg/ml durante 1 h a 37 °C antes de la adición de anticuerpos bloqueantes L243 (anticuerpo pan-DR), SPVL3 (anticuerpo pan-DQ) y B7.21 (anticuerpo pan-DP) a 10 µg/ml. Las CPA sin pulsar y CPA pulsadas con péptido en ausencia de anticuerpo bloqueante sirvieron de controles negativos y positivos, respectivamente. Los resultados se expresan como en la Figura 8.

FIG. 10:

El paciente IMT se tipó para HLA y resultó ser HLA: A1.2; B7.8; DR3.14; DQ1.2. Para determinar cuál de las moléculas de HLA-DR fue responsable de la presentación del péptido con SEC ID N° 17, se obtuvieron líneas celulares BCL homocigóticas derivadas de un panel del grupo de trabajo de HLA y se pulsaron con el péptido con SEC ID N° 17. La Figura 10 describe la identificación de HLA-DR14 (DRA*0102, DRB*1401) como la molécula de HLA-DR responsable de la presentación del péptido con SEC ID N° 17 a los clones de linfocitos T IMT8 y IMT9.

Se observó una respuesta proliferativa específica cuando el péptido fue presentado por la línea celular transformada con VEB autóloga (auto-CPA) y por líneas celulares 9054 (EK) y 9061 (31227ABO), ambas de las cuales expresaron DR14 como la única molécula de DR sobre su superficie. La línea celular homocigótica dio mayores respuestas, reflejando un mayor nivel de expresión de los complejos de clase II/péptido relevantes debido al efecto de una doble dosis de los genes que codificaban esta molécula de DR. No se obtuvo respuesta cuando el péptido fue presentado por líneas celulares que expresan HLA-DR3 (9018, LOO81785) que representan la otra molécula de DR expresada por las CPA de pacientes, ni por moléculas de HLA-DR irrelevantes. El experimento se realizó como se describe en la Figura 9, con la excepción de que no se realizó bloqueo de anticuerpos. Los resultados se expresan como en la Figura 8.

FIG. 11:

La Figura 11 describe las curvas de respuesta a dosis obtenidas pulsando la línea celular 9054 con concentraciones crecientes del péptido con SEC ID N° 17. Tanto IMT 8 como IMT9 demuestran un aumento dependiente de la dosis en la respuesta proliferativa al péptido. Se representaron los resultados como se describe en la Fig. 9 y 10 con las concentraciones de péptido indicadas en la figura (Fig. 11). Los resultados se expresan como en la Fig. 8.

FIG. 12:

La Figura 12 describe la reactividad de una línea celular generada por estimulación *in vitro* de linfocitos T aislados de sangre periférica de un donante de sangre sano (donante 2892) por estimulación semanal con células dendríticas autólogas irradiadas pulsadas con los péptidos con identidad de secuencia números 16, 17 y 21. Se obtuvo una respuesta específica por encima de los valores del ruido de fondo cuando los linfocitos T se co-cubaron con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido con SEC ID N° 21. No pudo detectarse actividad en el cultivo después de la primera y segunda estimulación *in vitro*. Estos datos demuestran que el repertorio de linfocitos T de individuos normales contiene algunas células precursoras que tienen la capacidad para reconocer este péptido con desplazamiento del marco de lectura derivado de una mutación en TGFβRII que no se produce en personas normales. En otros dos donantes de sangre (n° 2706 y n° 2896), el nivel de células precursoras con la especificidad relevante fue demasiado baja como para ser detectada. Los resultados se expresan como manchas por 10^4 linfocitos T probados en un ensayo de ELISPOT de IFNγ convencional. Este ensayo enumera el número de células presentes en una mezcla de células que puede reaccionar específicamente con un antígeno definido. Brevemente, 10^7 linfocitos T (células no adherentes) se estimularon semanalmente con 2.5×10^6 células dendríticas (CD) autólogas pulsadas con péptido irradiadas como CPA. Las CD se generaron a partir de la población de células adherentes por cultivo durante una semana en GM-CSF humano recombinante y la IL-4 según protocolos convencionales como se describen en la bibliografía. Después de pulsar con péptido durante la noche a $15 \mu\text{g/ml}$ de péptido, la maduración completa de las CD se obtuvo por cultivo con TNFα recombinante. Se realizó ELISPOT según protocolos publicados convencionales usando 10^4 linfocitos T cultivados por pocillo por duplicado y 10^4 CD pulsadas con péptido o sin pulsar como CPA. Los resultados se expresan como números medios de manchas por 10^4 linfocitos T.

FIG. 13:

La Figura 13 muestra los resultados de la estimulación *in vitro* de linfocitos T de un donante de sangre sano (donante 322) con péptidos con identidad de secuencia número 15-21. El cultivo *in vitro* se realizó como se describe en la Figura 12. Se observó una respuesta proliferativa por encima del ruido de fondo cuando el cultivo de linfocitos T sensibilizado con una mezcla de los péptidos con SEC ID N° 16 y 21 se estimuló con el péptido 21 y el cultivo sensibilizado con el péptido con SEC ID N° 17 se estimuló con el mismo péptido. Estos resultados demuestran que donantes de sangre normales tienen pequeños números de linfocitos T circulantes específicos para estos péptidos del desplazamiento del marco de lectura, y que es posible expandir estas células en cultivo por estimulación con péptidos de desplazamiento del marco de lectura. Estos resultados también confirmaron los resultados mostrados en las Fig. 8-11, demostrando que el péptido con SEC ID N° 17 es inmunogénico en seres humanos, e indican que el péptido con SEC ID N° 21 también puede usarse como vacuna contra el cáncer en seres humanos. Los resultados se expresan como se describe en la Fig. 8.

FIG. 14:

Los resultados mostrados en la Figura 14 demuestran que linfocitos T CD8+ específicos para epítopes de la clase I de HLA pueden generarse a partir de linfocitos T presentes en el repertorio de linfocitos T de un donante de sangre sano (donante 905). No se observó reactividad por encima del ruido de fondo con ninguno de los péptidos después de la segunda ronda de reestimulación *in vitro*. Después de la cuarta reestimulación, la frecuencia de linfocitos T específicos para el péptido con SEC ID N° 428 había disminuido desde niveles indetectables a aproximadamente el 2,5 % de las células. Estos resultados demuestran que precursores de LCT del fenotipo CD8+ están presentes en el repertorio de linfocitos T sin sensibilizar de donantes de sangre sanos. Tales

- linfocitos T pueden expandirse *in vitro* por estimulación específica con el péptido con SEC ID N° 428. Esto forma la base para usar este péptido como vacuna contra el cáncer para provocar linfocitos T citotóxicos específicos para péptidos con desplazamiento del marco de lectura en un paciente con cáncer que tiene tales mutaciones. Los linfocitos T se generaron por reestimulación semanal de linfocitos T aislados de sangre periférica y se estimularon con CD autólogas pulsadas como se describe en la Fig. 12, con la excepción de que IL-7 e IL-2 se añadieron durante el cultivo según procedimientos convencionales para generar linfocitos T citotóxicos (LCT) del fenotipo CD8. Los péptidos usados fueron péptidos con identidad de secuencia número 428, 439, 446 y 451. Las células se probaron en ensayo ELISPOT como se describe en la Fig. 12. Los resultados se expresan como se describe en la Figura 12.
- 5
- 10 Se seleccionó el péptido con SEC ID N° 17 y se designó que contenía motivos de unión para ambas de varias moléculas de la clase I de HLA y la clase II de HLA. Así, estos péptidos contienen epitopes tanto para linfocitos T CD4+ como CD8+, y se predijo que provocaban tanto respuestas de linfocitos T CD4 como CD8 en un paciente con cáncer dado que el procesamiento de la proteína TGFβRII anómala que se produjo naturalmente en células cancerosas tendría lugar y produciría un péptido solapante. Esto se ha demostrado ahora para linfocitos T CD4 por los resultados en las Fig. 8-11. Estos resultados tienen la siguiente implicación:
- 15
- 1) Los resultados en la Figura 8 demuestran que la forma mutada del receptor TGFβRII que se produce en una alta proporción de pacientes con cáncer con defectos en su maquinaria de reparación de alineamientos incorrectos es un antígeno específico para tumor.
 - 2) La especificidad por antígenos de los linfocitos T infiltrantes comúnmente observada en cáncer colorrectal es generalmente desconocida. Los resultados en la Figura 8 demuestran que un componente de los linfocitos T que constituyen la población de linfocitos infiltrantes de tumores en este tumor del paciente es específico para una mutación con desplazamiento del marco de lectura, demostrando que los péptidos de desplazamiento del marco de lectura de TGFβRII son inmunogénicos *in vivo*, dando ocasionalmente lugar a activación de linfocitos T espontáneos.
 - 20
 - 3) De esta observación resulta que se procesa el procesamiento de la forma no funcional del receptor TGFβRII que se forma por la mutación con desplazamiento del marco de lectura común. Este procesamiento puede tener lugar tanto en la célula tumoral como parte de la rotura natural de la proteína anómala, como después de que la propia célula tumoral o una forma liberada del receptor haya sido captada por una CPA profesional o ambos.
 - 25
 - 4) Los resultados en la Figura 8 también indican que el péptido con SEC ID N° 17 puede unirse a una molécula de la clase II de HLA, ya que pulsar CPA con este péptido produce una respuesta proliferativa específica contra el péptido, y ya que las respuestas de linfocitos T CD4 siempre están limitadas a la clase II. Este es el caso que se demuestra por los resultados del experimento mostrado en la Figura 9. Aquí se muestra que la respuesta específica contra el péptido con SEC ID N° 17 es completamente bloqueada por un anticuerpo para HLA-DR, pero no con anticuerpos para las otras dos moléculas de la clase II de HLA, HLA-DQ y -DP. Además, usando un panel de líneas de linfocitos B (LCB) transformadas con el virus de Epstein Barr homocigóticas convencionales que cubre las moléculas de la clase II de HLA relevantes presentes en las propias CPA de los pacientes, los presentes inventores pudieron identificar la molécula de clase II responsable de la presentación del péptido con SEC ID N° 17 a TLC IMT8 y IMT9 como que era HLA-DR 14. Estos hallazgos juntos se ajustan extremadamente bien con las observaciones inmunohistológicas hechas en secciones paralelas tomadas de la misma biopsia de tumor, en las que los presentes inventores pudieron demostrar que los linfocitos T CD4+ activados fueron abundantes en la proximidad de células tumorales que se habían inducido para expresar moléculas de HLA-DR. Los resultados en la Figura 11 demuestran que estos clones de linfocitos T pueden organizar una respuesta proliferativa sobre una variedad de dosis de péptidos y que las respuestas son dependientes de la dosis.
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 5) Como estos clones de linfocitos T se obtuvieron clonando linfocitos T aislados de una biopsia de tumor, otra implicación del hallazgo de los presentes inventores es que los linfocitos T activados específicos para el péptido con SEC ID N° 17 pueden recircularse al tejido de tumor después de la activación.
 - 50
 - 6) Como el péptido con SEC ID N° 17 es un antígeno específico para tumor, y como las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura que dan lugar a este péptido o péptidos con secuencias de solapamiento se encuentran comúnmente en cánceres con defectos en enzimas que son parte de la maquinaria de reparación del alineamiento incorrecto, este péptido puede usarse como una vacuna para provocar la respuesta de linfocitos T en pacientes con cáncer o pacientes en alto riesgo de desarrollar cáncer. Tales respuestas de linfocitos T pueden influir posiblemente en el crecimiento de un tumor existente o prohibir el recrecimiento del tumor después de cirugía y otras formas de tratamiento o administrarse a pacientes con una forma hereditaria de cáncer si se detecta o se sospecha de una enzima de alineamiento incorrecto defectuosa y que tienen una alta probabilidad de desarrollar un cáncer donde se producirá esta precisa mutación de
 - 55

reparación del alineamiento incorrecto.

Síntesis

5 Los péptidos se sintetizaron usando síntesis de péptidos en fase sólida de flujo continuo. Se usaron aminoácidos N-a-Fmoc con protección apropiada de la cadena lateral. Los aminoácidos Fmoc se activaron para el acoplamiento como ésteres de pentafluorofenilo o usando tanto TBTU como activación con diisopropilcarbodiimida antes del acoplamiento. Se usó 20 % de piperidina en DMF para la eliminación selectiva de Fmoc después de cada acoplamiento. La escisión de la resina y eliminación final de la protección de la cadena lateral se realizó por 95 % de TFA que contenía secuestrantes apropiados. Los péptidos se purificaron y se analizaron por HPLC de fase inversa (C18). La identidad de los péptidos se confirmó usando espectroscopía de masas por electropulverización (Finnigan mat SSQ710).

10 Los péptidos usados para los estudios *in vitro* de estimulación de linfocitos T se sintetizaron por este procedimiento.

Pueden aplicarse varios otros procedimientos muy conocidos por un experto en la materia para sintetizar los péptidos.

Ejemplos del procedimiento para determinar los péptidos con mutación con desplazamiento del marco de lectura

En este ejemplo, el gen BAX se usa para ilustrar el principio.

15 En cada una de las etapas enumeradas a continuación, la 1ª línea es la secuencia del gen y la 2ª línea es la secuencia de aminoácidos.

En las etapas 2-5, las secuencias expuestas representan la parte mutante de la proteína.

Etapas uno:

BAX normal.

20 ATG GGG GGG GAG GCA CCC GAG CTG GCC CTG GAC CCG GTG
M G G E A P E L A L D P V . . .

Etapas dos:

1G deleciónado de la secuencia del gen.

ATG GGG GGG **AGG** CAC CCG AGC TGG CCC TGG ACC CGG TGC CTC
M G G R H P S W P W T R C L

AGG ATG CGT CCA CCA AGA AGC TGA
R M R P P R S parada

Etapas tres:

25 2G deleciónado de la secuencia del gen.

ATG GGG GGA GGC ACC CGA GCT GGC CCT GGA CCC GGT GCC
M G G G T R A G P G P G A

TCA GGA TGC GTC CAC CAA GAA GCT GAG CGA GTG TCT CAA GCG
S G C V H Q E A E R V S Q A

CAT CGG GGA CGA ACT GGA CAG TAA
H R G R T G Q parada

Etapas cuatro:

1G insertado en la secuencia del gen.

ES 2 463 825 T3

ATG GGG GGG GGA GGC ACC CGA GCT GGC CCT GGA CCC GGT GCC
M G G G T R A G P G P G A

TCA GGA TGC GTC CAC CAA GAA GCT GAG CGA GTG TCT CAA GCG
S G C V H Q E A E R V S Q A

CAT CGG GGA CGA ACT GGA CAG TAA
H R G R T G Q parada

Etapa cinco:

2G insertado en la secuencia del gen.

ATG GGG GGG GGG AGG CAC CCG AGC TGG CCC TGG ACC CGG TGC
M G G G R H P S W P W T R C

CTC AGG ATG CGT CCA CCA AGA AGC TGA
L R M R P P R S parada

- 5 En el siguiente ejemplo, el gen TGFβRII se usa para ilustrar el principio.

En cada una de las etapas enumeradas a continuación, la 1ª línea es la secuencia del gen y la 2ª línea es la secuencia de aminoácidos.

En las etapas 2-5, las secuencias expuestas representan la parte mutante de la proteína.

Etapa uno:

- 10 TGFβRII normal.

GAA AAA AAA AAG CCT GGT GAG ACT TTC TTC ATG TGT TCC...
E K K K P G E T F F M C S...

Etapa dos:

1A deleciónado de la secuencia del gen.

GAA AAA AAA AGC CTG GTG AGA CTT TCT TCA TGT GTT CCT GTA
E K K S L V R L S S C V P V

GCT CTG ATG AGT GCA ATG ACA ACA TCA TCT TCT CAG AAG AAT
A L M S A M T T S S S Q K N

ATA ACA CCA GCA ATC CTG ACT TGT TGC TAG
I T P A I L T C C parada

- 15 Etapa tres:

2A deleciónado de la secuencia del gen.

GAA AAA AAA GCC TGG TGA
E K K A W parada

Etapa cuatro:

1A insertado en la secuencia del gen.

- 20 GAA AAA AAA AAA GCC TGG TGA
E K K K A W parada

Etapa cinco:

2A insertado en la secuencia del gen.

GAA AAA AAA AAA AGC CTG GTG AGA CTT TCT TCA TGT GTT CCT
 E K K K S L V R L S S C V P

GTA GCT CTG ATG AGT GCA ATG ACA ACA TCA TCT TCT CAG AAG
 V A L M S A M T T S S S Q K

AAT ATA ACA CCA GCA ATC CTG ACT TGT TGC TAG
 N I T P A I L T C C parada

- 5 Así, los péptidos de la invención pueden usarse en un procedimiento para el tratamiento de cánceres con células cancerosas que alojan genes con mutaciones con desplazamiento del marco de lectura, tratamiento que comprende administrar al menos un péptido de la presente invención *in vivo* o *ex vivo* a un paciente humano en necesidad de tal tratamiento.
- Los péptidos de la invención pueden usarse para vacunar un ser humano que tiene predisposición a cánceres con células cancerosas que alojan genes con mutaciones con desplazamiento del marco de lectura, administrando al menos un péptido de la presente invención a dicho ser humano.
- 10 Se considera adicionalmente que es una ventaja administrar a un individuo humano una mezcla de los péptidos de la presente invención, por lo que cada uno de los péptidos de la invención puede unirse a diferentes tipos de moléculas de la clase I y/o clase II de HLA del individuo.
- Se anticipa adicionalmente que la potencia de una vacuna contra el cáncer o fármaco de péptido como se desvela en la solicitud PCT/NO92/00032 anteriormente mencionada puede potenciarse enormemente si se incluyeran los péptidos de la presente invención. Así, los péptidos de la presente invención pueden administrarse junto con, tanto
- 15 simultáneamente como en secuencia opcional, con los péptidos desvelados en el documento PCT/NO92/00032.
- Se considera que los péptidos pueden administrarse junto, tanto simultáneamente como por separado, con compuestos tales como citocinas y/o factores de crecimiento, es decir, interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), ligando de Fit-3 o similares con el fin de fortalecer la respuesta inmunitaria como se conoce en la técnica.
- 20 Los péptidos según la presente invención pueden usarse en una vacuna o una composición terapéutica tanto solos como en combinación con otros materiales tales como, por ejemplo, adyuvantes convencionales o en forma de un lipopéptido conjugado que como se conoce en la técnica puede inducir linfocitos T citotóxicos de alta afinidad (K. Deres, Nature, vol. 342 (nov de 1989)).
- Los péptidos según la presente invención pueden ser útiles para incluir en tanto un péptido como una vacuna basada en fragmentos recombinantes.
- 25 Los péptidos según la presente invención pueden incluirse en composiciones farmacéuticas o en vacunas junto con aditivos, diluyentes, estabilizadores, o similares, usuales como se conoce en la técnica.
- Según la presente invención, una composición farmacéutica o vacuna puede incluir los péptidos solos o en combinación con al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 Adicionalmente, una vacuna o composición terapéutica puede comprender una selección de péptidos que son fragmentos de las proteínas mutantes que se producen a partir de la inserción o delección de bases en una secuencia de repetición del gen.
- Adicionalmente, una composición de vacuna puede comprender al menos un péptido seleccionado para un cáncer, vacuna que se administraría a una persona que tiene una disposición genética para este cáncer particular.
- 35 Adicionalmente, una composición de vacuna puede comprender al menos un péptido seleccionado para un cáncer, vacuna que se administraría a una persona que pertenece a un grupo de alto riesgo para este cáncer particular.
- La vacuna contra el cáncer según la presente invención puede administrarse adicionalmente a la población en general, por ejemplo, como una mezcla de péptidos que da lugar a inmunidad de linfocitos T contra diversos cánceres comunes conectados con genes de mutación con desplazamiento del marco de lectura.
- 40 Los péptidos según la presente invención pueden administrarse como péptidos individuales o como una mezcla de péptidos. Alternativamente, los péptidos pueden ligarse covalentemente entre sí para formar polipéptidos más grandes o incluso polipéptidos cíclicos.
- Una terapia para el cáncer según la presente invención puede administrarse tanto *in vivo* como *ex vivo* que tiene como

objetivo principal la producción de líneas de linfocitos T específicas o clones contra el producto génico mutante asociado al tipo de cáncer del que está afectado el paciente.

Además, los péptidos mutantes por desplazamiento del marco de lectura para el uso definido en la presente invención pueden administrarse a un paciente por diversas vías que incluyen, pero no se limitan a, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, o similares. En una realización, los péptidos se administran intradérmicamente. Los péptidos pueden administrarse en sitios de inyección individuales o múltiples inyección sitios a un paciente en una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz.

Los péptidos pueden administrarse solo una vez o alternativamente varias veces, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 1-2 meses con una secuencia repetida más tarde según la necesidad del paciente que está tratándose.

Los péptidos pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de 1 microgramo (1 µg) a 1 gramo (1 g) a un paciente humano promedio o individuo que va a vacunarse. Se prefiere usar una dosis más pequeña en el intervalo de 1 microgramo (1 µg) a 1 miligramo (1 mg) para cada administración.

La invención engloba adicionalmente secuencias de ADN que codifican una péptido BAX con mutación con desplazamiento del marco de lectura para su uso como se define en las reivindicaciones.

La invención engloba adicionalmente secuencias de ADN aisladas que comprenden una secuencia de ADN que codifica al menos un péptido de BAX mutante por desplazamiento del marco de lectura, para su uso por administración de tales secuencias de ADN aisladas como una vacuna contra el tratamiento o profilaxis de cánceres asociados a mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en los genes.

Los péptidos pueden administrarse a un individuo en forma de vacunas de ADN. El ADN que codifica estos péptidos puede estar en forma de ADN de plásmido clonado u oligonucleótido sintético. El ADN puede administrarse junto con citocinas, tales como IL-2, y/u otras moléculas coestimulantes. Las citocinas y/o moléculas coestimulantes pueden administrarse por sí mismas en forma de ADN de plásmido u oligonucleótido. Se ha mostrado que la respuesta a una vacuna de ADN va a aumentarse por la presencia de secuencias de ADN inmunoestimulantes (SIE). Éstas pueden tomar la forma de motivos hexámeros que contienen CpG metilado, según la fórmula: 5'-purina-purina-CG-pirimidina-pirimidina-3'. Las vacunas de ADN de los presentes inventores pueden, por tanto, incorporar éstas u otras SIE, en el ADN que codifica los péptidos, en el ADN que codifica la citocina u otras moléculas coestimulantes, o en ambas. Una revisión de las ventajas de la vacunación con ADN se proporciona por Tighe y col. (1998, Immunology Today, 19(2), 89-97).

En una realización, la secuencia de ADN que codifica los péptidos de BAX mutantes comprende:

BAX normal.

ATG GGG GGG GAG GCA CCC GAG CTG GCC CTG GAC CCG GTG

1G deleciónado de la secuencia del gen BAX.

ATG GGG GGG AGG CAC CCG AGC TGG CCC TGG ACC CGG TGC CTC

AGG ATG CGT CCA CCA AGA AGC TGA

2G deleciónado de la secuencia del gen BAX.

ATG GGG GGA GGC ACC CGA GCT GGC CCT GGA CCC GGT GCC

TCA GGA TGC GTC CAC CAA GAA GCT GAG CGA GTG TCT CAA GCG

CAT CGG GGA CGA ACT GGA CAG TAA

1G insertado en la secuencia del gen BAX.

ATG GGG GGG GGA GGC ACC CGA GCT GGC CCT GGA CCC GGT GCC

TCA GGA TGC GTC CAC CAA GAA GCT GAG CGA GTG TCT CAA GCG

CAT CGG GGA CGA ACT GGA CAG TAA

2G insertado en la secuencia del gen BAX.

ATG GGG GGG GGG **AGG** CAC CCG AGC TGG CCC TGG ACC CGG TGC

CTC AGG ATG CGT CCA CCA AGA AGC **TGA**

Una secuencia de ADN que codifica los péptidos de TGFβRII mutantes comprende:

Gen TGFβRII normal.

GAA AAA AAA AAG CCT GGT GAG ACT TTC TTC ATG TGT TCC

5 1A deleciónado de la secuencia del gen TGFβRII.

GAA AAA AAA AGC CTG GTG AGA CTT TCT TCA TGT GTT CCT GTA

GCT CTG ATG AGT GCA ATG ACA ACA TCA TCT TCT CAG AAG AAT

ATA ACA CCA GCA ATC CTG ACT TGT TGC TAG

2A deleciónado de la secuencia del gen TGFβRII.

GAA AAA AAA GCC TGG TGA

1A insertado en la secuencia del gen TGFβRII.

10 GAA AAA AAA AAA GCC TGG TGA

2A insertado en la secuencia del gen TGFβRII.

GAA AAA AAA AAA AGC CTG GTG AGA CTT TCT TCA TGT GTT CCT

GTA GCT CTG ATG AGT GCA ATG ACA ACA TCA TCT TCT CAG AAG

AAT ATA ACA CCA GCA ATC CTG ACT TGT TGC TAG

15 La invención engloba adicionalmente vectores y plásmidos que comprenden una secuencia de ADN que codifica un péptido de BAX mutante por desplazamiento del marco de lectura. Los vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmido de *E. coli*, un vector de *Listeria* y vectores virales recombinantes. Los vectores virales recombinantes incluyen, pero no se limitan a, virus orthopox, virus del canario, virus capripox, virus suipox, variolovacuna, baculovirus, adenovirus humano, SV40, virus del papiloma bovino y similares que comprenden la secuencia de ADN que codifica un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura.

20 Se considera que un tratamiento contra el cáncer o profilaxis puede lograrse también mediante la administración de una cantidad eficaz de un vector de virus recombinante o plásmido que comprende al menos un sitio de inserción que contiene una secuencia de ADN que codifica un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura a un paciente, por lo que las células presentadoras de antígeno del paciente se convierten en células huésped para el vector/plásmido y se logra la presentación del complejo de HLA/péptido con mutación con desplazamiento del marco de lectura.

25 Los péptidos para su uso en la presente invención pueden producirse por procedimientos convencionales como se conoce en la técnica, tales como síntesis química de péptidos, tecnología de ADN recombinante o escisión por proteasas de una proteína o péptido codificado por un gen mutado por desplazamiento del marco de lectura. Un procedimiento para la síntesis química se aclara en la siguiente descripción.

30 Con el fin de que una vacuna contra el cáncer y procedimientos para la terapia contra el cáncer específico basados en inmunidad de linfocitos T específicos sea eficaz, deben cumplirse tres condiciones:

1. Los péptidos usados deben corresponderse, tanto en su longitud completa como después del procesamiento por células presentadoras de antígeno, con el fragmento de proteína mutante procesado como se presenta por una molécula de clase I y/o clase II de HLA sobre la célula cancerosa u otras células presentadoras de antígeno,

35 2. Los péptidos usados deben unirse a una molécula de la clase I y/o clase II de HLA en una forma inmunogénica, y

3. Los linfocitos T que pueden reconocer y corresponderse con el complejo de HLA/péptido deben estar presentes en la circulación del ser humano.

Se ha establecido que todas estas condiciones se cumplen para algunos péptidos representativos para su uso en la presente invención. Los péptidos dan lugar a respuestas inmunitarias de linfocitos T específicos *in vitro*. Se ha establecido que los péptidos se corresponden con fragmentos de proteínas mutantes procesados. Esto se ejemplifica con péptidos correspondientes a los fragmentos de péptidos de BAX mutantes transformados.

5 Mediante la presente invención se consiguen las siguientes ventajas:

- Ofrece una posibilidad de tratar pacientes que padecen cánceres que se producen a partir de mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en sus genes, la mayoría de los cánceres conocidos actualmente no tienen ninguna buena alternativa de tratamiento.
- 10 - Ofrece una posibilidad de vacunar profilácticamente seres humanos que llevan disposiciones genéticas o que pertenecen a otros grupos de alto riesgo.
- Ofrece una posibilidad de preparar un tratamiento de combinación para un cáncer específico, tal como, por ejemplo, cánceres colorrectal o pancreático, en el que el cáncer comúnmente está asociado a tanto una mutación con desplazamiento del marco de lectura como a una mutación puntual en los genes.
- 15 - Como las mutaciones con desplazamiento del marco de lectura descritas se producen en una gran variedad de cánceres será posible usar estos péptidos en combinación con vacunas establecidas y futuras vacunas para obtener un tratamiento dirigido múltiple.
- Asimismo, los pacientes que padecen cánceres asociados a múltiples mutaciones con desplazamiento del marco de lectura en genes pueden tratarse más eficientemente mediante un tratamiento de combinación.

20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido **caracterizado porque** a) tiene al menos 8 aminoácidos de longitud y es un fragmento de una proteína mutante que se produce a partir de una mutación con desplazamiento del marco de lectura en un gen BAX de una célula cancerosa en el que dicha mutación con desplazamiento del marco de lectura se produce en la repetición G8 en el tercer exón que atraviesa los codones 38-41 del gen BAX no mutado; y b) consiste en al menos un aminoácido de la parte mutante de una secuencia de proteínas codificada por dicho gen; y c) comprende 0-10 aminoácidos del extremo carboxilo de la parte normal de la secuencia de proteínas que precede al extremo amino de la secuencia mutante y opcionalmente se extiende al extremo carboxilo de la parte mutante de la proteína como se ha determinado por un nuevo codón de terminación generado por la mutación con desplazamiento del marco de lectura; y d) induce, tanto en su longitud completa como después del procesamiento por célula presentadora de antígeno, respuestas de linfocitos T, para su uso en un procedimiento para la vacunación de una persona predispuesta a, o afectada con, cáncer, que consiste en administrar al menos uno de dicho(s) péptido(s), una o más veces, en una cantidad suficiente para la inducción de inmunidad de linfocitos T específicos para las proteínas mutantes, o fragmentos de las mismas, codificadas por el gen BAX mutado por desplazamiento del marco de lectura.
2. El péptido para su uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** contiene 8-25 aminoácidos, tal como 9-20 aminoácidos, 9-16 aminoácidos, 8-12 aminoácidos, 20-25 aminoácidos, 9 aminoácidos, 12 aminoácidos, o 13 aminoácidos.
3. El péptido para su uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** está seleccionado de un grupo de péptidos que tiene los siguientes números de identidad de secuencia: SEC ID N°: 1-12 o un fragmento de cualquiera de los mismos.
4. Un péptido como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un paciente afectado con cáncer estimulando *in vivo* o *ex vivo* con el péptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
5. El péptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cantidad del (de los) péptido(s) está en el intervalo de 1 microgramo (1 µg) a 1 gramo (1 g) y preferencialmente en el intervalo de 1 microgramo (1 µg) a 1 miligramo (1 mg) para cada administración.
6. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se usa en combinación con al menos un péptido que
- a) tiene un punto de mutación o translocación con respecto al fragmento correspondiente de una proteína proto-oncogénica;
 - y
 - b) se corresponde con, cubre completamente o es, un fragmento de un fragmento de proteína oncogénica procesada como se presenta por una célula cancerosa u otras células que presentan antígeno (CPA);
 - y
 - c) induce respuestas de linfocitos T específicos al fragmento de proteína oncogénica real producido por la célula por procesamiento y presentado en la molécula de HLA.
7. Una secuencia de ADN aislada que codifica un péptido mutante por desplazamiento del marco de lectura como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una persona predispuesta a, o afectada con, cáncer, por estimulación *in vivo* o *ex vivo* con dichas secuencias de ADN.
8. Un plásmido o vector de virus que comprende la secuencia de ADN definida en la reivindicación 7 para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una persona predispuesta a, o afectada con, cáncer, por estimulación *in vivo* o *ex vivo* con una secuencia de ADN definida en la reivindicación 7.

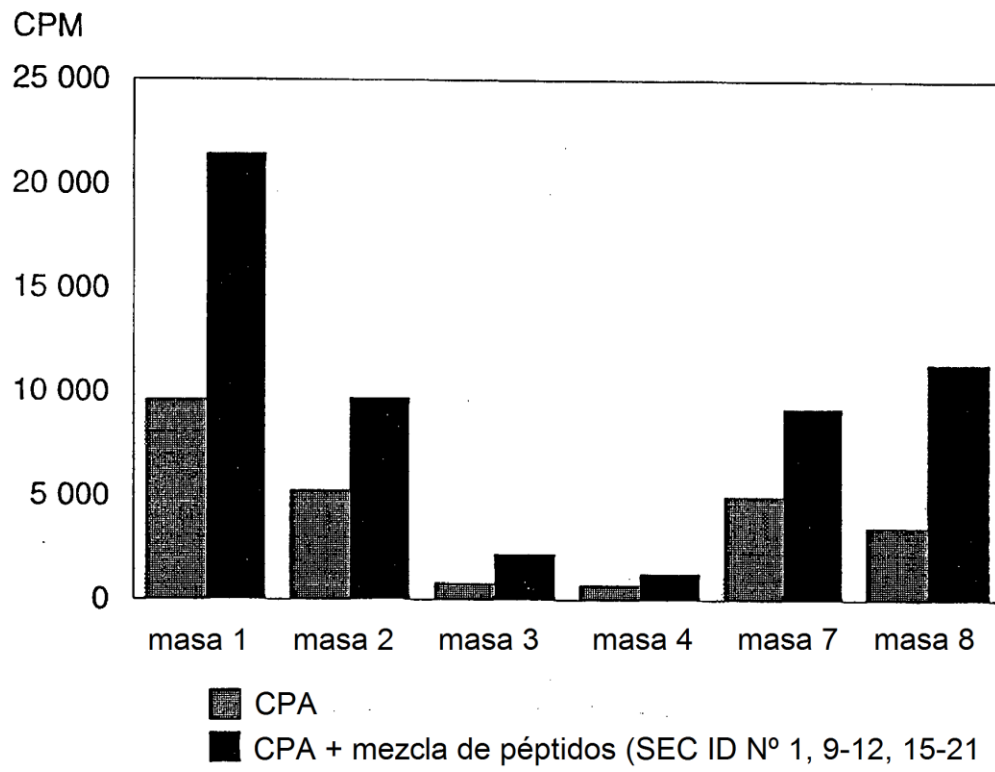


Fig. 1

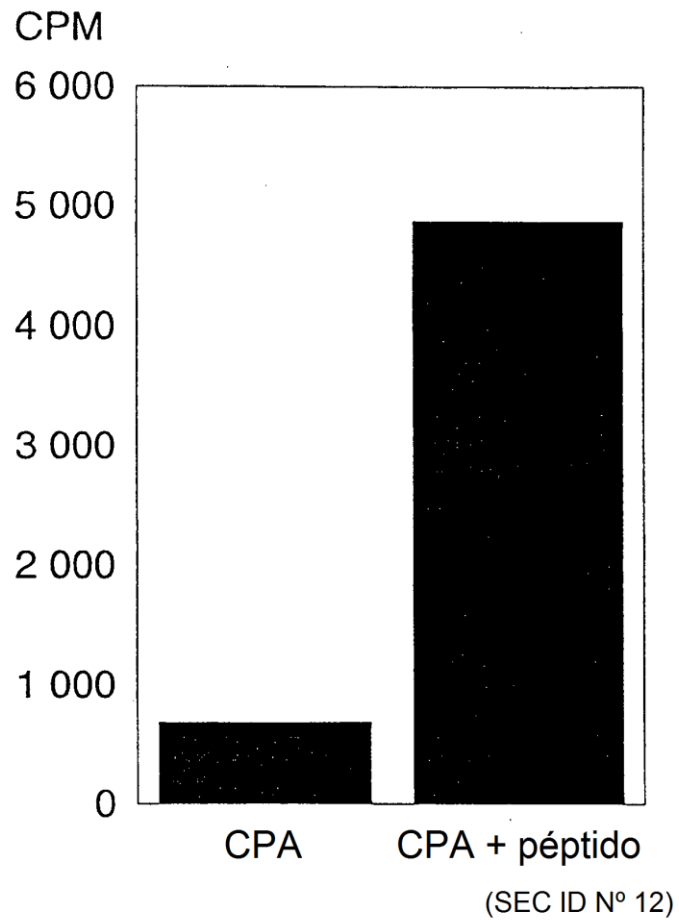


Fig. 2

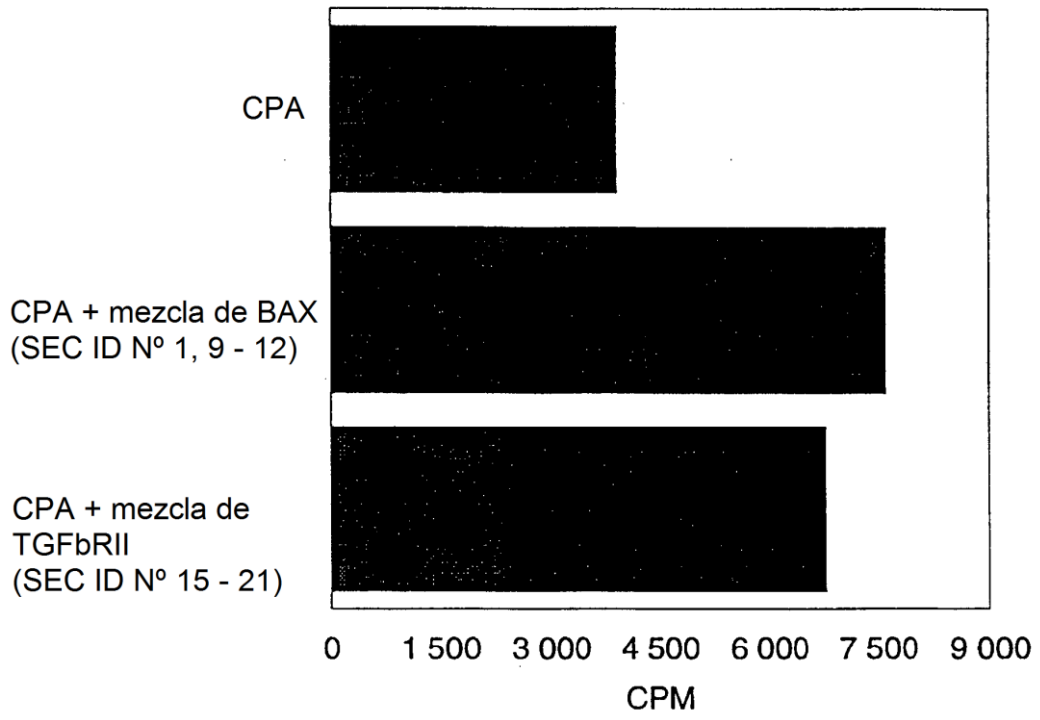


Fig. 3

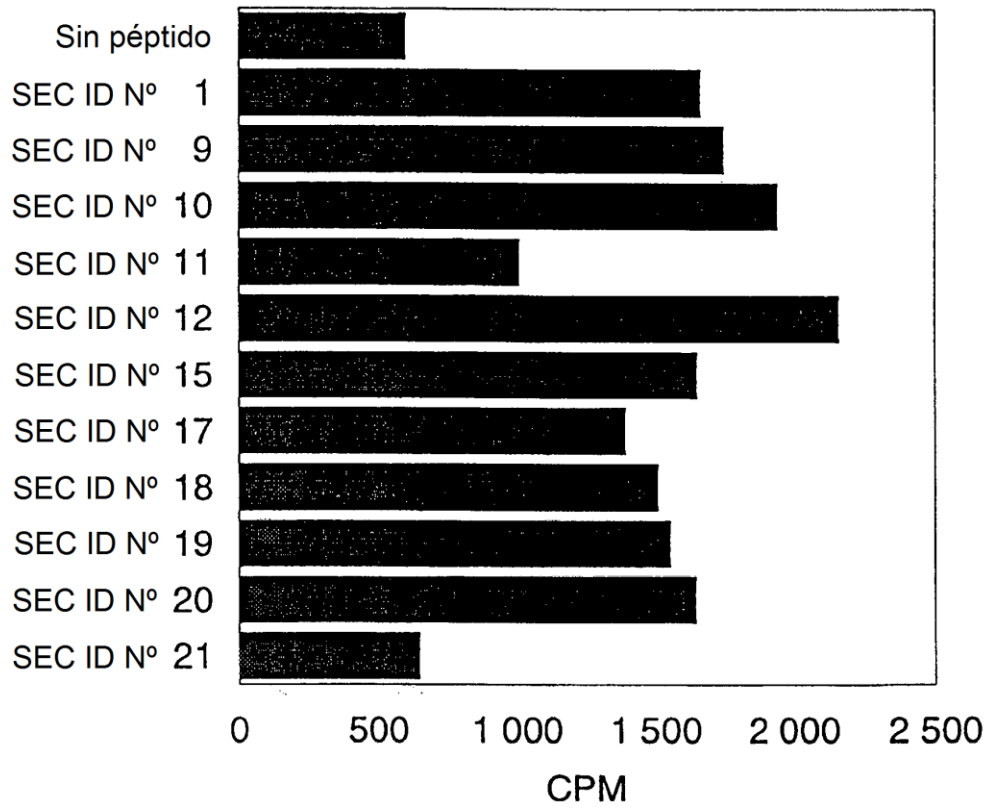


Fig. 4

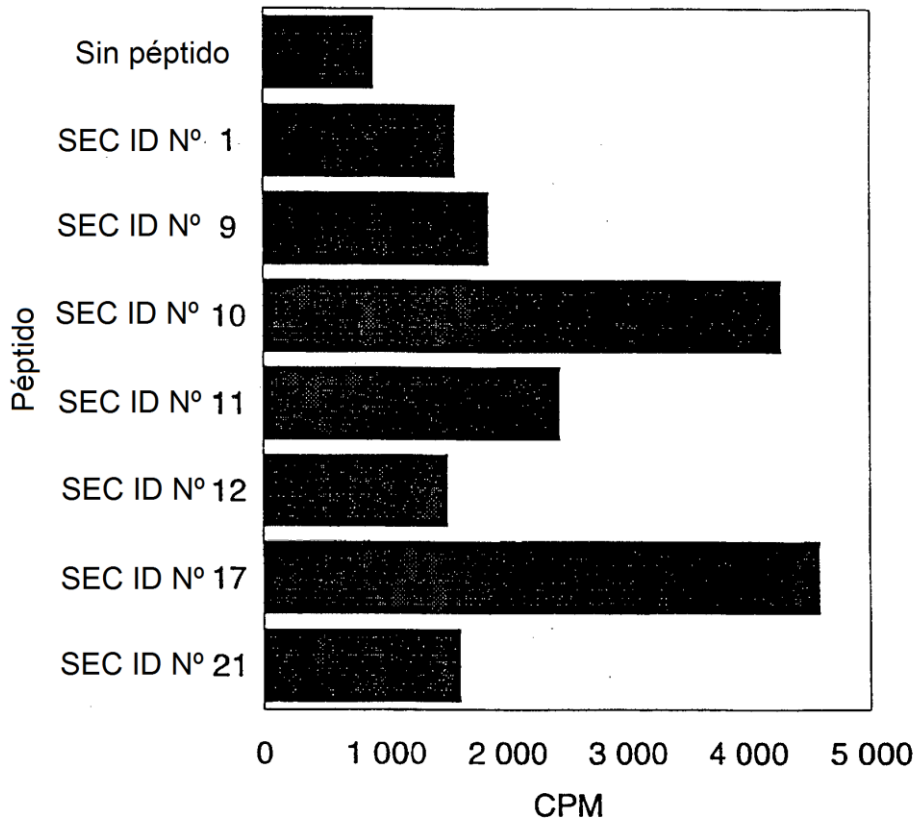


Fig. 5

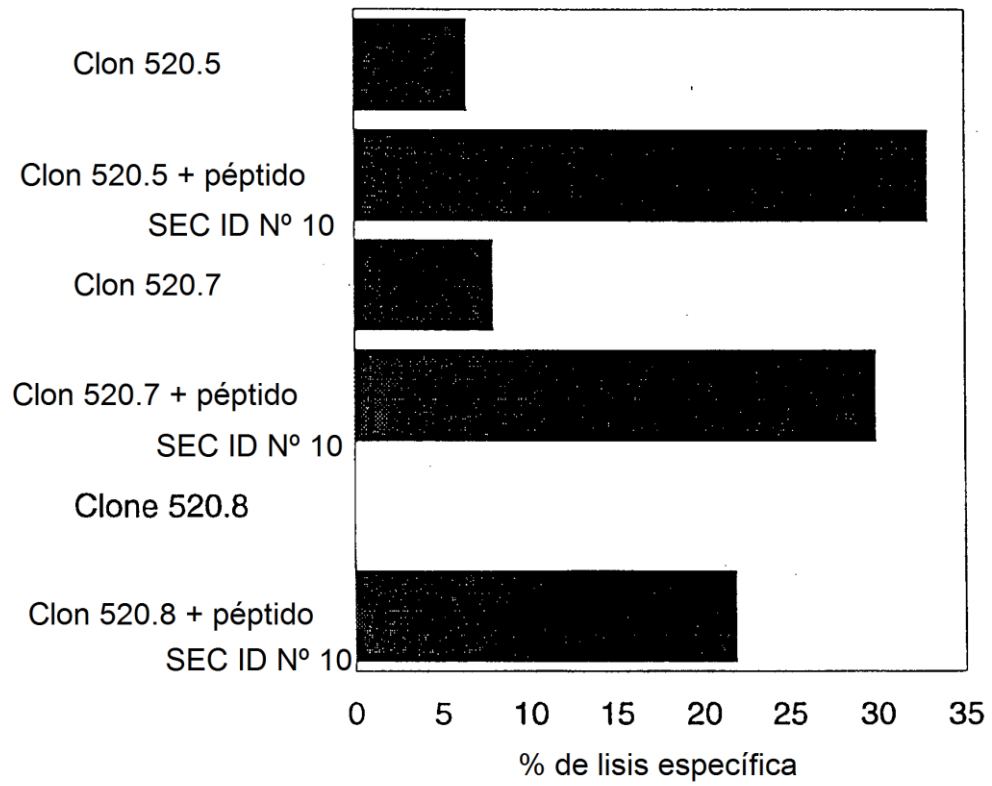


Fig. 6

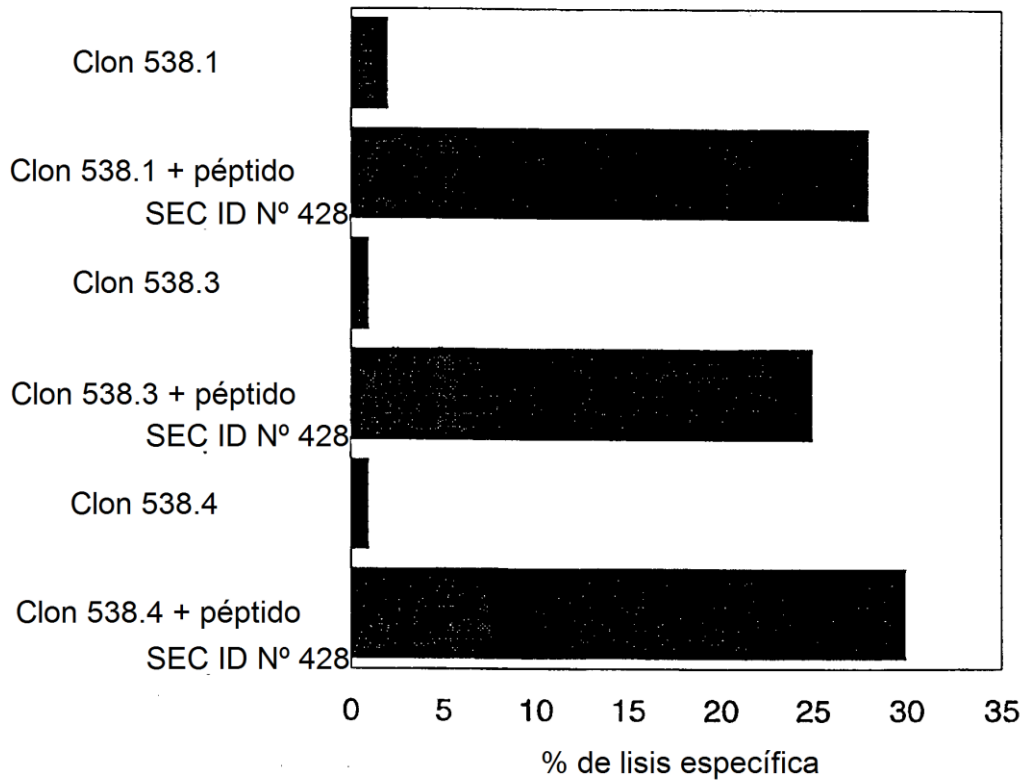


Fig. 7

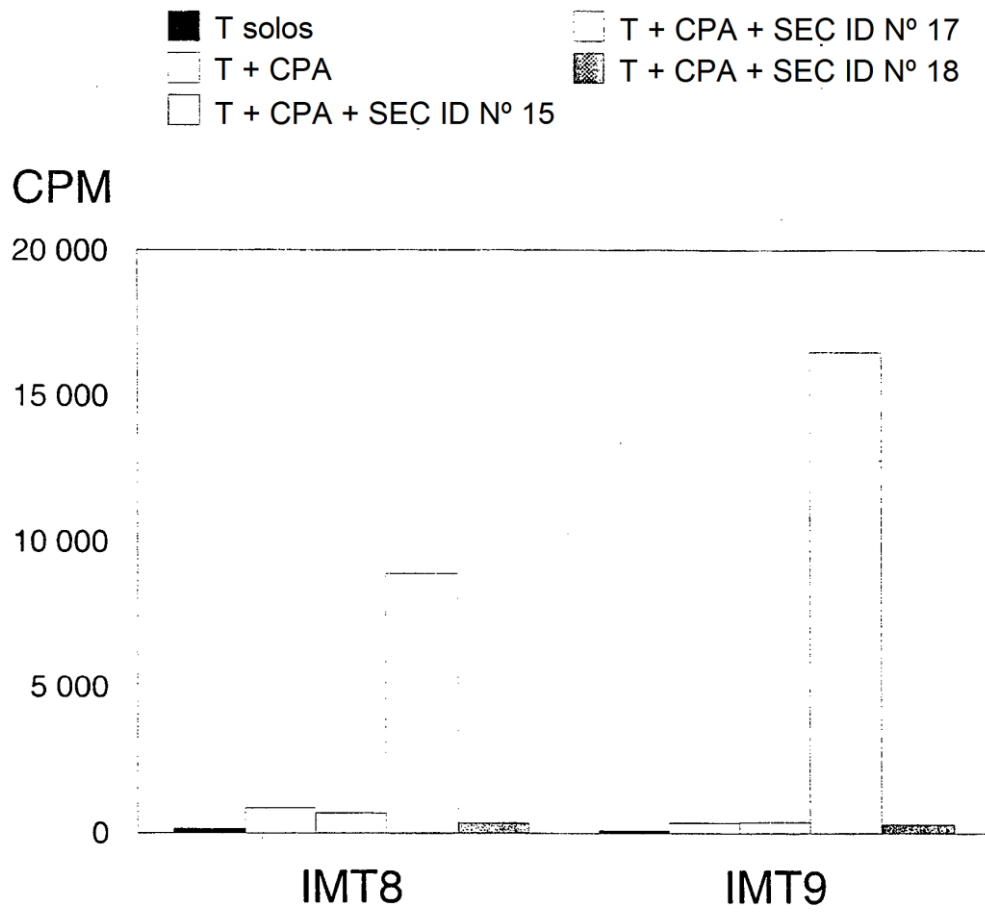


Fig. 8

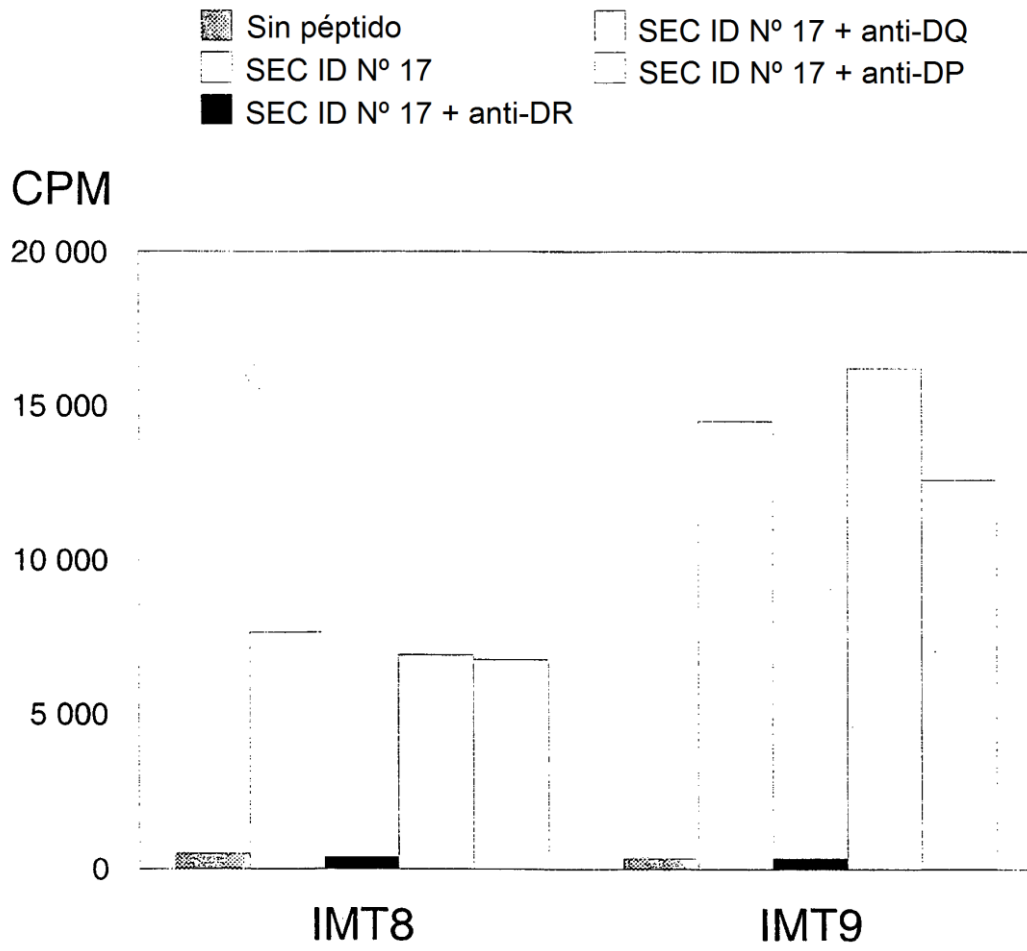


Fig. 9

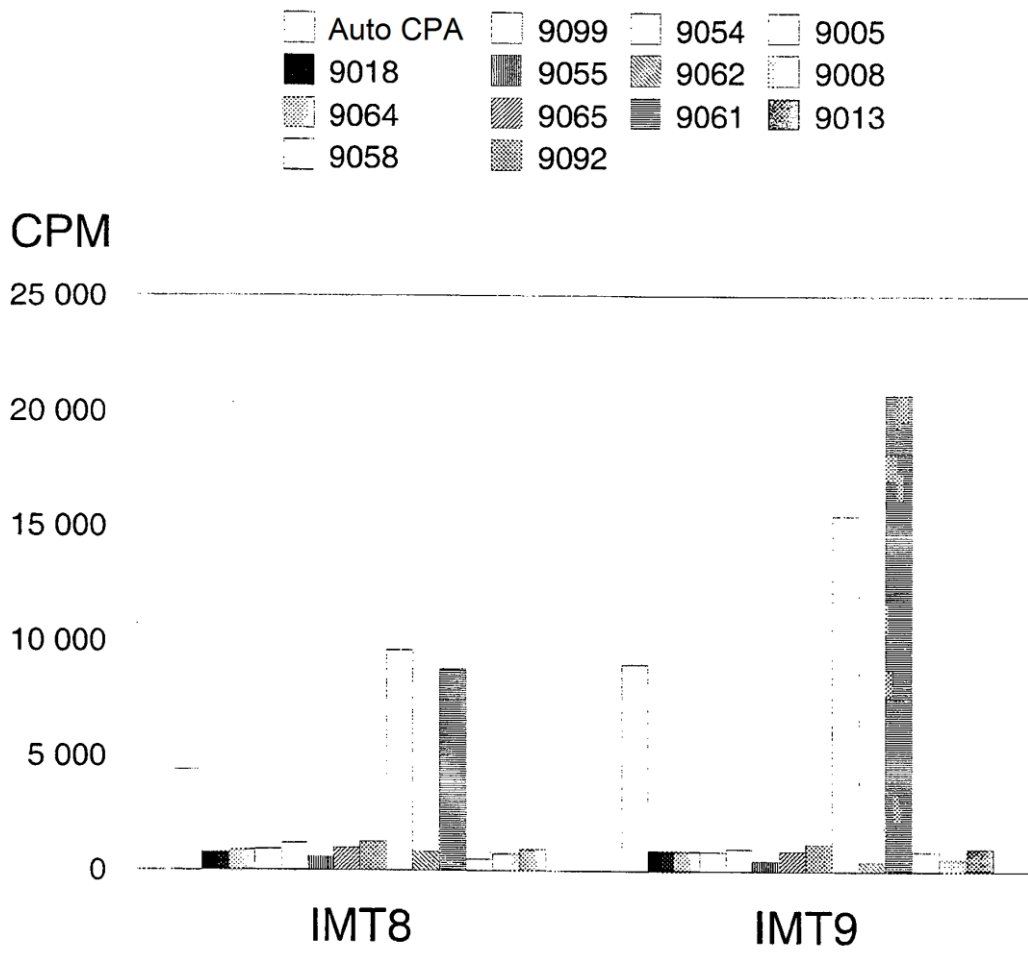
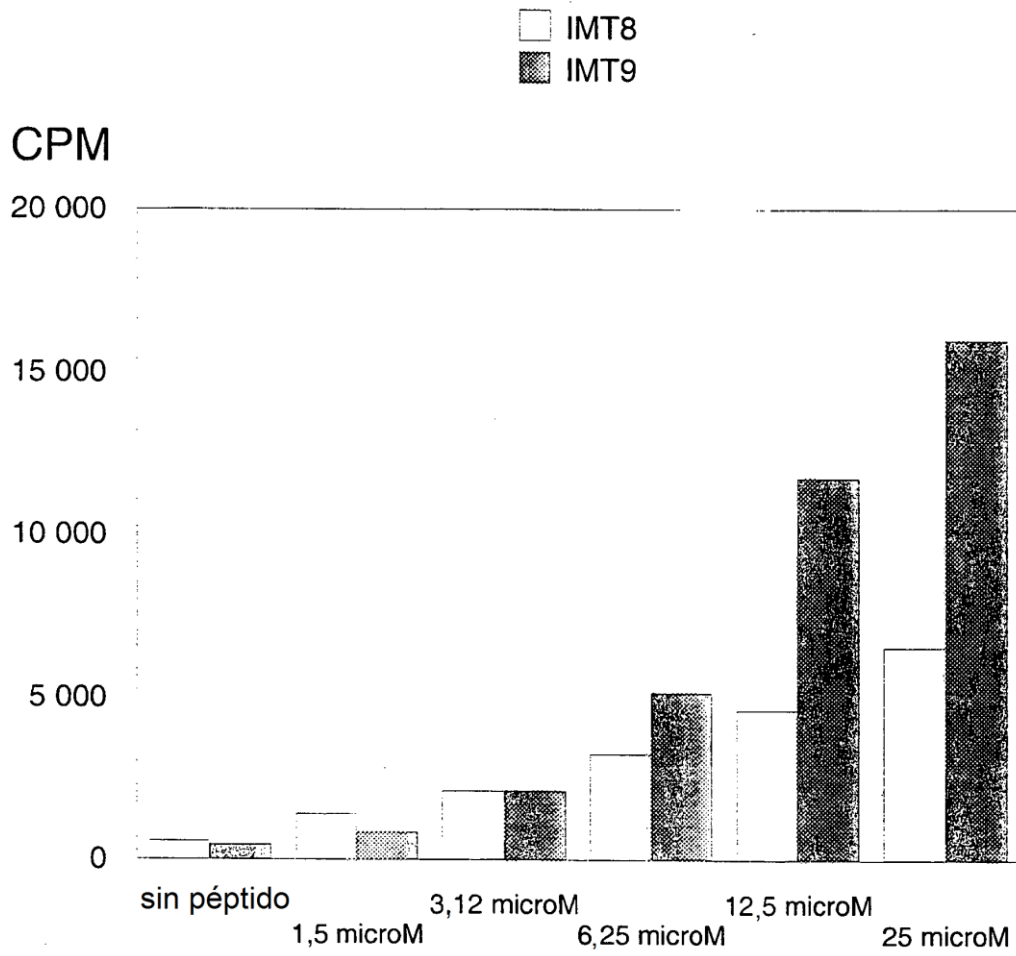


Fig. 10



SEC ID N° 17

Fig. 11

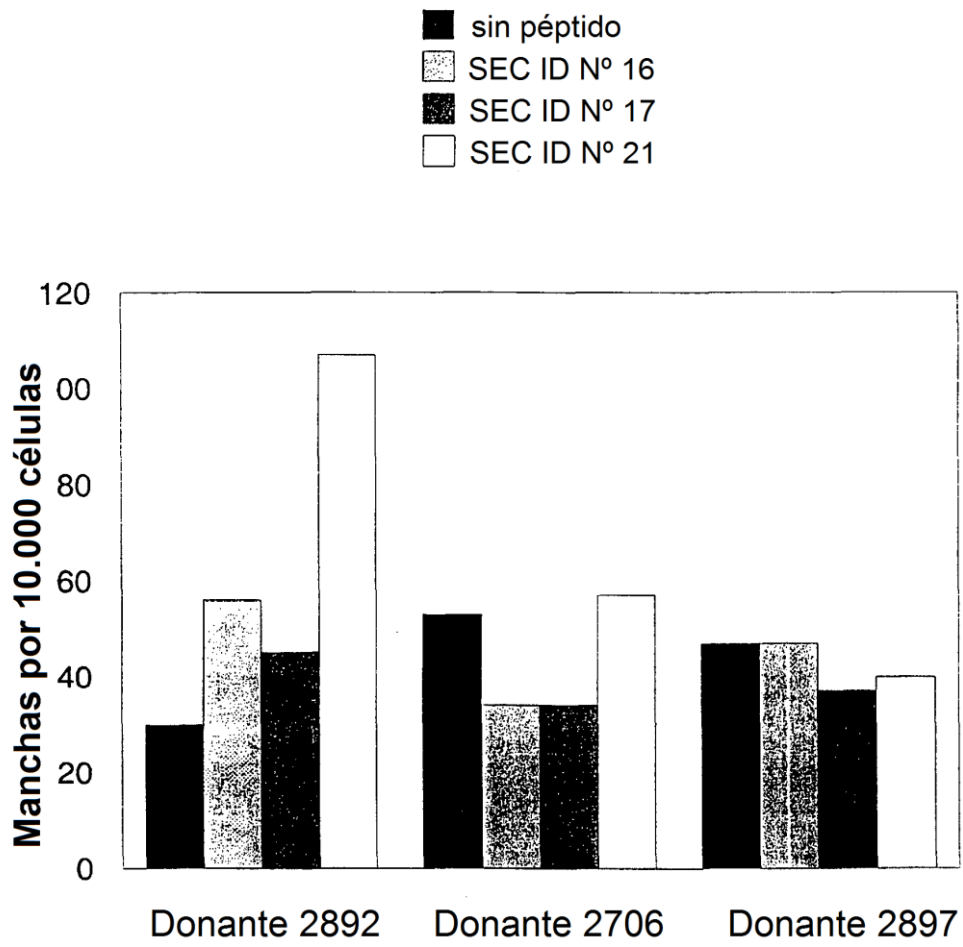


Fig. 12

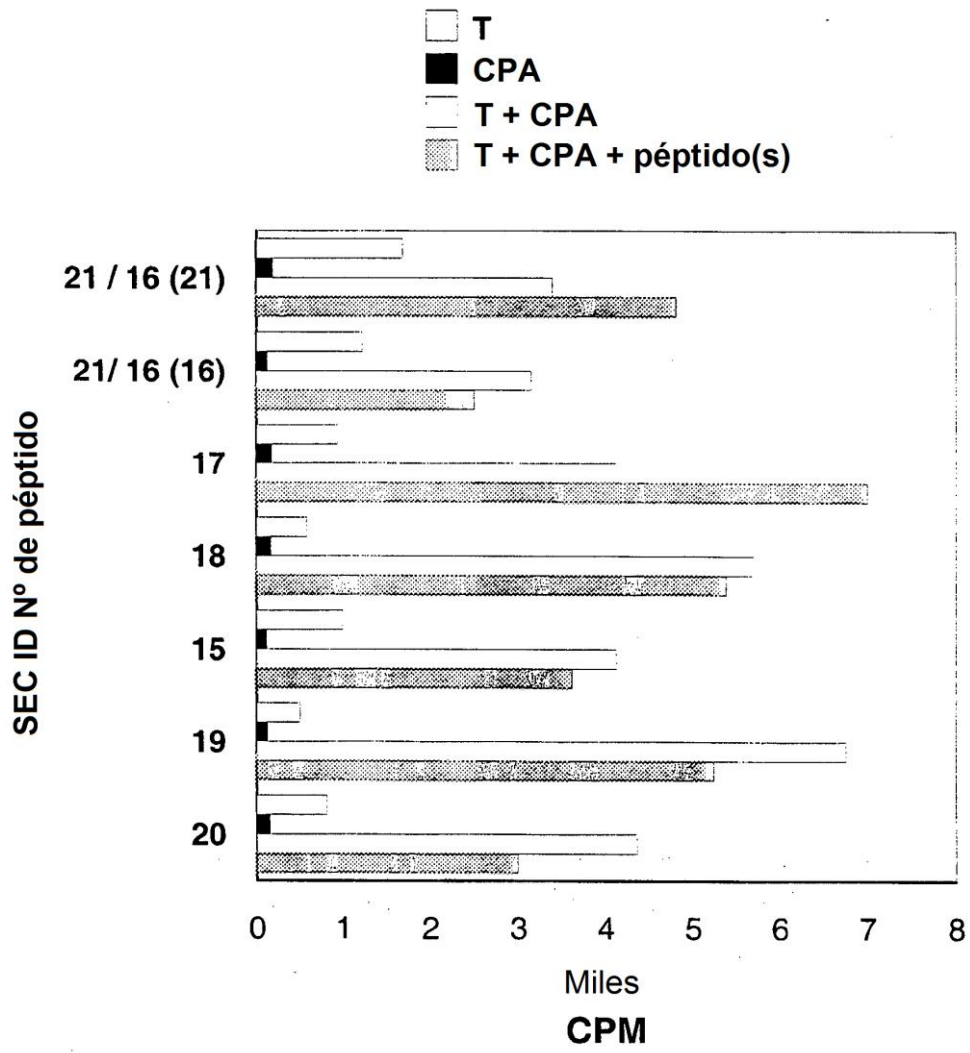


Fig. 13

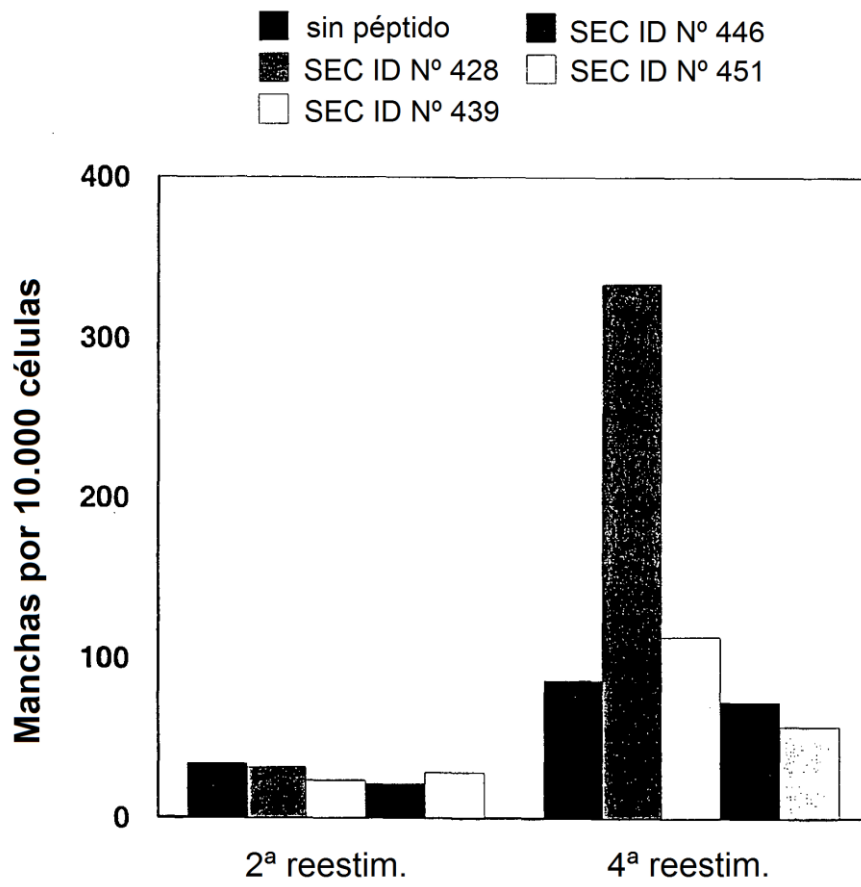


Fig. 14