

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 841**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011 E 11781409 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2569633**

54 Título: **Composiciones y métodos para identificar neoantígenos específicos de un tumor**

30 Prioridad:

14.05.2010 US 334866 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(50.0%)
55 Fruit Stret
Boston, MA 02114, US y
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**HACOHEN, NIR y
WU, CATHERINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 564 841 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

Composiciones y métodos para identificar neoantígenos específicos de un tumor

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de forma general a la identificación de neoantígenos específicos de tumor y a los usos de dichos neoantígenos para producir vacunas contra el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Las vacunas contra tumores típicamente están compuestas de antígenos tumorales y de moléculas inmunoestimulantes (p.ej., citocinas o ligandos de TLR) que actúan juntas para inducir células T citotóxicas específicas de antígeno (CTLs) que reconozcan y lisen las células tumorales. Actualmente, casi todas las vacunas contienen antígenos tumorales compartidos o preparaciones de células tumorales enteras (Gilboa, 1999). Los antígenos tumorales compartidos son proteínas inmunogénicas con una expresión selectiva en tumores a lo largo de muchos individuos, y normalmente se administran a los pacientes como péptidos sintéticos o proteínas recombinantes (Boon et al., 2006). Por el contrario, las preparaciones de células tumorales enteras se administran a los pacientes como células irradiadas autólogas, lisatos celulares, fusiones celulares, preparaciones proteínas de choque térmico o ARNm total (Parmiani et al., 2007). Puesto que las células tumorales enteras son aisladas del paciente autólogo, las células expresan antígenos tumorales específicos del paciente, así como antígenos tumorales compartidos. Finalmente, existe una tercera clase de antígenos tumorales que raramente han sido usados en vacunas debido a dificultades técnicas para identificarlos (Sensi et al. 2006). Esta clase consiste en proteínas con mutaciones específicas de tumor que dan como resultado secuencias de aminoácidos alteradas. Dichas proteínas mutadas tienen el potencial de: (a) marcar unívocamente un tumor (respecto a células no tumorales) para reconocimiento y destrucción por parte del sistema inmune (Lennerz et al., 2005); (b) evitar una tolerancia de células T centrales y a veces periféricas, y así ser reconocidas por receptores de células T más efectivos, de mayor avidez (Gotter et al., 2004).

15 Rammensee et al. (2002), Immunological Reviews 188: 164-176, describe que para obtener una selección de antígenos tumorales adecuados para ser atacados en un paciente de cáncer particular, es necesario realizar un análisis de las diferencias entre las células tumorales y las normales a un nivel molecular.

Por lo tanto, existe la necesidad de un método para identificar neoepítomos que sean útiles como vacunas tumorales.

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un método para identificar una pluralidad de péptidos neoantigénicos tal como se define en las reivindicaciones anexas.

La presente descripción se refiere en parte al descubrimiento de un método para identificar péptido capaces de provocar una respuesta de células T específicas de tumor.

25 En un aspecto, la descripción proporciona métodos para identificar un neoantígeno a través de la identificación de una mutación específica de tumor en un gen expresado de un sujeto que padece cáncer. En algunos aspectos, cuando la mutación es una mutación puntual el método comprende además la identificación del péptido mutante que tiene la mutación. Preferiblemente, el péptido mutante se une a una proteína HLA de clase I con una mayor afinidad que un péptido natural, y tiene una IC50 inferior a 500 nM. En otros aspectos, cuando la mutación es una mutación de sitio de división, de un cambio estructural, de lectura o de fusión génica, el método comprende además la identificación del polipéptido mutante codificado por la mutación. Preferiblemente, el polipéptido mutante se une a una proteína HLA de clase I.

Opcionalmente, el método incluye además seleccionar péptidos o polipéptidos que activen células T CD8 antitumorales.

30 El péptido o polipéptido mutante se une preferiblemente a una proteína HLA de clase I con una mayor afinidad que un péptido natural y tiene una IC50 inferior a 500 nM. Preferiblemente, el péptido o polipéptido tiene una IC50 inferior a 250 nM. Más preferiblemente, el péptido o polipéptido tiene una IC50 inferior a 100 nM. Lo más preferiblemente, el péptido o polipéptido tiene una IC50 inferior a 50 nM.

35 El péptido mutante tiene una longitud de aproximadamente 8-10 aminoácidos. En otro aspecto, tiene una longitud de aproximadamente 8-50 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido mutante tiene una longitud superior a los 10 aminoácidos, superior a los 15 aminoácidos, superior a los 20 aminoácidos, superior a los 30 aminoácidos. Preferiblemente, los péptidos mutantes tienen una longitud de aproximadamente 24-40 aminoácidos.

40 También se describen en la presente memoria métodos para inducir una respuesta inmune específica de tumor en un sujeto a través de la administración de uno o más péptidos o polipéptidos identificados según los métodos de la invención y un adyuvante. El adyuvante, por ejemplo, es un adyuvante basado en TLR o un adyuvante basado en

aceite mineral. En algunos aspectos, el péptido o polipéptido y el adyuvante basado en TLR se emulsionan con un adyuvante basado en aceite mineral. Opcionalmente, el método incluye además la administración de un agente anti-inmunosupresor tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PDI, un anticuerpo anti-PD-LI, un anticuerpo anti-CD25 o un inhibidor de IDO.

5 En la presente memoria también se describen métodos para inducir una respuesta inmune específica de tumor en un sujeto mediante la administración al sujeto de células dendríticas autólogas o de células que presentan antígenos que han sido pulsadas con uno o más de los péptidos o polipéptidos identificados según los métodos de las invenciones. Opcionalmente, el método incluye además la administración de un adyuvante tal como, por ejemplo, un adyuvante basado en TLR o un adyuvante basado en aceite mineral. En algunos aspectos, el péptido o polipéptido y el adyuvante basado en TLR se emulsionan con un adyuvante basado en aceite mineral. En algunas realizaciones, el método incluye además la administración de un agente inmunosupresor. Los agentes inmunosupresores incluyen, por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PDI, un anticuerpo anti-PD-LI, un anticuerpo anti-CD25 o un inhibidor de IDO.

15 En la presente memoria también se describe un método para vacunar o tratar un sujeto de cáncer mediante la identificación de una pluralidad de mutaciones específicas de tumor en un gen expresado del sujeto, la identificación de péptidos o polipéptidos mutantes que tienen las mutaciones específicas de tumor identificadas, la selección de uno o más de los péptidos o polipéptidos mutantes identificados que se una a una proteína HLA de clase I, preferiblemente con una afinidad mayor que un péptido natural, y que sea capaz de activar células T CD8 anti-tumorales, y la administración al sujeto de uno o más de los péptidos o polipéptidos seleccionados, o de las células dendríticas autólogas o las células que presentan antígenos pulsadas con uno o más péptidos o polipéptidos identificados. El péptido mutante tiene una longitud de aproximadamente 8-10 aminoácidos. En otro aspecto, tiene una longitud de aproximadamente 8-50 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido mutante tiene una longitud superior a los 10 aminoácidos, superior a los 15 aminoácidos, superior a los 20 aminoácidos, superior a los 30 aminoácidos. Preferiblemente, los péptidos mutantes tienen una longitud de aproximadamente 24-40 aminoácidos.

25 Opcionalmente, el método incluye además la administración de un adyuvante tal como, por ejemplo, un adyuvante basado en TLR o un adyuvante basado en aceite mineral. En algunos aspectos, el péptido o polipéptido y el adyuvante basado en TLR se emulsiona con un adyuvante basado en aceite mineral. En algunas realizaciones, el método incluye además la administración de un agente anti-inmunosupresor. Los agentes anti-inmunosupresores incluyen, por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PDI, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CD25 o un inhibidor de IDO.

En algunos casos, dicho sujeto recibió un trasplante de células madre hematopoyéticas.

35 El sujeto es un humano, un perro, un gato o un caballo. El cáncer es cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de cerebro, melanoma, linfoma, tal como linfoma de células B o leucemia, tal como leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica o leucemia linfocítica de células T.

En la presente memoria también se describen composiciones farmacéuticas que contienen el péptido o el polipéptido identificados según los métodos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Por ejemplo, en la presente memoria se describe una composición que contiene al menos dos péptidos SF3B1 distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a los 50 aminoácidos y contiene una leucina en la posición de aminoácido 625; una histidina en la posición de aminoácido 626; un ácido glutámico en la posición de aminoácido 700; un ácido aspártico en la posición de aminoácido 742; o una arginina en la posición de aminoácido 903; cuando se numeran según el SF3B1 natural.

45 En la presente memoria también se describe una composición que contiene al menos dos péptidos MYD88 distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una treonina en la posición de aminoácido 232; una leucina en la posición de aminoácido 258; o una prolina en la posición de aminoácido 265, cuando se numeran según el MYD88 natural.

50 En la presente memoria también se describe una composición que contiene al menos dos péptidos TP53 distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una arginina en la posición de aminoácido 111; una arginina en la posición de aminoácido 215; una serina en la posición de aminoácido 238; una glutamina en la posición de aminoácido 248; una fenilalanina en la posición de aminoácido 255; una cisteína en la posición de aminoácido 273 ó una asparagina en la posición de aminoácido 281, cuando se numera según el TP53 natural.

55 En la presente memoria también se describe una composición que contiene al menos dos péptidos ATM distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una fenilalanina en la posición de aminoácido 1252; una arginina en la posición de aminoácido 2038; una histidina en la posición de aminoácido 2522; o una cisteína en la posición de aminoácido 2954, cuando se numera según el ATM natural.

5 En la presente memoria también se describe una composición que comprende al menos dos péptidos Abl distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una valina en la posición de aminoácido 244; una valina en la posición de aminoácido 248; un ácido glutámico en la posición de aminoácido 250; una alanina en la posición de aminoácido 250; una histidina en la posición de aminoácido 252; una arginina en la posición de aminoácido 252; una fenilalanina en la posición de aminoácido 253; una histidina en la posición de aminoácido 253; una lisina en la posición de aminoácido 255; una valina en la posición de aminoácido 255; una glicina en la posición de aminoácido 276; una isoleucina en la posición de aminoácido 315; una asparagina en la posición de aminoácido 315; una leucina en la posición de aminoácido 317; una treonina en la posición de aminoácido 343; una treonina en la posición de aminoácido 351; una glicina en la posición de aminoácido 355; una valina en la posición de aminoácido 359; una alanina en la posición de aminoácido 359; una isoleucina en la posición de aminoácido 379; una leucina en la posición de aminoácido 382; una metionina en la posición de aminoácido 387; una prolina en la posición de aminoácido 396; una arginina en la posición de aminoácido 396; una tirosina en la posición de aminoácido 417; o una serina en la posición de aminoácido 486, cuando se numeran según el ABL natural.

15 En la presente memoria también se describe una composición que contiene al menos dos péptidos FBXW7 distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una leucina en la posición de aminoácido 280; una histidina en la posición de aminoácido 465; una cisteína en la posición de aminoácido 505; o un ácido glutámico en la posición de aminoácido 597, cuando se numeran según el FBXW7 natural.

20 En la presente memoria también se describe una composición que contiene al menos dos péptidos MAPK1 distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una asparagina en la posición de aminoácido 162; una glicina en la posición de aminoácido 291; o una fenilalanina en la posición de aminoácido 316; cuando se numeran según el MAPK1 natural.

25 En la presente memoria también se describe una composición que contiene al menos dos péptidos GNB1 distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una treonina en la posición de aminoácido 180, cuando se numera según el GNB1 natural.

En la presente memoria también se describe un método para tratar un sujeto con un tumor resistente a imatinib que comprende administrar a un sujeto positivo en HLA-A3 una composición de péptido Bcr-abl con una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una lisina en la posición de aminoácido 255, cuando se numera según el bcr-abl natural.

30 En la presente memoria también se describe un método para tratar un sujeto con un tumor resistente a imatinib que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos que contengan una mutación bcr-abl, donde el péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y se une a una proteína HLA de clase I con una IC50 inferior a 500 nM.

35 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado utilizado habitualmente por los especialistas en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria a la hora de llevar a la práctica la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente especificación, que incluye definiciones, prevalecerá. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos descritos en la presente memoria son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

40 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las siguientes reivindicaciones, y quedan abarcadas por las mismas.

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1: muestra el equilibrio de especificidad y toxicidad autoinmune usando 3 clases de antígenos para vacunas tumorales. Las células tumorales enteras pueden ser la formulación de antígenos menos específicas para vacunas tumorales, ya que el conjunto completo de antígenos de proteínas expresado en las células tumorales incluye miles de proteínas que también están presentes en otras células del cuerpo. Los antígenos tumorales sobreexpresados son ligeramente más específicos debido a que han sido seleccionados para una expresión mucho mayor y más selectiva en tumores en comparación con otras células del cuerpo. No obstante, es imposible evaluar todas las células del cuerpo para determinar la expresión de dichos antígenos y existe un riesgo sustancial de que otras células los sobreexpresen. Finalmente, las proteínas mutadas generan neoepítomos que están presentes solo en las células tumorales y que proporcionan el mayor nivel de especificidad.

55 Figura 2: es un esquema de una estrategia de vacunación con neoantígenos personalizada que puede aplicarse al tratamiento de cualquier cáncer. También destacamos la posibilidad de aplicar esta estrategia en dos escenarios únicos. En el primer caso, un paciente es vacunado en un periodo temprano tras el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (p.ej., como ocurre en la CLL, la CML y otras leucemias). El periodo post-HSCT temprano es un momento terapéutico único ya que el sistema inmune es competente debido a la reconstitución con HSCT,

superando de este modo los defectos inmunes del hospedante inducidos por el tumor o el tratamiento. Además, la abundancia de citocinas homeostáticas en un entorno de linfopenia, tal como el periodo temprano post-HSCT, puede contribuir a la expansión rápida de células T. En el segundo caso, un paciente es vacunado de forma temprana en el curso de la enfermedad cuando la competencia inmune puede estar más intacta en las etapas tempranas de la enfermedad, antes de sufrir daños por exposición a quimioterapia (p.ej., para tumores sólidos o hematopoyéticos). Puesto que el sistema inmune probablemente es más activo en estas dos situaciones específicas, sugerimos que éstas son las situaciones ideales para aplicar estrategias de vacunación de tumores.

Figura 3: muestra una estrategia para identificar neoepítomos tumorales, que se describe en 3 etapas: (1) usar tecnologías de secuenciamiento, detectar mutaciones genéticas que estén presentes en el tumor pero no en el ADN de línea germinal de un paciente individual; (2) usar algoritmos de predicción, predecir si los péptidos mutados tienen el potencial para unirse a alelo de HLA personal; opcionalmente dichos péptidos predichos pueden ser evaluados experimentalmente para determinar su unión a proteínas HLA apropiadas. Adicionalmente, dichos genes también deben ser expresados en células tumorales; (3) generar células T *ex vivo* y evaluar si son capaces de reconocer células que expresen la proteína mutada; alternativamente, se puede usar espectrometría de masas para detectar péptidos eluidos de las proteínas HLA de la superficie celular. Para la leucemia linfocítica crónica, nuestros estudios hasta la fecha demuestran que hay un promedio de 23 mutaciones de alteración proteica por paciente, 46 péptidos mutantes de unión predichos y 15-25 péptidos mutantes de unión validados. De éstos, nosotros anticipamos que ~7-12 péptidos son expresados y procesados en las células tumorales (aunque esto puede diferir entre los tumores y pacientes).

Figura 4: muestra cinco clases de mutaciones que generan neoepítomos tumorales potenciales. Pueden surgir nuevos epítomos específicos de tumor como resultado de mutaciones puntuales contrasentido, de sitio de división, de cambio estructural o de lectura (asterisco rojo), o a partir de la fusión de dos genes (o dentro del mismo gen). En particular, mutaciones de sitio de división, de cambio estructural, de mutaciones de lectura y de fusiones génicas, pueden generar todas nuevas tiras de aminoácidos (en magenta) que normalmente no son traducidas, pero que ahora se expresan y se traducen como consecuencia de la mutación. Las mutaciones contrasentido conducen a péptidos con cambios individuales de aminoácidos.

Figura 5: muestra la frecuencia de las mutaciones por clase en pacientes de CLL. Nuestros estudios aplicando secuenciamiento de nueva generación a una serie de 7 tumores de CLL revelan que las células de CLL albergan muchas mutaciones, que proporcionan una fuente abundante de posibles péptidos mutados. Se observó que el número total de alteraciones genéticas no silenciosas en la CLL osciló entre 17-155 por individuo, la mayoría de las cuales fueron mutaciones puntuales alteradas somáticamente (contrasentido). Los tumores de 4 pacientes también albergaban mutaciones de sitio de división; para 3 pacientes, se identificaron nuevas fusiones génicas mediante secuenciamiento de ARN.

Figura 6: muestra datos de predicciones automatizadas (Etapa 2A de la estrategia de la Figura 3) de unión de péptidos (para péptidos que albergan una mutación contrasentido específica) contra cada uno de los 6 alelos de HLA (MHC de clase I) de un paciente. Magenta = ligandos fuertes; verde = ligandos intermedios.

Figura 7: muestra métodos para confirmar la expresión de ARN de genes mutados (Etapa 2B de la estrategia de la Figura 3). A. Para el paciente de CLL 7, se observó que más de la mitad de los genes mutados con péptidos de unión a HLA predichos estaban expresados al nivel de ARN. B. También usamos pirosecuenciamiento de ARN para detectar ARNs expresados que albergan mutaciones específicas observadas en ADN. C. Se pueden validar nuevas fusiones génicas observadas mediante secuenciamiento de ADN usando clonación PCR-TOPO de la región del punto de ruptura (se representa una fusión descubierta para el paciente 2).

Figura 8: muestra un método y datos para la validación experimental de la unión de péptido de HLA (Etapa 2C de la estrategia de la Figura 3). A. Esquema de validación experimental de la unión de péptido a alelos de HLA específicos. B. Sumario de péptidos mutados candidatos identificados en los pacientes 1 y 2. Las células sombreadas indican que el análisis está en progreso. C. Datos de predicción vs afinidad de unión verificada experimentalmente de los péptidos generados a partir de alteraciones genéticas (mutación contrasentido o fusión génica) correspondientes al paciente 2. Un valor umbral de predicción de $IC_{50} < 120$ nM (línea continua vertical a la izquierda) da como resultado que todos los péptidos presentan unión experimental a la HLA de clase I.

Figura 9: muestra la unión diferencial predicha de péptidos mutados vs línea germinal (es decir, también denominados progenitores, naturales o normales) a alelos de HLA. 12 de 25 péptidos mutados de unión a HLA predicha del Pt 2 presentan una unión de >2 veces superior (umbral de corte = línea punteada roja) a la de los péptidos progenitores. Esto además aumenta la especificidad de los péptidos mutados. Los péptidos mutados son específicos por dos razones: en primer lugar, muchos de los receptores de células T que reconocen un péptido mutado probablemente no detectan el péptido progenitor natural; en segundo lugar, algunos de los péptidos mutados pueden unirse a HLA con una mayor afinidad que el péptido progenitor. Puesto que la primera propiedad no puede predecirse computacionalmente, nos hemos centrado en predecir la segunda propiedad y realizar una selección para su inclusión en vacunas solo de los péptidos que presenten una mayor unión a HLA en los péptidos mutados respecto a los péptidos naturales.

Figura 10: muestra la reactividad de células T contra un neoepítipo de CLL personal candidato (Etapa 3 de la estrategia de la Figura 3). Se observó que las células T aisladas del paciente 1 tras terapia pueden detectar un péptido TLK2 mutado específico (péptido nº 7) (usando el ensayo Elispot).

Figura 11: muestra que las mutaciones BCR-ABL generan muchos péptidos que se ha predicho que se unen a alelos HLA-A y HLA-B. Aplicando el algoritmo de predicción NetMHC (Nielsen et al. PLoS One. 2007, 2(8):e796), se predijeron los péptidos generados a partir de las mutaciones BCR-ABL con potencial para unirse a 8 alelos HLA-A y -B comunes. Las mutaciones BCR-ABL más comunes se ordenan en frecuencia decreciente (de izquierda a derecha), y se muestran los valores de IC50 predichos para varios péptidos de unión a MHC de clase I. En total, se predijo la unión de 84 péptidos con buena afinidad, definida como una IC50 inferior a 1000, de entre una amplia variedad de alelos de HLA. De todos los péptidos predichos, se predijo que 24 de 84 (29%) son ligandos *fuertes* con una IC50 < 50. 42 péptidos (50%) resultaron ser ligandos intermedios, definidos por una IC50 de entre 50 y 500. 18 péptidos (21%) fueron ligandos débiles, definidos por una IC50 de entre 500 y 1000.

Figura 12: demuestra que el péptido BCR-ABL que alberga la mutación E255K se une a proteínas HLA y se asocia con células T específicas, polifuncionales en pacientes de CML. A. Puntuaciones de unión obtenidas experimentalmente de E255K-B (y el péptido progenitor) a HLA A3 y miembros de supertipo. B. En células T CD8+ expandidas a partir de HLAA3 + E255K + paciente tras HSCT, se detectó secreción de IFNgamma contra el péptido E255K-B (MUT) y APCs que expresan A3+ que expresan el minigen E255K (MG). Esta respuesta fue suprimida en presencia del anticuerpo de bloqueo de clase I (w6/32). C. Las células secretoras de IFN-gamma también fueron tetramer+ para el péptido mutado y fueron polifuncionales (D), secretando IP10, TNFalfa y GM-CSF (en base al ensayo Luminex).

Figura 13: muestra que los clones de células T derivadas de paciente pueden reconocer epítipos específicos de tumor y matar células que presentan dichos epítipos. A. La reactividad respecto al epítipo de células T CD8+ de CML66 (péptido 66-72C) está restringida por HLA B-4403. B. Se puede nucleofectar de manera eficiente ARNm de CML66 en células B expandidas con CD40L. C. Las células T CD8+ específicas de CML66 son citotóxicas para células CD40L que expresan CML66 mediante nucleofección de ARN o mediante pulso de péptido, pero no para las dianas de control.

Figura 14: muestra genes mutados significativamente en CLL. A. Los 9 genes mutados más significativamente de las 64 muestras de CLL. N – territorio cubierto total en pares base a lo largo de 64 muestras secuenciadas. Los valores p y -q se calcularon comparando la probabilidad de ver la constelación observada de mutaciones con las tasas de mutación de fondo calculadas a lo largo de conjunto de datos. Barras rojas – genes no conocidos previamente como mutados en CLL; barras grises – genes en los que se ha reportado previamente una mutación en CLL. B. Tipo (contrasentido, sitio de división, sinsentido) y localización de mutaciones en *ATM*, *SF3B1*, *TP53*, *MYD88*, *FBXW7*, *DDX3X*, *MAPK1* y *GNB1* descubiertas entre los 64 CLLs (la posición y la mutación en las muestras de CLL se muestran encima del gen) en comparación con las mutaciones publicadas previamente en bibliografía o en la base de datos COSMIC (las líneas muestran la posición de las mutaciones debajo del gen).

Figura 15: muestra que el SF3B1 se expresa en muestras de CLL (7ª columna del gráfico) y tiene una mayor expresión que muchas células de control, que incluyen: PBMC, M: monocito; CC: líneas de células de cáncer (que incluyen K562, Jurkat, IM9, MCF-7, Hela, Ovcar, RPMI, OTM, MCF-CAR, KM12BM y MM1S).

Figura 16: permite que las mutaciones SF3B1 generen péptidos que se predice que se unen a alelos de HLA específicos de pacientes. Por ejemplo, se predice que un péptido que incluye la mutación común SF3B1 K700E se une fuertemente a HLA.

Descripción detallada de la invención

Una de las barreras críticas para desarrollar una inmunoterapia curativa y específica de tumor es la identificación y selección de antígenos tumorales altamente restringidos para evitar autoinmunidad. Los neoantígenos tumorales, que surgen como consecuencia de un cambio genético dentro de células malignas, representan la clase de antígenos más específica de tumores. Los neoantígenos apenas han sido usados en vacunas debido a las dificultades técnicas para identificarlos. Nuestra estrategia para identificar neoepítipos específicos de tumor implica tres etapas. (1) identificación de mutaciones de ADN usando genoma completo o exoma completo (es decir, solo los exones capturados) o secuenciamiento de ARN frente a muestras de línea germinal coincidente de cada paciente; (2) aplicación de algoritmos de predicción de unión péptido-MHC validados para generar un conjunto de epítipos de células T candidatos que puedan unirse a los alelos de HLA del paciente, basados en mutaciones no silenciosas presentes en los tumores; y (3) demostración opcional de células T específicas de antígeno frente a péptidos mutados o demostración de que un péptido candidato se une a proteínas de HLA sobre la superficie del tumor.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere a métodos para identificar y/o detectar epítipos de células T de un antígeno. Específicamente, la descripción proporciona un método para identificar y/o detectar neoantígenos específicos de tumor que sean útiles para inducir una respuesta inmune específica de tumor en un sujeto.

En particular, la descripción proporciona un método para vacunar o tratar a un sujeto mediante la identificación de una pluralidad de mutaciones específicas de tumor en el genoma de un sujeto. Se seleccionan los péptidos y polipéptidos mutantes que tengan las mutaciones identificadas y que se unan a una proteína HLA de clase I. Opcionalmente, dichos péptidos y polipéptidos se unen a una proteína HLA de clase I con una afinidad mayor que el péptido natural y/o son capaces de activar células T CD8 antitumorales. Dichos péptidos se administran al sujeto. Alternativamente, se administran células que presentan antígenos autólogos que han sido pulsadas con los péptidos.

La importancia de antígenos mutados, o neoepítomos, en el control inmune de tumores ha sido destacada en estudios seminales que demuestran que: (a) los ratones y los humanos a menudo montan respuestas de células T a antígenos mutados (Parmiani et al., 2007; Sensi y Anichini, 2006); (b) los ratones pueden ser protegidos de un tumor mediante inmunización con un único péptido mutado que esté presente en el tumor (Mandelboim et al., 1995); (c) los supervivientes a largo plazo de melanoma espontáneos o mediados por vacunas montan respuestas de células T citotóxicas (CTL) de memoria fuerte frente a los antígenos mutados (Huang et al., 2004; Lennerz et al., 2005; Zhou et al., 2005a); (d) finalmente, los pacientes de linfoma folicular muestran una remisión molecular cuando se inmunizan con proteínas de inmunoglobulina mutadas específicas de paciente que están presentes en células tumorales autólogas (Baskar et al., 2004). Además, las respuestas de CTL en estos pacientes están dirigidas a las regiones mutadas más que a las regiones compartidas de la proteína de inmunoglobulina. Adicionalmente, dichos péptidos mutados tienen el potencial de: (a) marcar unívocamente un tumor para el reconocimiento y la destrucción por parte del sistema inmune, reduciendo de esta forma el riesgo de autoinmunidad; y (b) evitar la tolerancia de células T periféricas y centrales, permitiendo que el antígeno sea reconocido por receptores de células T más efectivos, de alta avidéz (Figura 1).

Raramente se observan mutaciones idénticas en cualquier gen particular a lo largo de los tumores (y son incluso de baja frecuencia para las mutaciones directoras más comunes). Por lo tanto, los métodos de la presente invención identificarán de forma exhaustiva mutaciones tumorales específicas de paciente. Usando tecnologías de secuenciamiento altamente paralelas, herramientas de predicción de unión HLA-péptido y ensayos bioquímicos, los métodos de la invención permiten: (1) la identificación exhaustiva de péptidos mutados que sean expresados y que se unan a proteínas HLA presentes en un tumor del paciente; (2) la monitorización de la respuesta inmune natural de pacientes de cáncer frente a dichos neoepítomos identificados; (3) la determinación de si las células T citotóxicas reconocen dichos péptidos en el contexto de proteínas HLA del paciente puede lisar de forma selectiva células tumorales autólogas *ex vivo*. Esta estrategia aborda varias cuestiones fundamentales relativas a cómo interactúa el sistema inmune de los pacientes de cáncer con los neoepítomos tumorales. Éstas incluyen: ¿cuál y qué fracción de neoepítomos tumorales son detectados por las células T?, ¿cuántos precursores de células T son capaces de responder a los neoepítomos?, ¿cómo de frecuentes son la memoria específica de neoepítomo y las células T efectoras en circulación y en el tumor?, ¿cuánta avidéz presentan las células T por dichos epítomos?, ¿son funcionales las células T específicas de neoepítomos? Las respuestas a estas cuestiones proporcionan tanto la justificación como la estrategia para usar neoepítomos en vacunas humanas.

El sistema inmune de un humano puede clasificarse en dos subsistemas funcionales, esto es, el sistema inmune innato y el sistema inmune adquirido. El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra infecciones, y la mayoría de los patógenos potenciales son neutralizados rápidamente antes de que puedan causar, por ejemplo, una infección perceptible. El sistema inmune adquirido reacciona frente a estructuras moleculares, denominadas antígenos, del organismo invasor. Existen dos tipos de reacciones inmunes adquiridas, a saber, la reacción inmune humoral y la reacción inmune mediada por células. En la reacción inmune humoral, los anticuerpos secretados por células B a los fluidos corporales se unen a antígenos derivados de patógeno, lo que conduce a la eliminación del patógeno a través de una serie de mecanismos, p.ej., lisis mediada por complemento. En la reacción inmune mediada por células, se activan células T capaces de destruir otras células. Si, por ejemplo, las proteínas asociadas con una enfermedad están presentes en una célula, son fragmentadas, dentro de la célula, proteolíticamente en péptidos. Proteínas celulares específicas se unen entonces al antígeno o péptido formados de esta manera y los transportan a la superficie de la célula, donde son presentados a los mecanismos de defensa molecular, en particular las células T, del cuerpo. Las células T citotóxicas reconocen dichos antígenos y matan a las células que albergan los antígenos.

Las moléculas que transportan y presentan péptidos sobre la superficie celular son denominadas proteínas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC, del inglés "major histocompatibility complex"). Las proteínas MHC se clasifican en proteínas MHC de clase I y de clase II. Las estructuras de las proteínas de las dos clases de MHC son muy similares; sin embargo, difieren de forma bastante considerable en su función. Las proteínas MHC de clase I están presentes sobre la superficie de casi todas las células del cuerpo, incluyendo la mayoría de las células tumorales. Las proteínas MHC de clase I se cargan de antígenos que habitualmente proceden de proteínas endógenas o de patógenos presentes dentro de las células, y a continuación son presentadas a linfocitos-T citotóxicos (CTLs, del inglés "cytotoxic T-lymphocytes"). Las proteínas MHC de clase II solo están presentes sobre células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y otras células presentadoras de antígeno. Principalmente presentan péptidos, que son procesados a partir de fuentes de antígenos externas, es decir, del exterior de las células, en células T colaboradoras (Th, del inglés "T-helper"). La mayoría de los péptidos ligados por las proteínas MHC de clase I proceden de proteínas citoplásmicas producidas en el propio organismo hospedante sano y normalmente no

estimulan una reacción inmune. Por consiguiente, los linfocitos T citotóxicos que reconocen dichas moléculas MHC de auto-presentación de péptido de clase I son eliminados en el timo o, tras su liberación del timo, son eliminados o desactivados, es decir, entrenados ("tolerized"). Las moléculas MHC solo son capaces de estimular una reacción inmune cuando presentan péptidos a linfocitos T citotóxicos no entrenados. Los linfocitos T citotóxicos tienen, en su superficie, tanto receptores de células T (TCR) como moléculas CD8. Los receptores de células T son capaces de reconocer y unirse a péptidos que forman complejos con las moléculas de MHC de clase I. Cada linfocito T citotóxico expresa un único receptor de células T que es capaz de unirse a complejos MHC/péptido específicos.

Los péptidos se unen a las moléculas de MHC de clase I mediante unión de afinidad competitiva dentro del retículo endoplásmico, antes de ser presentadas sobre la superficie celular. Aquí, la afinidad de un péptido individual está ligada directamente a su secuencia de aminoácidos y la presencia de estructuras de unión específicas en posiciones definidas dentro de la secuencia de aminoácidos. Si la secuencia de dicho péptido es conocida, es posible, por ejemplo, manipular el sistema inmune contra células enfermas usando, por ejemplo, vacunas de péptidos.

Empleando algoritmos de ordenador, es posible predecir epítomos de células T potenciales, es decir secuencias de péptidos, que se unen a las moléculas de MHC de clase I o de clase II en la forma de un complejo que presenta péptidos y a continuación, en dicha forma, son reconocidos por los receptores de células T de los linfocitos T. Actualmente, se hace uso en particular de dos programas, el SYFPEITHI (Rammensee et al., Immunogenetics, 50 (1999), 213-219) y el HLA_BIND (Parker et al., J. Immunol., 152 (1994), 163-175). Las secuencias de péptidos determinadas de este modo, que potencialmente pueden unirse a moléculas de MHC de clase I, a continuación deben ser examinadas *in vitro* para determinar su capacidad de unión real.

El objetivo técnico de la presente invención es proporcionar un método mejorado para identificar y realizar un escrutinio de epítomos de células T potenciales presentes en células tumorales, método que permite un examen simultáneo y rápido de un gran número de secuencias de péptidos, para determinar su capacidad de unión a moléculas de MHC específicas.

En la presente invención, el objetivo técnico en el que se basa se alcanza proporcionando un método para identificar y/o detectar antígenos mutantes que están presentes en tumores pero no en tejidos normales. El método usa de forma masiva el secuenciamiento genómico en paralelo de la porción codificadora completa del genoma de un paciente de cáncer para identificar los genes mutados específicos en un tumor. Con el objetivo de reducir el número de péptidos mutantes a aquellos con el potencial de unirse más fuertemente a HLA que los péptidos naturales, y conferir así especificidad de tumor, se usarán algoritmos bien establecidos para predecir péptidos que se unan a cualquiera de los 6 alelos de HLA de clase I únicos de cada paciente y se calculará una IC50 predicha para todos los péptidos de 9 ó 10 unidades con residuos mutantes específicos de tumor frente a aquellos con el residuo de línea germinal. Típicamente, los péptidos con una IC50 predicha < 50 nM se consideran generalmente péptidos de media a alta afinidad de unión y serán seleccionados para evaluar su afinidad empíricamente usando ensayos bioquímicos de unión a HLA. Finalmente, se determinará si el sistema inmune humano puede montar respuestas inmunes efectivas contra dichos antígenos tumorales mutados y de este modo matar de forma efectiva a las células tumorales y no a las células normales.

Definiciones

Un "epítomo de célula T" debe entenderse con el significado de una secuencia de péptidos que puede unirse a moléculas de MHC de clase I o de clase II en la forma de una molécula de MHC que presenta un péptido o de un complejo de MHC, y a continuación, en dicha forma, ser reconocido y unirse a linfocitos T citotóxicos o células T colaboradoras, respectivamente.

Un "receptor" debe entenderse que significa una molécula o grupo de moléculas biológicas capaces de unirse a un ligando. Un receptor puede servir para transmitir información en una célula, una formación de células o un organismo. El receptor comprende al menos una unidad receptora y preferiblemente dos unidades receptoras, donde cada unidad receptora puede consistir en una molécula de proteína, en particular una molécula de glicoproteína. El receptor tiene una estructura que complementa la de un ligando y puede formar complejo con el ligando como pareja de unión. La información se transmite en particular a través de cambios conformacionales del receptor después de la formación del complejo del ligando sobre la superficie de una célula. Según la invención, debe entenderse que un receptor significa en particular proteínas de MHC de las clases I y II capaces de formar un complejo receptor/ligando con un ligando, en particular un péptido o un fragmento de péptido de longitud adecuada.

Un "ligando" debe entenderse que significa una molécula que tiene una estructura complementaria a la del receptor y que es capaz de formar un complejo con dicho receptor. Según la invención, debe entenderse que un ligando es en particular un péptido o un fragmento de péptido que tenga la longitud adecuada y las estructuras de unión adecuadas en su secuencia de aminoácidos, de tal modo que el péptido o fragmento de péptido sea capaz de formar un complejo con proteínas de MHC de clase I o MHC de clase II.

Un "complejo receptor/ligando" también debe entenderse con el significado de un "complejo receptor/péptido" o de un "complejo receptor/fragmento de péptido", en particular una molécula de MHC de clase I o de clase II que presenta un péptido o un fragmento de péptido.

- Las “proteínas o moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC)”, las “moléculas MHC”, las “proteínas de MHC” o las “proteínas de HLA” deben entenderse con el significado, en particular, de proteínas capaces de unirse a péptidos que resultan de la ruptura proteolítica de antígenos proteínicos y que constituyen epítopos de células T potenciales, de transportarlos a la superficie celular y de presentarlos allí a células específicas, en particular a células de linfocitos T citotóxicos o a células T colaboradoras. El complejo de histocompatibilidad principal en el genoma comprende la región genética cuyos productos génicos expresados sobre la superficie celular son importantes para la unión y la presentación de antígenos endógenos y/o extraños, y por tanto para regular los procesos inmunológicos. El complejo de histocompatibilidad principal se clasifica en dos grupos de genes que codifican para proteínas diferentes, a saber moléculas de MHC de clase I y moléculas de MHC de clase II. Las moléculas de las dos clases de MHC están especializadas para diferentes fuentes de antígenos. Las moléculas de MHC de clase I presentan antígenos sintetizados endógenamente, por ejemplo proteínas víricas y antígenos tumorales. Las moléculas de MHC de clase II presentan antígenos proteínicos que proceden de fuentes exógenas, por ejemplo de productos bacterianos. La biología celular y los modelos de expresión de las dos clases de MHC están adaptados a estos diferentes roles.
- 15 Las moléculas de MHC de clase I constan de una cadena pesada y una cadena ligera y son capaces de unirse a un péptido de aproximadamente 8 a 11 aminoácidos, pero normalmente de 9 ó 10 aminoácidos, si dicho péptido tiene las estructuras de unión adecuadas, y de presentarlo a linfocitos T citotóxicos. El péptido unido a las moléculas de MHC de clase I procede de un antígeno proteínico endógeno. La cadena pesada de las moléculas de MHC de clase I preferiblemente es un monómero de HLA-A, HLA-B o HLA-C, y la cadena ligera es β -2-microglobulina.
- 20 Las moléculas de MHC de clase II constan de una cadena α y de una cadena β y son capaces de unirse a un péptido de aproximadamente 15 a 24 aminoácidos si dicho péptido presenta las estructuras de unión adecuadas, y de presentarlo a células T colaboradoras. El péptido unido a las moléculas de MHC de clase II normalmente procede de un antígeno proteínico exógeno extracelular. La cadena α y la cadena β son en particular monómeros HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.
- 25 Una “vacuna” debe entenderse que significa una composición para generar inmunidad para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades. Por consiguiente, las vacunas son medicamentos que comprenden antígenos y que están destinadas a uso en humanos o animales para generar una defensa específica y una sustancia protectora mediante vacunación.
- 30 “Aislado” significa que el polinucleótido o polipéptido o fragmento, variante o derivado del mismo han sido purificados esencialmente de otros materiales biológicos con los que se encuentra asociado de forma natural, o que está esencialmente libre de otros materiales biológicos derivados, p.ej., de una célula hospedante recombinante que ha sido modificada genéticamente para expresar el polipéptido de la invención.
- “Neoantígeno” significa una clase de antígenos tumorales que se activan por mutaciones específicas de tumor en proteínas expresadas.
- 35 “Purificado” significa que el polinucleótido o polipéptido o fragmento, variante o derivado del mismo, está sustancialmente libre de otro material biológico con el cual se encuentra asociado de forma natural, o que está libre de otros materiales biológicos derivados, p.ej., de una célula hospedante recombinante que ha sido modificada genéticamente para expresar el polipéptido. Es decir, p.ej., un polipéptido purificado es un polipéptido que es al menos aproximadamente un 70-100% puro, es decir, el polipéptido está presente en una composición en la que el polipéptido constituye aproximadamente el 70-100% en peso de la composición total. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado es aproximadamente puro al 75%-99% en peso, aproximadamente puro al 80%-99% en peso, aproximadamente puro al 90%-99% en peso, o aproximadamente puro al 95%-99% en peso.

Identificación de mutaciones específicas de tumor

- 45 La presente invención se basa en la identificación de determinadas mutaciones (p.ej., las variantes o alelos que están presentes en las células de cáncer). En particular, estas mutaciones están presentes en el genoma de células de cáncer de un sujeto que tiene cáncer, pero no en el tejido normal del sujeto.

- Las mutaciones genéticas en tumores se considerarían útiles para el ataque inmunológico a tumores si conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína exclusivamente en el tumor. Las mutaciones útiles incluyen: (1) mutaciones no sinónimas que conduzcan a diferentes aminoácidos en la proteína; (2) mutaciones de lectura en las que se modifica o elimina un codón de parada, lo que conduce a la traducción de una proteína más larga con una nueva secuencia específica de tumor en el extremo C; (3) mutaciones de sitio de división que conducen a la inclusión de un intrón en el ARNm maduro y por tanto de una secuencia de proteína específica de tumor única; (4) redistribuciones cromosómicas que dan lugar a una proteína quimérica con secuencias específicas de tumor en la unión de 2 proteínas (es decir, fusión de genes); (5) mutaciones o eliminaciones de cambio estructural que conducen a un nuevo marco de lectura abierto con una nueva secuencia de proteína específica de tumor.

Los péptidos con mutaciones o los polipéptidos mutados que surgen, por ejemplo, de mutaciones de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión de genes en células tumorales pueden identificarse secuenciando ADN, ARN o proteínas en células tumorales en comparación con células normales.

5 También dentro del alcance de la descripción se encuentran los péptidos que incluyen las mutaciones específicas de tumor identificadas previas. Las mutaciones tumorales conocidas pueden encontrarse en <http://www.Sanger.ac.uk/cosmic>.

10 Se dispone de una variedad de métodos para detectar la presencia de una mutación o alelo particular en el ADN ó ARN de un individuo. Los avances en este campo han proporcionado un genotipado de SNP a gran escala preciso, fácil y económico. Por ejemplo, muy recientemente se han descrito varias técnicas nuevas, que incluyen la hibridación específica de alelo dinámica (DASH), la electroforesis de gel diagonal de sistema de microplacas (MADGE), el pirosecuenciamento, la ligación específica de oligonucleótido, el sistema TaqMan, así como varias tecnologías de "chip" de ADN tal como los chips Affymetrix SNP. Estos métodos requieren de la amplificación de la región genética diana, típicamente mediante PCR. Otros métodos recién desarrollados, basados en la generación de moléculas de señal pequeñas mediante ruptura invasiva seguida de espectrometría de masas o en sondas de candado inmovilizadas y amplificación de círculo giratorio, podrían eliminar finalmente la necesidad de PCR. A 15 continuación se resumen varios de los métodos conocidos en la técnica para detectar polimorfismos de nucleótido individual específicos. Se entiende que el método de la presente invención incluye todos los métodos variables.

20 Los medios de detección basados en PCR pueden incluir amplificación múltiple de una pluralidad de marcadores simultáneamente. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica cómo seleccionar cebadores de PCR para generar productos de PCR que no solapen en tamaño y que puedan analizarse simultáneamente.

Alternativamente, es posible amplificar diferentes marcadores con cebadores que estén marcados diferencialmente y que, por tanto, puedan detectarse diferencialmente. Por supuesto, los medios de detección basados en hibridación permiten la detección diferencial de múltiples productos de PCR en una muestra. En la técnica se conocen otras técnicas para permitir el análisis múltiple de una pluralidad de marcadores.

25 Se han desarrollado varios métodos para facilitar el análisis de polimorfismos de nucleótido individual en ADN genómico o en ARN celular. En una realización, el polimorfismo de base individual se puede detectar usando un nucleótido resistente a exonucleasa especializado, tal como se describe, p.ej., en Mundy, C. R. (Patente de EE.UU. nº 4.656.127). Según el método, se permite que un cebador complementario a la secuencia alélica ubicada inmediatamente en posición 3' respecto al sitio polimórfico sea hibridado con una molécula diana obtenida de un animal o humano particular. Si el sitio polimórfico sobre la molécula diana contiene un nucleótido que sea complementario al derivado de nucleótido resistente a exonucleasa particular presente, entonces dicho derivado será incorporado en el extremo del cebador hibridado. Dicha incorporación hace que el cebador se vuelva resistente a la exonucleasa, permitiendo con ello su detección. Puesto que la identidad del derivado resistente a exonucleasa de la muestra es conocida, un descubrimiento de que el cebador se haya vuelto resistente a exonucleasas revela 30 que el nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana era complementario al del derivado de nucleótido usado en la reacción. Este método presenta la ventaja de que no requiere la determinación de grandes cantidades de datos de datos de secuencia superfluos.

40 En otro aspecto descrito en la presente memoria, se usa un método basado en disolución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. Cohen, D. et al. (Patente de Francia 2.650.840; Solicitud PCT nº WO 91/02087). Como en el método de Mundy de la Patente de EE.UU. nº 4.656.127, se emplea un cebador que es complementario a las secuencias alélicas ubicadas inmediatamente en 3' respecto al sitio polimórfico. El método determina la identidad del nucleótido de dicho sitio usando derivados de didesoxinucleótido marcados, que, si son complementarios al nucleótido del sitio polimórfico, se incorporarán al extremo del cebador.

45 Un método alternativo, conocido como Análisis Genetic Bit o GBA® ha sido descrito por Goelet, P. et al. (Solicitud PCT nº 92/15712). El método de Goelet P. et al emplea mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia que se encuentra en posición 3' respecto a un sitio polimórfico. De este modo, el terminador marcado que se incorpora es determinado por el nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana evaluada, y es complementario al mismo. Al contrario que en el método de Cohen et al (Patente de Francia 2.650.840; Solicitud PCT nº WO 91/02087) el método de Goelet P. et al preferiblemente es un ensayo en fase heterogénea, en el que el cebador o la molécula diana son inmovilizados sobre una fase sólida. 50

Recientemente se han descrito varios procedimientos de incorporación de nucleótidos guiada por cebadores para evaluar sitios polimórficos en ADN (Komher, J. S. et al, Nucl. Acids. Res. 17: 7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18: 3671 (1990); Syvanen, A.-C., et al., Genomics 8: 684-692 (1990); Kuppaswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 1143-1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1: 159-164 (1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9: 107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208: 171-175 (1993)). Estos métodos difieren del GBA® en que se basan todos en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para discriminar entre bases en un sitio polimórfico. En dicho formato, puesto que la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en experimentos del mismo nucleótido pueden dar como resultado

señales que son proporcionales a la longitud del experimento (Syvanen, A.-C., et al., Amer. H. Hum. Genet. 52: 46-59 (1993)).

Actualmente está en marcha una serie de iniciativas para obtener información de secuencia directamente de millones de moléculas individuales de ADN o de ARN en paralelo. Las tecnologías de secuenciamiento-por-síntesis de molécula individual en tiempo real se basan en la detección de nucleótidos fluorescentes según se van incorporando a una cadena de ADN incipiente que es complementaria a la plantilla que se esté secuenciando. En un método, se anclan covalentemente oligonucleótidos de 30-50 bases de longitud en el extremo 5' de portaobjetos de vidrio. Dichas cadenas ancladas realizan dos funciones. En primer lugar, actúan como sitios de captura para las cadenas de plantilla de diana si las plantillas se configuran con colas de captura complementarias a los oligonucleótidos ligados a superficie. También actúan como cebadores para la extensión del cebador dirigido por plantilla que conforma la base de la lectura de secuencia. Los cebadores de captura actúan como un sitio de posición fija para la determinación de la secuencia usando múltiples ciclos de síntesis, detección y ruptura química del colorante-ligando para eliminar el colorante. Cada ciclo consiste en añadir la mezcla de nucleótidos marcados/polimerasa, lavar, obtener imágenes y provocar la separación por ruptura del colorante. En un método alternativo, la polimerasa se modifica con una molécula donante fluorescente y se inmoviliza sobre un porta de vidrio, mientras que cada nucleótido es codificado mediante colores con un resto fluorescente aceptor unido a un gamma-fosfato. El sistema detecta la interacción entre una polimerasa marcada fluorescentemente y un nucleótido modificado fluorescentemente según el nucleótido se va incorporando en la cadena en crecimiento. También existen otras tecnologías de secuenciamiento-por-síntesis.

Preferiblemente, se puede usar cualquier plataforma de secuenciamiento-por-síntesis para identificar mutaciones. Tal como se ha descrito antes, actualmente hay disponibles cuatro plataformas de secuenciamiento-por-síntesis principales: los Secuenciadores Genómicos de Roche/454 Life Sciences, el Analizador 1G de Illumina/Solexa, el sistema SOLiD de Applied BioSystems, y el sistema Heliscope de Helicos Biosciences. Las plataformas de secuenciamiento-por-síntesis también han sido descritas por Pacific BioSciences y VisiGen Biotechnologies. Todas estas plataformas pueden usarse en los métodos de la invención. En algunas realizaciones, una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que estén siendo secuenciadas se une a un soporte (p.ej., un soporte sólido). Para inmovilizar el ácido nucleico sobre un soporte, se puede añadir un sitio de imprimación universal/de secuencia de captura en el extremo 3' y/o 5' de la plantilla. Los ácidos nucleicos pueden ligarse al soporte mediante hibridación de la secuencia de captura con una secuencia complementaria unida covalentemente al soporte. La secuencia de captura (también denominada secuencia de captura universal) es una secuencia de ácido nucleico complementaria a una secuencia unida a un soporte que puede actuar dualmente como cebador universal.

Como alternativa a una secuencia de captura, se puede ligar un miembro de un par de acoplamiento (tal como, p.ej., anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, o el par avidina-biotina tal como se describe, p.ej., en la Solicitud de Patente de EE.UU. n° 2006/0252077) a todos los fragmentos que van a ser capturados sobre una superficie recubierta con un segundo miembro respectivo de dicho par de acoplamiento.

Después de la captura, la secuencia se puede analizar, por ejemplo, mediante secuenciamiento/detección de moléculas individuales, p.ej., como se describe en los Ejemplos y la Patente de EE.UU. n° 7.283.337, incluyendo el secuenciamiento-por-síntesis dependiente de plantilla. En el secuenciamiento-por-síntesis, la molécula ligada a la superficie es expuesta a una pluralidad de trifosfatos de nucleótido marcados en presencia de polimerasa. La secuencia de la plantilla se determina por el orden de nucleótidos marcados incorporados en el extremo 3' de la cadena en crecimiento. Esto se puede realizar en tiempo real o se puede realizar en un modo de paso-y-repetición. Para el análisis en tiempo real, se pueden incorporar diferentes etiquetas ópticas a cada nucleótido y se pueden utilizar múltiples láseres para la estimulación de los nucleótidos incorporados.

Se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido para obtener muestras de ácido nucleico para su uso en el diagnóstico descrito en la presente invención. En una realización preferida, la muestra de ADN ó ARN se obtiene de un tumor o de un fluido corporal, p.ej., sangre, obtenida mediante técnicas conocidas (p.ej., venipunción) o saliva. Alternativamente, se pueden llevar a cabo tests de ácido nucleico sobre muestras secas (p.ej., pelo o piel).

Alternativamente, se puede usar espectrometría de masas de proteínas para identificar o validar la presencia de péptidos mutados unidos a proteínas MHC sobre células tumorales. Los péptidos pueden ser eluidos mediante ácido desde las células tumorales o desde moléculas de HLA que son inmunoprecipitadas desde el tumor, y a continuación pueden ser identificados usando espectrometría de masas.

Péptidos neoantigénicos

La descripción incluye además péptidos aislados que comprenden las mutaciones específicas de tumor identificadas por los métodos de la invención, péptidos que comprenden mutaciones específicas de tumor conocidas, y polipéptidos mutantes o fragmentos de los mismos identificados mediante el método de la invención. Estos péptidos y polipéptidos se denominan en la presente memoria "péptidos neoantigénicos" o "polipéptidos neoantigénicos". El término "péptido" se usa de forma intercambiable con el de "péptido mutante" y el de "péptido neoantigénico" en la presente especificación para designar una serie de residuos, típicamente aminoácidos L, conectados unos a otros, típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. De forma

similar, el término “polipéptido” se usa de forma intercambiable con el de “polipéptido mutante” y el de “polipéptido neoantigénico” en la presente especificación para designar una serie de residuos, típicamente aminoácidos L, conectados unos a otros, típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. Los polipéptidos o péptidos pueden tener una variedad de longitudes, tanto en sus formas neutras (sin carga) como en sus formas de sal, y tanto libres de modificaciones tales como glicosilación, oxidación de cadena lateral o fosforilación, como conteniendo dichas modificaciones, sujetos a la condición de que la modificación no destruya la actividad biológica de los polipéptidos tal como se describe en la presente memoria.

En determinadas realizaciones el tamaño de la al menos una molécula de péptido neoantigénico puede comprender, aunque sin limitación, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 31, aproximadamente 32, aproximadamente 33, aproximadamente 34, aproximadamente 35, aproximadamente 36, aproximadamente 37, aproximadamente 38, aproximadamente 39, aproximadamente 40, aproximadamente 41, aproximadamente 42, aproximadamente 43, aproximadamente 44, aproximadamente 45, aproximadamente 46, aproximadamente 47, aproximadamente 48, aproximadamente 49, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 110, aproximadamente 120 ó más residuos de aminoácido, y cualquier rango derivable de los mismos. En realizaciones específicas, las moléculas de péptidos neoantigénicos tienen una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos.

En algunas realizaciones, los péptidos y polipéptidos neoantigénicos particulares son: para MHC de clase I de 13 residuos o menos de longitud y normalmente constan de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 11 residuos, particularmente 9 ó 10 residuos; para MHC de clase II, 15-24 residuos.

Se puede diseñar un péptido más largo de varios modos. En un caso, cuando se predicen o conocen los péptidos de unión a HLA, un péptido de mayor longitud podría constar de: (1) péptidos de unión individual con una extensión de 2-5 aminoácidos hacia el extremo N y C de cada producto génico correspondiente; (2) una concatenación de algunos o todos los péptidos de unión con secuencias extendidas para cada uno. En otro caso, cuando el secuenciamiento revela una secuencia de neoepítipo larga (>10 residuos) presente en el tumor (p.ej., debido a un cambio estructural, una mutación de lectura o una inclusión de intrón que conduce a una nueva secuencia de péptido), un péptido de mayor longitud consistiría en: (3) la tira completa de nuevos aminoácidos específicos de tumor –superando de este modo la necesidad de usar predicción computacional o ensayos in vitro de unión de péptidos a proteínas HLA. En ambos casos, el uso de un péptido de mayor longitud permite el procesamiento endógeno por parte de células del paciente y puede conducir a una presentación de antígenos más efectiva y a una inducción de respuestas de células T más efectiva.

Los péptidos y polipéptidos neoantigénicos se unen a una proteína HLA. En algún aspecto, los péptidos y polipéptidos neoantigénicos se unen a una proteína HLA con mayor afinidad que un péptido natural. El péptido o polipéptido neoantigénico tiene una IC50 como mucho de 5000 nM, como mucho de 500 nM, como mucho de 250 nM, como mucho de 200 nM, como mucho de 150 nM, como mucho de 100 nM, como mucho de 50 nM o menos.

Los péptidos y polipéptidos neoantigénicos no inducen una respuesta autoinmune y/o invocan una tolerancia inmunológica cuando se administran a un sujeto.

En la presente memoria también se describen composiciones que comprenden al menos dos o más péptidos neoantigénicos. En algunas realizaciones la composición contiene al menos dos péptidos distintos. Preferiblemente, los al menos dos péptidos distintos se derivan del mismo polipéptido. Por polipéptidos distintos se pretende indicar que el péptido puede variar en longitud, secuencia de aminoácidos o ambos. Los péptidos derivan de cualquier polipéptido del cual se sepa, o que se haya descubierto mediante los métodos de la invención, que contiene una mutación específica de tumor. Los polipéptidos adecuados a partir de los cuales se pueden derivar los péptidos neoantigénicos pueden encontrarse, por ejemplo, en la base de datos COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/cosmic>). COSMIC proporciona información exhaustiva sobre mutaciones somáticas en cánceres humanos. El péptido contiene la mutación específica de tumor. En algunos aspectos, la mutación específica de tumor es una mutación directora para un tipo de cáncer particular. En algunos aspectos, los péptidos derivan de un polipéptido SF3B1, un polipéptido MYD88, un polipéptido TP53, un polipéptido ATM, un polipéptido Ab1, un polipéptido FBXW7, un polipéptido DDX3X, un polipéptido MAPK1 o un polipéptido GNB1.

Con un péptido SF3B1 se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido SF3B1. Preferiblemente, un péptido SF3B1 incluye una leucina en la posición de aminoácido 625; una histidina en la posición de aminoácido 626; un ácido glutámico en la posición de aminoácido 700; un ácido aspártico en la posición de aminoácido 742; o una arginina en la posición de aminoácido 903, cuando se numeran según el SF3B1 natural. En la Tabla A se muestra un SF3B1 natural (SEQ ID NO: 1).

Tabla A: SF3B1 natural (SEQ ID NO: 1)

makiakthediaeqireiqgkkaaldeaqgvgldestgyydqeiyyggsdsr
 fagyvtsiaateledddddysstsllgqkkpgyhapvallndipqsteg
 ydpfaehrppkiadredeykhrrtmiisperldpfadgktpdpkmnar
 tymdvmreqhltkeereirqqlaekakagelkvvngaaasqppskrkrww
 dqtadqtpgatpkkllsswdqaetpghpslrwdetpgrakgsetpgatpg
 skiwdptpshtpagaatpgrgdtpghatpghggatssarknrwdetpkte
 rdtppghgsgwaetprtdrggdsigetptpgaskrksrwdetpasqmggst
 pvltppgktpigtpamnmatptpghimsmtpeqlqawrwereidernrpls
 deeldamfpegykvlppppagyvpirtparkltatptplggmtgfhmqted
 rtmksvndqpsgnlpflkpdidiqyfdkllvdvdestlspreeqkerkimkl
 llkikngtppmrkaalrqitdkarefgagplfnqilpllmsptledqerh
 llvkvidrilyklddlvrpyvhkilvviepllidedyarvegreiisnl
 akaaglatmismrpdidnmdeyvrrnttarafavvasalgipsllpflka
 vckskkswqarhtgikivqqaialmgcailphlrslveiiehgldveqqk
 vrtisalaaialaeaatpygiesfsvlklpwkgirqhrqgkglaaflkai
 gyliplmdaeyanyytrevmlilirefqspeemkkivlkvvkqccgtdg
 veanyikteilppffkhfwqhrmaldrrnyrqlvdtvelankvgaaeii
 srivddlkdeaeqyrkmvmetiekimgnlgaadidhkleeqldigilyaf
 qeqttedsvmlngfgtgvnalgkrvkpylpqicgtvlwrlnksakvrqq
 aadlisrtavvmktcqeeklmghlgvlyeylgeeypevlgsilgalkai
 vnvigmhkmtppikdllprltpilknrhekvqencidlvriadrgaeyv
 sarewmricfellellkakkairratvntfgyiakaigphdvlatlenn
 lkvqerqnrvttaivaiaetcpftvlpalmneyrvpelnvqngvlks
 lsflfeyigemgkdyiyavtpledalmdrdlvhrqtasavvqhmslgvy
 gfgcedslnhllnyvwpnvfetsphviqavmgaleglrvaigpcrmlqyc
 lqglfhparkvrdivykwkiynsiyigsqdaliahypriynddkntyiryel
 dyil

5 Con un péptido MYD88 se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido MYD88. Preferiblemente, un péptido MYD88 incluye una treonina en la posición de aminoácido 232; una leucina en la posición de aminoácido 258; o una prolina en la posición de aminoácido 265, cuando se numeran según el MYD88 natural. En la Tabla B se muestra un MYD88 natural (SEQ ID NO: 2).

Tabla B: MYD88 natural (SEQ ID NO: 2)

mrpdraeapggppamaagppgagsaapvsstsslplaalnrvrrrlslfl
 nvrtqvaadwtalaeemdfeyleirqltqadptgrlldawqgrpgasvg
 rlllelltklgrddvlllelgpsieedcqkyilkqqqeeaeakplqvaavdss
 vprtaelagittladdplghmperfdaficycpsdiqfvqemirqleqtny
 rklcvsdrdvlpgtcvwsiaseliekrccrmvsvvssddylqskecdfqt
 kfalslspgahqkrlipikykamkkefpsiilrfitvcdytnpctkswfw
 rlakalslp

10 Con un péptido TP53 se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido TP53. Preferiblemente, un péptido TP53 incluye una arginina en la posición de aminoácido 111; una arginina en la posición de aminoácido 215; una serina en la posición de aminoácido 238; una glutamina en la posición de aminoácido 248; una fenilalanina en la posición de aminoácido 255; una cisteína en la posición de aminoácido 273; o una asparagina en la posición de aminoácido 281, cuando se numeran según el TP53 natural. En la Tabla C se muestra un TP53 natural (SEQ ID NO: 3).

Tabla C: TP53 natural (SEQ ID NO: 3)

```
meepqsdpvepplsgetfsdlwklpennvlsplpsqamddlmlspddi
eqwftedpgpdeaprmpeaappvapapaaptaapapapswplsssvpsq
ktyqgsygfrlglhsgtaksvtctyspalnkmfclaktcpvqlwvdst
pppgtrvramaiykqsqhmtevvrrcphhercsdsdglappqhlirvegn
lrveylddrntfrhsvvvpyeppevgdcttihynymcnsscmggnrrp
iltiitledssgnllgrnsfevrvcacpgrdrteeenlrkkgephhelp
pgstkralpnntssspqpkkkpldgyftlqirgrerfemfrelnealel
kdaqagkepggsrahsshkkskkgqstsrhkklmfktegpdsd
```

5 Con un péptido ATM se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido ATM. Preferiblemente, un péptido ATM incluye una fenilalanina en la posición de aminoácido 1252; una arginina en la posición de aminoácido 2038; una histidina en la posición de aminoácido 2522; o una cisteína en la posición de aminoácido 2954, cuando se numeran según el ATM natural. En la Tabla D se muestra un ATM natural (SEQ ID NO: 4).

Tabla D: ATM natural (SEQ ID NO: 4)

```
msslvlndllliccrqlehydraterkkevekfkrlirdpetikhldrhsdsk
qgkylndavfrflqkyiqketeclriakpnvsastqasrqkkmqeissl
vkyfikcanrraprllkqcellnyimdtvkdssngaiygadcsnillkdil
svrkywceisqqwlelfsvyfrlylkpsqdvhrvlvariihavtkgccs
qtdglnskfldffskaiqcarqeksssglnhilaaltiflktlavnfrir
vcelgdeilptllyiwtqhrlnslkeviiefqlqiyihhpkgaktqek
gayestkwrsllynlydllvneishigsrgkyssgfrniavkenlielma
```

dichqvfndtrsleisqsytttqressdysvpckrkkiekgwevikdhl
qksqndfdlvpwlqiatqliskypaslpncelspllmilsqllpqgrhge
rtpyvrlrcftevalcqdkrnslessqksdllklwnkiwcitfrgisseqi
qaenfgllgaiiqgslvevdrefwklftgsacrpscpavccltlalttisi
vpgtvkmgieqnmcevnrfsflkesimkwllfyqlegdlenstevppilh
snfphlvlekilvsltmknckaamffqsvpecehhqkdkeelsfsevee
lflqttfdkmdfltivrecgiekhqssigfsvhqnlkesldrcllglseq
llnnyssseitnsetlvrcsrllvgvlgcycymgviaeeeayksselfqkak
slmqcagesitlfnkntneefrigslrnmmlctrclsntckkspnkias
gfflrlltsklmndiadicks lasfikppfdrgevesmeddtngnlmeve
dqssmnlfnndypdssvsdanepgesqstigainplaeeylskqdllfldm
lkflclcvttaqntvsvfraadirrklmlidsstleptkslhlhmylml
lkelpgeeyplpmedvlellkplsnvcslyrrdqdvcktilnhvlhvkn
lgqsnmdsentrdagqgfltvigafwhltkerkyifsvrmalvncclktll
eadpyskwailnvmgkdfpvnevftqfladnhhqvrmlaeesinrlfadt
kgdssrllkalplklqqtafenaylkaqegmremshsaenpetldeiynr
ksvlltliavvlscspicekqalfalcksvkenglephlvkkvlekvset
fgyrrledfmashldylvlewlnlqdtteynlssfpfillnytniedfys
cykvliphlvirshfdevksianqiqedwkslltdcfpkilvnilyfay
egtrdsgmaqqretatkvydmlksenllgkqidhlfisnlpeivvellmt
lhepanssasqstdlcfsglddpapnpphfpshvikatfayisnchktk
ksileilskspdsyqkilllaiceqaaetnnyvkkhrilkiyhlfvslll
kdiksglggawafvlrdviytlhyinqrpscimdvsrlsflccdllsq
vcqtavtyckdalenhlhvivgtliplvyeqvevqkqvldllkylvidnk
dnenlyitiklldpfpdhvfkdlritqqkikysrgpfsllleeinhflsv
svydalpltrleglkdrrqllelhkdqmdimrasqdnppdgimvklvn
llqlskmainhtgekevleavgsclgevgpidfstiaiqhskdasytka
klfedkelqwtfimltylnntlvedcvkvrsvaavtclknilatktghsfw
eiykmttdpmlaylqppfrtsrkkflevprfdkenpfeglddinlwiplse
nhdiwiktltcafldsggtkceilqllkpmcevktdfcqtvlpylihdil
lqdtneswrnllsthvqgfftsclrhfsqtsrsttpanldsesehffrcc
ldkksqrtmlavvdymrrqkrpssgtifndafwldlnylevakvaqsc
hftallyaeiyadkksmddqekrslafeegsqsttisslsekskeetgis
lqdllleiyrsigepdslygcggkmlqpitrlyeheamwgkalvtyd
letaipsstrqagiiqalqnlglchilsvylkgldyenkdwcpeleelhy
qaawrnmqwdhctsvskevegtsyheslynalqslrdrefstfyeslkya
rvkeveemckrslesvyslyptlsrlqaigelesigelfsrsvthrqlse
vyikwqkhsqllkdsdfsfgqepimalrtvileilmekemdnsqrecikdi
ltkhlvelsilartfkntqlperaihqikqynsvscgvsewqleaaqvfw
akkeqslalsilkqmikkldascaannpslklyteclrvcgwlaetcl
enpavimqstylekavevagnydgessdelrngkmkafslslarfsdtqyqr
ienymkssefenkqallkrakeevgllrehkiqtnrytvkvqreleldel
alralkedrkrflckavenyincllsgeehdmwvfrlclslwlensgvsev
ngmmkrdgmkiptykflplmyqlaarmgkmmgglgfhevlennlisrism
dphhhtlfiilalanardefltpkpevarrsritknvqkssqldedrte
aanriictirsrrpqrsvrsvealcdayiilanldatqwktrkginipad
qpitklknledvvvptmeikvdhtgeygnlvtiqsfkaefrllaggvnlpk
iidcvqsdqkerrqlvkqrddlrqdamqqvfmqcntllqrntetrkrkl

tictykvvplsqrsgvlewctgtvpigeflvnnedgahkryrpndfsafq
 cqkkmnevqkksfeekyevfmdvcqnfqpvfryfcmekfldpawfekrl
 aytrsvatssivgyilglgdrhvqnilineqsaelvhidlgvafeggkil
 ptpetvpfrlrltrdivdgmgitgvegvrcccektmevmrnsqetlltive
 vllydplfdwtmnpkalyllqqrpedetelhpnladdqeckrnlstdidq
 sfnkvaervlmrlqeklkqveegtvlsvggqvnliliqqaidpknlsrlfp
 gwkawv

5 Con un péptido Abl se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido Abl. Preferiblemente,
 un péptido Bcr-abl incluye una valina en la posición de aminoácido 244; una valina en la posición de aminoácido
 248; un ácido glutámico en la posición de aminoácido 250; una alanina en la posición de aminoácido 250; una
 10 histidina en la posición de aminoácido 252; una arginina en la posición de aminoácido 252; una fenilalanina en la
 posición de aminoácido 253; una histidina en la posición de aminoácido 253; una lisina en la posición de aminoácido
 255; una valina en la posición de aminoácido 255; una glicina en la posición de aminoácido 276; una isoleucina en la
 posición de aminoácido 315; una asparagina en la posición de aminoácido 315; una leucina en la posición de
 aminoácido 317; una treonina en la posición de aminoácido 343; una treonina en la posición de aminoácido 351; una
 15 glicina en la posición de aminoácido 355; una valina en la posición de aminoácido 359; una alanina en la posición de
 aminoácido 359; una isoleucina en la posición de aminoácido 379; una leucina en la posición de aminoácido 382;
 una metionina en la posición de aminoácido 387; una prolina en la posición de aminoácido 396; una arginina en la
 posición de aminoácido 396; una tirosina en la posición de aminoácido 417; o una serina en la posición de
 aminoácido 486, cuando se numeran según el Abl natural. En la Tabla E se muestra un Abl natural (SEQ ID NO: 5).

Tabla E: Abl natural (SEQ ID NO: 5)

MLEICLKLVGCKSKKGLSSSSSCYLEEALQRPVASFEPQGLSEARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALY
 DFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGWPVSNYITPVNSLEKHSWYHGPPVSRNAEYL
 LSSGINGSFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSSERFNTLAELVHHHSTVADGLI
 TTLHYAPKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDI TMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEV
 EEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVLLYMATQISSA
 MEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFESIKS
 DVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPDRPSFAEIH
 QAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVAVSTLLQAPLPTKTRTSRRAAEHRDITDVPMPHSGKQGESD
 PLDHEPAVSPLLPRKERGPPEGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPER
 RGAGEEEGRDISNGALFTPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLWKKSSTLTSSRLAT
 GEEGGGSSSKRFLRSCSASCVPHGAKDTEWRSVTLPRDLQSTGRQFDSSTFGGHKSEKPALPRKRAGEN
 RSDQVTRGTVTPPRLVKKNEEADEVFKDIMESSPGSSPPNLTpkplrrqvtvapasglphkeeagkgs
 ALGTPAAAEVPTPTSKAGSGAPGGTSGKPAEESRVRHKHSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKA
 GGKPSQSPSQEAAGEAVLGAKTKATSLVDAVNSDAKPSQPGEGLKPKVLPATPKPQSAKPSGTPISPAP
 VPSTLPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGAIITKGVVLDSTEALCLAI SRNSEQM
 ASHAVLEAGKNLYTFCVSYVDSIQQMRNKFAFREAINKLENNLRELQICPATAGSGPAATQDFSKLLSS
 VKEISDIVQR

15 Con un péptido FBXW7 se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido FBXW7.
 Preferiblemente, un péptido FBXW7 incluye una leucina en la posición de aminoácido 280; una histidina en la
 posición de aminoácido 465; una cisteína en la posición de aminoácido 505; o un ácido glutámico en la posición de
 20 aminoácido 597, cuando se numeran según el FBXW7 natural. En la Tabla F se muestra un FBXW7 natural (SEQ ID
 NO: 6).

Tabla F: FBXW7 natural (SEQ ID NO: 6)

mnqellsvgskrrrrtggsrlrgnpsssqvdeeqmnrsvveeeqqqqlrqee
 ehtarngevgvveprpggqndsqqggleennrnfisvdedssgnqeeqee
 deehageqdeedeeeeeemdqesddfdqsddssredehthtntsvtnssiv
 dlpvhlqsspfytkttkmkrkldhgsevrfsfslgkpkckvseytsttglv
 pcsatpttfgdlraangggqrrritsvqpptglqewlkmfqswwgpekl
 laldelidsceptqvkhhmqviepqrdfisllpkelalyvlsflepkd
 llqaaqtcrywrlaednllwrekckeegideplhikrrkvikpgfihsp
 wksayirqhridtnwrrgelkspkvlkghddhvitclqfcgnrivsgsdd
 ntlkvwsavtgkclrtlvghtggvwssqmrndniisgstdrtlkvwnaet
 gecihtlyghtstvrclmhlhekrvsvgsrdatlrvwdietgqclhvlmg
 vaavrcvqydgrvvsgaydfmvkvwdepetetcclhtlqghtnrsvslqfd
 gihvsvgsldtsirvwdvetgncihtltghqsltsgmelkdnilvsgnad
 stvkiwdiktgqclqtlqgpnkhqsavtclqfnkfnvitssddgtvklwd
 lktgefirnltvlesggsggvvwrirasntklvcavgsrngteetkllvl
 dfdvdmk

5 Con un péptido DDX3X se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido DDX3X. Un péptido DDX3X es un péptido que resultado de una mutación sinsentido en la posición de aminoácido 24; una mutación de sitio de división en la posición de aminoácido 342 o una mutación de cambio estructural en la posición de aminoácido 410, cuando se numeran según el DDX3X natural. En la Tabla G se muestra un DDX3X natural (SEQ ID NO: 7).

Tabla F: DDX3X natural (SEQ ID NO: 7)

mshvavenalgldqqfagldlnssdnqsggstaskgryipphlrnreatk
 gfydkdssgwssskdkdayssfgsrdsrgkssffsdrsgsgrgrfddrg
 rsdydgigsrgrdrsgfgkferggnsrwccksdeddwsklppserleqel
 fsgngtginfekyddipveatgnncpphiesfsdvemgeiimgnieltry
 trptpvqkhaipiikekrdlmacaqtgsgktaafllpilsqiysdgpgea
 lramkengrygrrkqypislvlaptrelavqiyeearkfsyrsvrvcv
 yggadigqqirdlergchllvatpgrlvdmmgkigldfckylvldead
 rmldmgfepqirriveqdtmppkgvrhtmmfsatfpkeiqmlardfldey
 iflavgrvgstsenitqkvvwveesdkrsflldllnatgkdsltlvfvet
 kkgadslcdflyhegyactsihgdrsqrdreealhqfrsgkspilvatav
 aargldisnvkhvinfdlpsdieeyvhrigrtgrvgnlglatssfnerni
 nitkdllldllveakqevpswlenmayehhykgssrgrskssrfsggfgar
 dyrqssgassssfsrassrsrgggghgssrgfgggyggfyngsdgygg
 nynsqgvdwwgn

10 Con un péptido MAPK1 se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido MAPK1. Preferiblemente, un péptido MAPK1 incluye una asparagina en la posición de aminoácido 162; una glicina en la posición de aminoácido 291; o una fenilalanina en la posición de aminoácido 316, cuando se numeran según el MAPK1 natural. En la Tabla H se muestra un MAPK1 natural (SEQ ID NO: 8).

15

Tabla F: MAPK1 natural (SEQ ID NO: 8)

```

maaaaaagagpemvrgqvfdvgrpnytnlsyigegaygmvcsaydnvnkvr
vaikkispehqtqyrcrtlreikillrfrheniigindiiraptieqmkd
vyivqdlmetdlykllktqhlndhicyflyqilrglkyihsanvlhrdl
kpsnlllnttcdlkicdfglarvadpdhdhtgflteyvatrwyrapeiml
nsgkytksidiwsvgcilaemlsnrpifpgkhyldqlnhilgilgspsqe
dlnciinlkarnyllslphknkvpwnrlfnpadskaldlldkmltfnphk
rieveqalahpyleqyydpsdepiaaeapfkfdmelledlpkeklkelifee
tarfqpgyrs

```

Con un péptido GNB1 se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido GNB1. Preferiblemente, un péptido GNB1 incluye una treonina en la posición de aminoácido 180, cuando se numera según el GNB1 natural. En la Tabla I se muestra un GNB1 natural (SEQ ID NO: 9).

Tabla I: GNB1 natural (SEQ ID NO: 9)

```

mseldqlrqaeeqlknqirdarkacadatlsqitnnidpvgriqmtrtrrt
lrghlakiyamhwgtdsrllvsasqdgklliwdsyttknvhaiplrswv
mtcayapsgnyvacgldnicsiynlktregnvrvsrelaghtgylsccr
flddnqivtssgdtcalwdietgqqtftgthgdvmslslapdtrlfv
sgacdasaklwdvregmcrqftghesdinaicffpngnafatgsddatc
rlfdlradqelmtyshdniicgitsvsfsksgrlllagyddfnvwdal
kdragvlaghdnrvsclgvtddgmavatgswdsflkiwn

```

5

Los péptidos y polipéptidos neoantigénicos que tienen la actividad deseada pueden modificarse según sea necesario para proporcionar determinados atributos deseados, p.ej., características farmacológicas mejoradas, a la vez que se incrementa o al menos se mantiene sustancialmente toda la actividad biológica del péptido sin modificar para unirse a la molécula de MHC deseada y activar la célula T apropiada. Por ejemplo, el péptido y polipéptidos neoantigénicos pueden ser sometidos a diversos cambios, tales como sustituciones, tanto conservativas como no conservativas, donde dichos cambios pueden proporcionar determinadas ventajas en su uso, tal como una unión a MHC mejorada. Por sustituciones conservativas se entiende reemplazar un residuo de aminoácido por otro que sea biológicamente y/o químicamente similar, p.ej., un residuo hidrofóbico por otro, un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. El efecto de sustituciones de aminoácidos individuales también puede sondearse usando aminoácidos D. Dichas modificaciones pueden realizarse usando procedimientos sintéticos de péptidos bien conocidos, tal como se describe, p.ej., en Merrifield, *Science* 232: 341-347 (1986), Barany & Merrifield, *The Peptides*, Gross & Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pág. 1-284 (1979); y Stewart & Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Rockford, Ill., Pierce), 2^a Ed. (1984).

10

15

20

25

El péptido y polipéptidos neoantigénicos también pueden modificarse extendiendo o recortando la secuencia de aminoácidos del compuesto, p.ej., mediante la adición o la eliminación de aminoácidos. Los péptidos, polipéptidos o análogos también pueden modificarse alterando el orden o la composición de determinados residuos, apreciándose fácilmente que determinados residuos de aminoácido esenciales para la actividad biológica, p.ej., aquellos que se encuentran en posiciones críticas o que son residuos conservados, generalmente no pueden ser alterados sin producir un efecto adverso sobre la actividad biológica. Los aminoácidos no críticos no necesitan limitarse a los que existen de forma natural en proteínas, tales como los L- α -aminoácidos, o sus D-isómeros, sino que pueden incluir también aminoácidos no naturales, tales como los β - γ - δ -aminoácidos, así como muchos derivados de los L- α -aminoácidos.

30

35

Típicamente, se emplean una serie de péptidos con una única sustitución de aminoácido para determinar el efecto de la carga electrostática, la hidrofobicidad, etc. sobre la unión. Por ejemplo, se realizan una serie de sustituciones de aminoácidos cargados positivamente (p.ej., Lys o Arg) o cargados negativamente (p.ej., Glu) a lo largo de la longitud del péptido, revelando diferentes modelos de sensibilidad respecto a diversas moléculas de MHC y receptores de células T. Adicionalmente, se pueden emplear sustituciones múltiples empleando restos pequeños, relativamente neutros, tales como Ala, Gly, Pro o residuos similares. Las sustituciones pueden ser homo-oligómeros o hetero-oligómeros. El número y tipo de residuos que son sustituidos o añadidos depende del espaciado necesario entre puntos de contacto esenciales y los determinados atributos funcionales que se buscan (p.ej., hidrofobicidad frente a hidrofiliidad). Un aumento de afinidad de unión por una molécula de MHC o receptor de célula T también se

puede lograr mediante dichas sustituciones, con respecto a la afinidad del péptido progenitor. En cualquier evento, dichas sustituciones deberían emplear residuos de aminoácido u otros fragmentos moleculares elegidos para evitar, por ejemplo, interferencias estéricas o de carga que podrían afectar negativamente a la unión.

- 5 Las sustituciones de aminoácidos típicamente son de residuos individuales. Las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquiera de sus combinaciones pueden combinarse para llegar a un péptido final. Las variantes sustitucionales son aquellas en las que al menos un residuo de un péptido ha sido eliminado y un residuo diferente se ha insertado en su lugar. Dichas sustituciones generalmente se realizan de acuerdo a la siguiente Tabla, cuando se desea modular finamente las características del péptido.

Residuo Original	Ejemplo de sustitución
Ala	Ser
Arg	Lys, His
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Lys; Arg
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; His
Met	Leu; Ile
Phe	Tyr; Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu
Pro	Gly

- 10 Los cambios sustanciales en la función (p.ej., afinidad por moléculas de MHC o receptores de células T) se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las presentadas en la anterior Tabla, es decir, seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del péptido en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el tamaño de la cadena lateral. Las
- 15 sustituciones que en general es de esperar que produzcan los mayores cambios en las propiedades de los péptidos serán aquellas en las que (a) un residuo hidrofílico, p.ej., serilo, es sustituido por un residuo hidrofóbico, p.ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) un residuo que tenga una cadena lateral electropositiva, p.ej., lisilo, arginilo o histidilo, es sustituido por un residuo electronegativo, p.ej., glutamilo o aspartilo; o (c) un residuo que tenga una cadena lateral voluminosa, p.ej., fenilalanina, se sustituye por uno que no tenga una cadena lateral, p.ej., glicina.
- 20 Los péptidos y polipéptidos también pueden comprender isosteros de dos o más residuos en el péptido o polipéptido neoantigénico. Un isostero, tal como se define en la presente memoria, es una secuencia de dos o más residuos que puede ser sustituida por una segunda secuencia debido a que la conformación estérica de la primera secuencia encaja con un sitio de unión específico para la segunda secuencia. El término incluye específicamente modificaciones de la cadena principal del péptido bien conocidas por los especialistas en la técnica. Dichas

modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno de la amida, del carbono α , del carbonilo de la amida, el reemplazamiento completo del enlace de amida, extensiones, eliminaciones o reticulaciones de la cadena principal. Véase, de forma general, Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. VII (Weinstein ed., 1983).

- 5 Las modificaciones de péptidos y polipéptidos con diversos miméticos de aminoácidos o aminoácidos no naturales son particularmente útiles para aumentar la estabilidad del péptido y el polipéptido *in vivo*. La estabilidad se puede evaluar de varias formas. Por ejemplo, para evaluar la estabilidad se han usado peptidasas y diversos medios biológicos, tales como plasma y suero humanos. Véase, p.ej., Verhoef et al., *Eur. J. Drug Metab Pharmacokin.* 11: 291-302 (1986). La vida media de los péptidos de la invención se determina de forma conveniente usando un ensayo en suero humano al 25% (v/v). De forma general, el protocolo es como se indica a continuación. Se diluye el suero humano agrupado (Tipo AB, no desactivado térmicamente) mediante centrifugación antes de su uso. A continuación el suero se diluye hasta el 25% en medio de cultivo de tejidos RPMI y se usa para determinar la estabilidad de los péptidos. A intervalos de tiempo predeterminados se retira una pequeña cantidad de la disolución de reacción y se añade a ácido tricloroacético al 6% en agua o a etanol. La muestra de reacción turbia se enfría (4°C) durante 15 minutos y después se gira para obtener una partícula de las proteínas de suero precipitadas. La presencia de los péptidos se determina mediante HPLC de fase inversa usando unas condiciones cromatográficas específicas para estabilidad.

20 Los péptidos y polipéptidos pueden modificarse para proporcionar atributos deseados diferentes a la vida media en suero. Por ejemplo, la capacidad de los péptidos para inducir actividad CTL puede potenciarse mediante enlace a una secuencia que contenga al menos un epítipo que sea capaz de inducir una respuesta de célula T colaboradora. Los conjugados péptido inmunogénico/colaborador T particularmente preferidos se unen a través de una molécula espaciadora. El espaciador típicamente consiste en una molécula neutra relativamente pequeña, tal como aminoácidos o miméticos de aminoácidos, que están sustancialmente descargados en condiciones fisiológicas. Los espaciadores típicamente se seleccionan entre, p.ej., Ala, Gly u otros espaciadores neutros de aminoácidos no polares o aminoácidos polares neutros. Cabe destacar que el espaciador presente opcionalmente no necesita estar formado por los mismos residuos, y por tanto puede ser un hetero-oligómero o un homo-oligómero. Cuando está presente, el espaciador normalmente tendrá al menos uno o dos residuos, más habitualmente de tres a seis residuos. Alternativamente, el péptido puede ligarse al péptido colaborador T sin un espaciador.

30 El péptido neoantigénico puede unirse al péptido colaborador T tanto directamente como a través de un espaciador en el extremo amino o en el extremo carboxi del péptido. Los extremos amino tanto del péptido neoantigénico como del péptido colaborador T pueden estar acilados. Los ejemplos de péptidos colaboradores T incluyen toxoide del tétano 830-843, gripe 307-319, malaria circumsporozoito 382-398 y 378-389.

35 Las proteínas o péptidos se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida por los especialistas en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, el aislamiento de proteínas o péptidos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de proteínas o péptidos. En el pasado se han descrito secuencias de nucleótidos y proteínas, de polipéptidos y péptidos correspondientes a diversos genes, y se pueden encontrar en bases de datos de ordenador conocidas por los especialistas en la técnica. Unas de dichas bases de datos son las bases de datos *National Center for Biotechnology Information's Genbank* y *GenPept* ubicadas en la página web de Instituciones Sanitarias Nacionales. Las regiones codificadoras para genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas descritas en la presente memoria o las conocidas por los especialistas en la técnica. Alternativamente, los especialistas en la técnica conocen diversas preparaciones comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos.

45 En un aspecto adicional, la descripción proporciona un ácido nucleico (p.ej., polinucleótido) que codifica un péptido neoantigénico. El polinucleótido puede ser, p.ej., ADN, ADNc, PNA, CNA, ARN, tanto de cadena sencilla como de cadena doble, o las formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, tales como, p.ej., polinucleótidos con una cadena principal fosforilada, o combinaciones de los mismos, y puede contener o no intrones siempre que codifique para el péptido. Por supuesto, solo los péptidos que contengan residuos de aminoácido que existan de forma natural, unidos mediante enlaces peptídicos naturales, son codificables por un polinucleótido. Un aspecto adicional de la descripción proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido descrito en la presente memoria. Los vectores de expresión para diferentes tipos celulares son bien conocidos en la técnica y pueden seleccionarse sin experimentación indebida. De forma general, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN se puede ligar a las secuencias de nucleótidos de control regulador transcripcional y traduccional reconocidas por el hospedante deseado, aunque dichos controles generalmente están disponibles en el vector de expresión. A continuación el vector se introduce en el hospedante a través de técnicas estándar. Se puede encontrar una guía, p.ej., en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Composiciones de vacuna

60 También se describen en la presente memoria una composición inmunogénica, p.ej., una composición de vacuna capaz de activar una respuesta de células T específica. La composición de vacuna comprende péptidos mutantes y

polipéptidos mutantes correspondientes a los neoantígenos específicos de tumor identificados mediante los métodos descritos en la presente memoria.

5 Una persona especialista en la técnica será capaz de seleccionar los péptidos, polipéptidos o combinación de los mismos, preferidos a través de la evaluación, por ejemplo, de la generación de células T in vitro, así como de su eficacia y presencia global, la proliferación, afinidad y expansión de determinadas células T para determinados péptidos, y la funcionalidad de las células T, p.ej., analizando la producción de IFN- γ o la tasa de muerte tumoral por acción de células T. Normalmente, los péptidos más efectivos se combinan a continuación en una vacuna.

10 Una vacuna adecuada contiene preferiblemente entre 1 y 20 péptidos, más preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 péptidos diferentes, aún más preferiblemente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 péptidos diferentes, y lo más preferiblemente 12, 13 ó 14 péptidos diferentes.

15 En un aspecto descrito en la presente memoria, se seleccionan los diferentes péptidos y/o polipéptidos de tal modo que una composición de vacuna comprende péptidos y/o polipéptidos capaces de asociarse con diferentes moléculas de MHC, tal como diferentes moléculas de MHC de clase I. Preferiblemente, una composición de vacuna comprende péptidos y/o polipéptidos capaces de asociarse con las moléculas de MHC de clase I más frecuentes. Por tanto, las composiciones de vacuna comprenden diferentes fragmentos capaces de asociarse con al menos 2 moléculas de MHC de clase I preferidas, más preferiblemente con al menos 3 moléculas de MHC de clase I preferidas, incluso más preferiblemente con al menos 4 moléculas de MHC de clase I preferidas.

La composición de vacuna es capaz de activar una respuesta de células T citotóxicas específicas y/o una respuesta de células T colaboradoras específicas.

20 La composición de vacuna puede comprender además un adyuvante y/o un vehículo. Los ejemplos de adyuvantes y vehículos útiles se muestra a continuación en la presente memoria. Los péptidos y/o polipéptidos de la composición se pueden asociar con un vehículo tal como, p.ej., una proteína o una célula presentadora de antígeno tal como, p.ej., una célula dendrítica (DC) capaz de presentar el péptido a una célula T.

25 Los adyuvantes son cualquier sustancia cuya mezcla en la composición de la vacuna aumente, o modifique de cualquier otro modo, la respuesta inmune al péptido mutante. Los vehículos son estructuras de andamio, por ejemplo, un polipéptido o un polisacárido, a las que los péptidos neoantigénicos son capaces de asociarse. Opcionalmente, los adyuvantes se conjugan covalentemente o no covalentemente a los péptidos o polipéptidos descritos en la presente memoria.

30 La capacidad de un adyuvante para aumentar la respuesta inmune a un antígeno se manifiesta típicamente a través de un incremento de la reacción inmuno-mediada, o de la reducción en los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, un aumento de la inmunidad humoral se manifiesta típicamente a través de un incremento significativo del título de anticuerpos elevados contra el antígeno, y un aumento de la actividad de células T se manifiesta típicamente a través de un aumento de la proliferación celular, o de la citotoxicidad celular o de la secreción de citocinas. Un adyuvante también puede alterar una respuesta inmune, por ejemplo, cambiando una respuesta primaria humoral o una respuesta Th en una respuesta celular primaria, o respuesta Th.

35 Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, lmuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA 51V, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema vector PepTel.RTM., micropartículas PLG, resiquimod, SRL172, Virosomas y otras partículas de tipo virus, YF-17D, trampa VEGF, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, Mass., EE.UU.) que deriva de saponina, extractos micobacterianos y mímicos de pared celular bacteriana sintéticos, y otros adyuvantes registrados tales como Ribi's Detox. Quil o Superfos. Los adyuvantes tales como Freund incompleto o GM-CSF son los preferidos. En el pasado se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p.ej., MF59) específicos de células dendríticas y su preparación (Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186 (1): 18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92: 3-11). También se pueden usar citocinas. Varias citocinas han sido relacionadas directamente con una influencia en la migración de células dendríticas a tejidos linfoides (p.ej., TNF- α), acelerando la maduración de células dendríticas en células presentadoras de antígeno eficientes para linfocitos T. (p.ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. n° 5.849.589), y actuando como inmunoadyuvantes (p.ej., IL-12) (Gabrilovich D I, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6): 414-418).

55 También se ha publicado que los oligonucleótidos inmunoestimulantes CpG potencian los efectos de los adyuvantes en un preparado de vacuna. Sin pretender establecer ninguna teoría, los oligonucleótidos CpG actúan activando el sistema inmune innato (no adaptativo) a través de receptores de tipo Toll (TLR), principalmente TLR9. La activación de TLR9 activada por CpG potencia las respuestas humoral y celular específicas de antígeno para una amplia variedad de antígenos, que incluyen antígenos de péptido o proteína, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares autólogas y conjugados de polisacáridos tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. De forma más importante, potencia la maduración y diferenciación de células dendríticas, dando como resultado un incremento de la activación de células TH1 y una fuerte generación de linfocitos T citotóxicos (CTL),

5 incluso en ausencia de células T colaboradoras CD4. La tendencia TH1 inducida por estimulación de TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes de vacuna tales como alumbre o adyuvante incompleto de Freund (IFA) que normalmente promueven una tendencia TH2. Los oligonucleótidos CpG muestran una actividad de adyuvante incluso mayor cuando se formulan o se co-administran con otros adyuvantes o en formulaciones tales como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, lo cual es especialmente necesario para inducir una respuesta fuerte cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmune y permiten reducir la dosis de antígenos en aproximadamente dos órdenes de magnitud, con respuestas de anticuerpos comparables a la vacuna de dosis completa sin CpG en algunos experimentos (Arthur M. Krieg, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, Junio de 2006, 471-484). La Patente de EE.UU. nº 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos CpG, de adyuvantes no de ácido nucleico y un antígeno para inducir una respuesta inmune específica de antígeno. Un antagonista de CpG TLR9 disponible comercialmente es el dSLIM ("double Stem Loop Immunomodulator") de Mologen (Berlín, Alemania), que es un componente preferido de la composición farmacéutica. También se pueden usar otras moléculas de unión TLR tales como TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9, de unión a ARN.

15 Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen, aunque sin limitación, CpGs modificados químicamente (p.ej., CpR, Idera), Poly(I:C) (p.ej., polyi:CI2U), ADN o ARN bacteriano no de CpG, así como moléculas pequeñas inmunorreactivas y anticuerpos tales como ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafinib, XL-999, CP-547632, pazopanib, ZD2171, AZD2171, ipilimumab, tremelimumab y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por el especialista en la técnica sin una experimentación excesiva. Adyuvantes adicionales incluyen factores estimulantes de colonia, tales como el Factor Estimulante de Colonia de Macrófagos (GM-CSF, sargramostim).

20 Una composición de vacuna puede comprender más de un adyuvante diferente. Además, la descripción abarca una composición terapéutica que comprende cualquier sustancia adyuvante que incluya cualquiera de las anteriores, o combinaciones de las mismas. También se contempla que el péptido o polipéptido y el adyuvante se administren separadamente en cualquier secuencia apropiada.

Independientemente del adyuvante puede haber presente un vehículo. La función de un vehículo puede ser, por ejemplo, incrementar el peso molecular de un mutante particular a fin de aumentar su actividad o inmunogenicidad, para conferir estabilidad, para aumentar la actividad biológica, o para aumentar la vida media en suero. Adicionalmente, un vehículo puede ayudar a presentar péptidos a las células T. El vehículo puede ser cualquier vehículo adecuado conocido por los especialistas en la técnica, por ejemplo, una proteína o una célula que presenta antígenos. La proteína vehículo podría ser, aunque sin limitación, hemocianina de lapa de ojo de cerradura, proteínas de suero tales como transferrina, albúmina de suero bovina, albúmina de suero humana, tiroglobulina u ovoalbúmina, inmunoglobulinas u hormonas, tales como insulina o ácido palmítico. Para la inmunización de humanos, el vehículo debe ser un vehículo fisiológicamente aceptable para humanos y debe ser seguro. Sin embargo, el toxoide tetánico y/o el toxoide de la difteria son vehículos adecuados en una realización de la invención. Alternativamente, el vehículo pueden ser dextranos, por ejemplo, sepharose.

30 Las células T citotóxicas (CTLs) reconocen un antígeno en la forma de un péptido ligado a una molécula de MHC más que al propio antígeno extraño intacto. La molécula de MHC se encuentra sobre la superficie celular de una célula que presenta antígeno. Por tanto, la activación de las CTLs solo es posible si hay presente un complejo trimérico de antígeno peptídico, molécula de MHC y APC. En la misma medida, puede potenciar la respuesta inmune si para la activación de CTLs no se usa solo el péptido, sino si adicionalmente se añaden APCs con la molécula de MHC respectiva. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición de vacuna adicionalmente contiene al menos una célula presentadora de antígeno.

45 La célula presentadora de antígeno (o célula estimulante) típicamente tiene una molécula de MHC de clase I o de clase II en su superficie, y en una realización es sustancialmente incapaz de cargar por sí misma la molécula de MHC de clase I o de clase II con el antígeno seleccionado. Tal como se describe con más detalle a continuación, la molécula de MHC de clase I o de clase II puede cargarse fácilmente con el antígeno seleccionado *in vitro*.

50 Preferiblemente, las células presentadoras de antígenos son células dendríticas. De forma adecuada, las células dendríticas son células dendríticas autólogas que son pulsadas con el péptido neoantigénico. El péptido puede ser cualquier péptido adecuado que dé lugar a una respuesta de células T apropiada. La terapia de células T que emplea células dendríticas pulsadas con péptidos procedentes de un antígeno asociado a tumor se describe en Murphy et al. (1996) The Prostate 29, 371-380 y Tjua et al. (1997) The Prostate 32, 272-278.

55 Por tanto, en un aspecto descrito en la presente memoria, la composición de vacuna que contiene al menos una célula presentadora de antígenos es pulsada o cargada con uno o más de los péptidos descritos en la presente memoria. Alternativamente, se pueden cargar *ex vivo* con péptidos células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs), aisladas de un paciente, y ser inyectadas de vuelta al paciente.

Como alternativa, la célula presentadora de antígenos comprende una construcción de expresión que codifica un péptido de la presente invención. El polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido adecuado y es preferible que

sea capaz de transducir la célula dendrítica, dando como resultado de este modo la presentación de un péptido y la inducción de inmunidad.

Métodos terapéuticos

5 La descripción proporciona además un método para inducir una respuesta inmune específica de tumor en un sujeto, vacunar contra un tumor, tratar y o aliviar un síntoma de cáncer en un sujeto mediante la administración al sujeto de un péptido neoantigénico o una composición de vacuna.

10 El sujeto ha sido diagnosticado con cáncer o corre riesgo de desarrollar un cáncer. El sujeto tiene un tumor resistente a imatinib. El sujeto es un humano, pero, gato, caballo o cualquier animal en el que se desee una respuesta inmune específica de tumor. El tumor es cualquier tumor sólido tal como tumor de mama, de ovario, de próstata, de pulmón, de riñón, gástrico, de colon, testicular, de cabeza y cuello, de páncreas, de cerebro, melanoma, y otros tumores de órganos tisulares y tumores hematológicos, tales como linfomas y leucemias, que incluyen la leucemia mielógena aguda, la leucemia mielógena crónica, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia linfocítica de células T y los linfomas de células B.

15 El péptido o composición de la invención se administra en una cantidad suficiente para inducir una respuesta de CTL.

20 En aspectos específicos, la descripción proporciona métodos de tratamiento de un tumor resistente a imatinib mediante la administración a un sujeto de uno o más péptido neoantigénicos que contienen una mutación bcr-abl. En algunas realizaciones, el sujeto es HLA-A3. Las mutaciones bcr-abl incluyen, por ejemplo, T315I, E255K, M351T, Y253H, Q252H, F317L, F359V, G250E, Y253F, E355G, E255V, M244V, L248V, G250A, Q252R, D276G, T315N, M343T, F359A, V379I, F382L, L387M, H396P, H396R, S417Y, F486S.

25 El péptido neoantigénico, polipéptido o composición de vacuno se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes terapéuticos. El agente terapéutico, por ejemplo, es un agente quimioterapéutico, radiación o inmunoterapia. Se puede administrar cualquier tratamiento terapéutico adecuado para un cáncer particular. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque sin limitación, aldesleuquina, altretamina, amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisapride, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbacina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol, epoetina alfa, etoposide, filgrastim, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, granisetron, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa, irinotecán, lansoprazol, levamisol, leucovorina, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramida, mitomicina, mitotane, mitoxantrona, omeprazol, ondansetron, paclitaxel (Taxol®), pilocarpina, procloroperazina, rituximab, tamoxifeno, taxol, hidrociluro de topotecán, trastuzumab, vinblastina, vincristina y tartrato de vinorelbina. Para el tratamiento de cáncer de próstata, un agente quimioterapéutico preferido con el que se puede combinar anti-CTLA-4 es el paclitaxel (Taxol®).

35 Adicionalmente, al sujeto se le puede administrar un agente anti-inmunosupresor/inmunoestimulante. Por ejemplo, al sujeto se le administra adicionalmente un anticuerpo anti-CTLA o un anti-PD-1 o anti-PD-L1. El bloqueo de CTLA-4 o PD-L1 mediante anticuerpos puede potenciar la respuesta inmune a células cancerosas en el paciente. En particular, el bloqueo de CTLA-4 se ha mostrado efectivo tras un protocolo de vacunación.

40 La cantidad óptima de cada péptido a incluir en la composición de vacuna y el régimen óptimo de dosis pueden ser determinados por los especialistas en la técnica sin una experimentación innecesaria. Por ejemplo, el péptido o su variante se pueden preparar para inyección intravenosa (i.v.), inyección subcutánea (s.c.), inyección intradérmica (i.d.), inyección intraperitoneal (i.p.), inyección intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos de inyección de péptidos incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos de inyección de ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Por ejemplo, se pueden administrar dosis de entre 1 y 500 mg, de entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg, de péptido o ADN y dependerá de los respectivos péptidos o ADNs. Las dosis en este intervalo se han usado con éxito en ensayos previos (Brunsvig P F, et al., Cancer Immunol Immunother. 2006; 55 (12): 1553-1564; M. Staehler, et al., reunión ASCO de 2007; resumen nº 3017). Los especialistas en la técnica conocen otros métodos de administración de la composición de vacuna.

50 La composición farmacéutica de la invención puede compilarse de tal modo que la selección, el número y/o la cantidad de péptidos presentes en la composición sean específicos de tejido, de cáncer y/o de paciente. Por ejemplo, la selección exacta de péptidos puede seguir la guía de los modelos de expresión de las proteínas progenitoras en un tejido dado para evitar efectos secundarios. La selección puede ser dependiente del tipo específico de cáncer, del estatus de la enfermedad, de regímenes de tratamiento previos, del estatus inmune del paciente, y, por supuesto, del haplotipo HLA del paciente. Adicionalmente, la vacuna puede contener componentes individualizados, según las necesidades personales del paciente concreto. Los ejemplos incluyen variar las cantidades de péptidos según la expresión del neoantígeno relacionado en el paciente concreto, efectos secundarios no deseados debido a alergias personales u otros tratamientos, y ajustes de tratamientos secundarios después de una primera ronda del esquema de tratamiento.

55

5 Para que una composición sea usada como vacuna contra el cáncer, los péptidos cuyas proteínas progenitoras endógenas se expresan en grandes cantidades en los tejidos normales se evitarán o estarán presentes en cantidades pequeñas en la composición de la invención. Por otro lado, si se sabe que el tumor de un paciente expresa cantidades elevadas de una determinada proteína, la respectiva composición farmacéutica para el tratamiento de dicho cáncer puede estar presente en grandes cantidades y/o se puede incluir más de un péptido específico para dicha proteína particular o para un mecanismo de dicha proteína particular.

10 Las composiciones farmacéuticas que comprenden el péptido se pueden administrar a un individuo que ya padece un cáncer. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta de CTL efectiva al antígeno tumoral, y para curar o al menos reducir parcialmente los síntomas y/o complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán, p.ej., de la composición del péptido, del modo de administración, del estadio y gravedad de la enfermedad que esté siendo tratada, del peso y del estado general de salud del paciente, y del juicio del médico que prescribe, pero generalmente oscilarán para la inmunización inicial (es decir, para la administración terapéutica o profiláctica) entre aproximadamente 1,0 µg y 15 aproximadamente 50.000 µg de péptido para un paciente de 70 kg, seguido de dosis de recuerdo, o entre aproximadamente 1,0 µg y aproximadamente 10.000 µg de péptido seguido de un régimen de recuerdo a lo largo de semanas o meses dependiendo de la respuesta y la condición del paciente, determinadas midiendo la actividad específica de CTL en la sangre del paciente. Debe tenerse en cuenta que el péptido y las composiciones de la presente invención generalmente pueden emplearse en estados de enfermedad graves, es decir, que amenacen la vida o en situaciones que potencialmente amenacen la vida, especialmente cuando el cáncer se ha metastatizado. 20 En tales casos, teniendo en cuenta la minimización de sustancias extrañas y la naturaleza relativamente no tóxica del péptido, es posible, y puede ser deseable por parte del médico que esté al cargo del tratamiento, administrar excesos sustanciales de dichas composiciones de péptidos.

25 Para uso terapéutico, la administración debería comenzar con la detección o la eliminación quirúrgica de tumores. Ésta irá seguida de dosis de recuerdo al menos hasta que los síntomas hayan remitido y durante un periodo de tiempo después de eso.

30 Las composiciones farmacéuticas (p.ej., composiciones de vacuna) para el tratamiento terapéutico están destinadas a administración parenteral, tópica, nasal, oral o local. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, p.ej., intravenosamente, subcutáneamente, intradérmicamente o intramuscularmente. Las composiciones pueden administrarse en el sitio de la escisión quirúrgica para inducir una respuesta inmune al tumor. La invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden una disolución de los péptidos y las composiciones de vacuna se disuelven o suspenden en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, p.ej., agua, agua tamponada, salino al 0,9%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y otros similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse mediante filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o pueden liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tal como agentes de ajuste de pH o tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y otros similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. 40

45 La concentración de péptidos en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,1% normalmente hasta al menos aproximadamente 2%, y como mucho hasta entre 20% y 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo al modo particular de administración seleccionado.

50 El péptido también puede administrarse vía liposomas, que dirigen los péptidos a un tejido celular particular, tal como el tejido linfóide. Los liposomas también son útiles para aumentar la vida media de los péptidos. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y otros similares. En estas preparaciones, el péptido a administrar se incorpora como parte de un liposoma, solo o en combinación con una molécula que se une, p.ej., a un receptor prevalente entre las células linfoides, tal como anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. Por tanto, los liposomas rellenos con un péptido deseado pueden dirigirse al sitio de las células linfoides, donde los liposomas liberan a continuación las composiciones de péptidos terapéuticos/inmunogénicos seleccionados. Los liposomas para uso en el método se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándares, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos generalmente viene guiada por la consideración, p.ej., del tamaño del liposoma, la estabilidad y labilidad en ácido de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se dispone de una variedad de métodos para preparar liposomas, tal como se describe, p.ej., en Szoka et al. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9; 467 (1980), Patentes de EE.UU. nº 4.235.871, 4.501.728, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369. 55

60 Para atacar a las células inmunes, un ligando que vaya a ser incorporado al liposoma puede incluir, p.ej., anticuerpos, o fragmentos de los mismos, específicos para determinantes de la superficie celular de las células del

sistema inmune deseadas. Una suspensión de liposomas que contenga un péptido puede administrarse intravenosamente, localmente, tópicamente, etc., en una dosis que varía según, entre otros, el modo de administración, el péptido que se esté administrando, y el estadio de la enfermedad que esté siendo tratada.

5 Para las composiciones sólidas, se pueden usar vehículos sólidos no tóxicos convencionales o de nanopartículas, que incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y otros similares. Para administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como los vehículos enumerados previamente, y generalmente un 10-95% de ingrediente activo, es decir, uno o más péptidos de la invención, y más preferiblemente a una concentración de 25%-10 75%.

15 Para la administración como aerosol, los péptidos inmunogénicos se suministran preferiblemente en una forma finamente dividida junto a un tensioactivo y un propelente. Los porcentajes típicos de péptido son del 0,01%-20% en peso, preferiblemente del 1%-10%. El tensioactivo, por supuesto, debe ser no tóxico, y preferiblemente soluble en el propelente. Los ejemplos representativos de dichos agentes son los ésteres o los ésteres parciales de ácidos grasos que contienen entre 6 y 22 átomos de carbono, tal como de ácido caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linoléico, olestérico y oleico, con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir un 0,1%-20% en peso de la composición, preferiblemente un 0,25%-5%. El balance de la composición normalmente es el propelente. También se puede incluir un vehículo según se desee, tal como, p.ej., lecitina para administración intranasal.

20 Con fines terapéuticos o de inmunización, los ácidos nucleicos que codifican el péptido y opcionalmente uno o más de los péptidos descritos en la presente memoria también se pueden administrar al paciente. De forma conveniente se usan una serie de métodos para administrar los ácidos nucleicos al paciente. Por ejemplo, el ácido nucleico puede administrarse directamente, como "ADN desnudo". Esta estrategia se describe, por ejemplo, en Wolff et al., Science 247: 1465-1468 (1990) así como en las Patentes de EE.UU. nº 5.580.859 y 5.589.466. Los ácidos nucleicos también pueden administrarse usando una administración balística tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 5.204.253. Se pueden administrar partículas que solo consten de ADN. Alternativamente, el ADN se puede adherir a partículas, tales como partículas de oro.

30 Los ácidos nucleicos también se pueden administrar como complejos con compuestos catiónicos, tales como lípidos catiónicos. Los métodos de administración génica mediados por lípidos se describen, por ejemplo, en los documentos 9618372WOA, WO 96/18372; 9324640 WOA, WO 93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6 (7): 682-691 (1988); 5279833 USA Rose, la Patente de EE.UU. nº 5.279.833; 9106309 WOA, WO 91/06309; y en Feigner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414 (1987).

35 Los péptidos y polipéptidos también pueden expresarse a través de hospedantes víricos atenuados, tales como virus vacuna o virus de la varicela. Esta estrategia implica el uso de virus vacuna como vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican el péptido. Tras introducción en un hospedante infectado de forma aguda o crónica o en un hospedante no infectado, el virus vacuna recombinante expresa el péptido inmunogénico, y con ello provoca una respuesta de CTL en el hospedante. Los vectores vacuna y los métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen, p.ej., en la Patente de EE.UU. nº 4.722.848. Otro vector es el BCG (bacilo Calmette Guerin). Los vectores BCG se describen en Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991)). Una amplia variedad de vectores adicionales útiles para la administración terapéutica o la inmunización de los péptidos, p.ej., vectores de *Salmonella typhi* y otros similares, serán evidentes para el especialista en la técnica a partir de la descripción presentada en la presente memoria.

45 Un medio preferido de administración de ácidos nucleicos que codifican el péptido de la invención usa construcciones de minigén que codifican epítomos múltiples. Para crear una secuencia de ADN que codifique los epítomos de CTL seleccionados (minigén) para la expresión en células humanas, las secuencias de aminoácido de los epítomos son traducidos a la inversa. Se emplea una tabla de uso de codones humanos para guiar la selección de codón para cada aminoácido. Estas secuencias de ADN que codifican epítomo se unen directamente, creando una secuencia de polipéptido continua. Para optimizar la expresión y/o la inmunogenicidad, se pueden incorporar elementos adicionales en el diseño del minigén. Los ejemplos de secuencias de aminoácido que podrían traducirse a la inversa e incluirse en la secuencia de minigén incluyen: linfocito T colaborador, epítomos, una secuencia líder (señal), y una señal de retención de retículo endoplásmico. Adicionalmente, la presentación a MHC de epítomos de CTL puede mejorarse incluyendo secuencias flanqueantes sintéticas (p.ej., de poli-alanina) o naturales adyacentes a los epítomos de CTL.

55 La secuencia de minigén se convierte en ADN ensamblando los oligonucleótidos que codifican las cadenas más y menos del minigén. Se sintetizan oligonucleótidos solapados (con una longitud de 30-100 bases), se fosforilan, se purifican y se maduran en las condiciones apropiadas usando técnicas bien conocidas. Los extremos de los nucleótidos se unen usando ligasa de ADN T4. Dicho minigén sintético, que codifica el polipéptido de epítomo de CTL, puede clonarse a continuación en un vector de expresión deseado.

En el vector se incluyen secuencias reguladoras estándar bien conocidas por los especialistas en la técnica para asegurar la expresión en las células diana. Se requieren varios elementos de vector: un promotor con un sitio de clonación aguas abajo para la inserción de minigén; una señal de poliadenilación para la terminación eficiente de la transcripción; un origen de replicación de *E. coli*; y un marcador seleccionable de *E. coli* (p.ej., resistencia a ampicilina o a canamicina). Se pueden usar numerosos promotores para este fin, p.ej., el promotor de citomegalovirus humano (hCMV). Véanse las Patentes de EE.UU. n° 5.580.859 y 5.589.466 para otras secuencias de promotor adecuadas.

Pueden ser deseables modificaciones adicionales de vector para optimizar la expresión y la inmunogenicidad del minigén. En algunos casos, se requieren intrones para una expresión génica eficiente, y se podría incorporar uno o más intrones sintéticos o naturales a la región transcrita del minigén. La inclusión de secuencias de estabilización de ARNm también puede considerarse para aumentar la expresión de minigén. Recientemente se ha propuesto que las secuencias inmunoestimuladoras (ISSs o CpGs) desempeñan un papel en la inmunogenicidad de las vacunas de ADN. Dichas secuencias podrían incluirse en el vector, fuera de la secuencia de codificación del minigén, si se observa que potencian la inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, se puede usar un vector de expresión bicistrónico, para permitir la producción de los epítomos codificados por el minigén y una segunda proteína incluida para potenciar o disminuir la inmunogenicidad. Los ejemplos de proteínas o polipéptidos que podrían potenciar de forma beneficiosa la respuesta inmune si se co-expresan incluyen citocinas (p.ej., IL2, IL12, GM-CSF), moléculas inductoras de citocinas (p.ej., LelF) o moléculas co-estimulantes. Se podrían unir epítomos colaboradores (HTL) a señales de ataque intracelular y expresarse separadamente de los epítomos de CTL. Esto permitiría la dirección de los epítomos de HTL a un compartimento celular distinto a los epítomos de CTL. Si se requiere, esto podría facilitar una entrada más eficiente de los epítomos de HTL en el mecanismo de MHC de clase II, mejorando con ello la inducción de CTL. Al contrario que la inducción de CTL, disminuir específicamente la respuesta inmune mediante la co-expresión de moléculas inmunosupresoras (p.ej., TGF- β) puede ser beneficioso en determinadas enfermedades.

Una vez seleccionado el vector de expresión, el minigén se clona en la región poli-ligando aguas abajo del promotor. Dicho plásmido es transformado en una cepa de *E. coli* apropiada, y se prepara el ADN usando técnicas estándar. La orientación y la secuencia de ADN del minigén, así como otros elementos incluidos en el vector, son confirmados usando mapeado de restricción y análisis de secuencia de ADN. Las células bacterianas que albergan el plásmido correcto pueden almacenarse como un banco maestro de células y un banco de células de trabajo.

El ADN de plásmido purificado se puede preparar para inyección usando una variedad de formulaciones. La más sencilla de éstas es la reconstitución de ADN liofilizado en salino tamponado con fosfato (PBS). Se ha descrito una variedad de métodos, y pueden surgir nuevas técnicas disponibles. Como se ha indicado antes, los ácidos nucleicos son formulados de forma conveniente con lípidos catiónicos. Adicionalmente, los glicolípidos, liposomas fusogénicos, péptidos y compuestos referidos colectivamente como protectores, interactivos, de no condensación (PINC) también podrían formar complejo con un ADN plásmido para influir en variables tales como la estabilidad, la dispersión intramuscular o el transporte a órganos o tipos celulares específicos.

Se puede usar la sensibilización de células diana como ensayo funcional para la expresión y la presentación de MHC de clase I de epítomos de CTL codificados por minigén. El ADN plásmido se introduce en una línea celular de mamífero que es adecuada como diana para ensayos de liberación de cromó de CTL estándar. El método de transfección usado dependerá de la formulación final. Se puede usar electroporación para ADN "desnudo", mientras que los lípidos catiónicos permiten una transfección *in vitro* directa. Se puede co-transfectar una plásmido que exprese proteína fluorescente verde (GFP, del inglés "Green Fluorescent Protein") para permitir un enriquecimiento de células transfectada usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, del inglés "Fluorescence Activated Cell Sorting"). Estas células son marcadas a continuación con cromó-51 y se usan como células diana para líneas de CTL específicas de epítomo. La citólisis, detectada a través de la liberación de ⁵¹Cr, indica la producción de presentación de MHC de epítomos de CTL codificados por minigén.

La inmunogenicidad *in vivo* es una segunda estrategia para la evaluación funcional de formulaciones de ADN de minigén. Se inmunizan ratones transgénicos que expresan moléculas de MHC humanas apropiadas con el producto de ADN. La dosis y ruta de administración son dependientes de la formulación (p.ej., IM para ADN en PBS, IP para ADN acompañado con lípidos). Veintiún días después de la inmunización, se recolectan los esplenocitos y se reestiman durante 1 semana en presencia de péptidos que codifican cada epítomo que esté siendo tratado. Dichas células efectoras (CTLs) son evaluadas para determinar la citólisis de células diana, marcadas con cromó-51 cargadas de péptido, usando técnicas estándar. La lisis de células diana sensibilizadas mediante carga de MHC de péptidos correspondientes a los epítomos codificados por minigén demuestra la función de la vacuna de ADN para la inducción *in vivo* de CTLs.

Del mismo modo, los péptidos se pueden usar para activar CTL *ex vivo*. Los CTL resultantes se pueden usar para tratar tumores crónicos en pacientes que no respondan a otras formas convencionales de terapia, o que no respondan a una estrategia de vacuna de péptidos de terapia. Las respuestas de CTL *ex vivo* a un antígeno tumoral particular son inducidas incubando en cultivo de tejido las células precursoras de CTL del paciente (CTLp) junto con una fuente de células presentadoras de antígeno (APC) y el péptido apropiado. Tras un tiempo de incubación

apropiado (típicamente de 1-4 semanas), en el cual los CTLp son activados y maduran y se expanden en CTL efectoras, las células son infundidas de vuelta al paciente, donde destruirán su célula diana respectiva (es decir, una célula tumoral). Con el objetivo de optimizar las condiciones *in vitro* para la generación de células T citotóxicas específicas, el cultivo de células estimulantes se mantiene en un medio libre de suero apropiado.

5 Antes de la incubación de las células estimuladoras que van a ser activadas, p.ej., células precursoras CD8+, se añade una cantidad de péptidos antigénicos al cultivo de células estimuladoras, cantidad suficiente para poder cargarse en moléculas de Clase I humanas que van a ser expresadas sobre la superficie de las células estimuladoras. En la presente invención, una cantidad suficiente de péptido es aquella cantidad que permita cargar aproximadamente 200, y preferiblemente 200 o más, moléculas de MHC de Clase I con el péptido a expresar sobre la superficie de cada células estimuladora. Preferiblemente, las células estimuladoras se incuban con > 2 µg/mL de péptido. Por ejemplo, las células estimuladoras se incuban con > 3, 4, 5, 10, 15 ó más µg/mL de péptido.

10 Las células CD8+ precursoras o en reposo son incubadas a continuación en un cultivo con las células estimuladoras apropiadas durante un periodo de tiempo suficiente para activar las células CD8+. Preferiblemente, las células CD8+ se activan de un modo específico de antígeno. La proporción de células CD8+ (efectoras) precursoras o en reposo respecto a las células estimuladoras puede variar de individuo a individuo y puede depender además de variables tales como la predisposición de los linfocitos de un individuo a las condiciones de cultivo y la naturaleza y gravedad de la condición de enfermedad u otra afección para la cual se usa la modalidad de tratamiento prescrita. Preferiblemente, sin embargo, la ratio de linfocitos:células estimuladoras se encuentra en el rango de aproximadamente 30:1 a 300:1. El cultivo efector/estimulador puede mantenerse durante tanto tiempo como sea necesario para estimular un número efectivo o terapéuticamente utilizable de células CD8+.

15 La inducción de CTL *in vitro* requiere el reconocimiento específico de péptidos que se unan a moléculas de MHC de clase I específicas de alelo sobre APC. El número de complejos específicos MHC/péptido por APC es crucial para la estimulación de CTL, particularmente en respuestas inmunes primarias. Aunque cantidades pequeñas de complejos péptido/MHC por célula son suficientes para hacer que la célula sea susceptible a lisis por CTL, o para estimular una respuesta de CTL secundaria, la activación con éxito de un precursor de CTL (pCTL) durante la respuesta primaria requiere un número significativamente mayor de complejos MHC/péptido. La carga de péptidos de moléculas de complejo de histocompatibilidad principal vacías sobre células permite la inducción de respuestas de linfocitos T citotóxicos primarios.

20 Puesto que no existen líneas celulares mutantes para todos los alelos de MHC humano, es ventajoso usar una técnica para eliminar los péptidos asociados a MHC endógenos de la superficie de APC, seguido de una carga de las moléculas de MHC vacías resultantes con los péptidos inmunogénicos de interés. El uso de células no transformadas (no tumorigénicas), no infectadas, y preferiblemente células autólogas de pacientes como APC es deseable para el diseño de los protocolos de inducción de CTL dirigidos al desarrollo de terapias de CTL *ex vivo*. Esta aplicación describe métodos para limpiar péptidos asociados a MHC endógenos de la superficie de APC seguido de la carga de los péptidos deseados.

25 Una molécula de MHC de clase I es un complejo trimérico formado por los siguientes elementos: 1) un péptido normalmente de 8-10 residuos, 2) una cadena proteínica polimórfica pesada transmembrana que porta el sitio de unión a péptido en sus dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y 3) una cadena ligera no polimórfica asociada de forma no covalente, $\beta 2$ microglobulina. La eliminación de los péptidos ligados y/o la disociación de la $\beta 2$ microglobulina del complejo hacen que las moléculas de MHC de clase I sean no funcionales e inestables, dando como resultado una rápida degradación. Todas las moléculas de MHC de clase I aisladas de PBMCs tienen péptidos endógenos unidos a ellas. Por lo tanto, la primera etapa es eliminar todos los péptidos endógenos ligados a moléculas de MHC de clase I sobre las APC sin provocar su degradación antes de que se les puedan añadir los péptidos exógenos.

30 Dos posibles vías para liberar moléculas de MHC de clase I de los péptidos ligados incluyen disminuir la temperatura del cultivo desde 37°C a 26°C a lo largo de la noche, para desestabilizar la $\beta 2$ microglobulina y limpiar los péptidos endógenos de la célula usando un tratamiento ácido suave. Los métodos liberan los péptidos ligados previamente en el entorno extracelular permitiendo que nuevos péptidos exógenos se unan a las moléculas de clase I vacías. El método de incubación a baja temperatura permite que los péptidos exógenos se unan de manera eficaz al complejo de MHC, pero requiere una incubación de una noche a 26°C que puede frenar la tasa metabólica de la célula. También es probable que las células que no sintetizan de forma activa moléculas de MHC (p.ej., PBMC en reposo) no produzcan grandes cantidades de moléculas de MHC con superficie libre mediante el procedimiento de baja temperatura.

35 Una limpieza más exigente con ácido implica la extracción de los péptidos con ácido trifluoroacético, pH 2, o la desnaturalización ácida de los complejos clase I-péptido purificados por inmunoadinidad. Estos métodos no son viables para la inducción de CTL, ya que es importante eliminar los péptidos endógenos preservando la viabilidad de las APC y un estado metabólico óptimo, lo cual es crítico para la presentación de antígenos. Se han usado disoluciones ácidas suaves de pH 3, tales como los tampones de glicina o citrato-fosfato, para identificar péptidos endógenos y para identificar epítomos de células T asociados a tumor. El tratamiento es especialmente efectivo, en que solo las moléculas de MHC de clase I son desestabilizadas (y los péptidos asociados liberados), mientras que otros antígenos superficiales permanecen intactos, incluyendo las moléculas de MHC de clase II. De forma más

importante, el tratamiento de las células con disoluciones ácidas suaves no afecta a la viabilidad celular o al estado metabólico. El tratamiento ácido suave es rápido, ya que la limpieza de los péptidos endógenos se produce en dos minutos a 4°C y la APC queda preparada para llevar a cabo su función después de que se hayan cargado los péptidos apropiados. La técnica se utiliza en la presente memoria para preparar APCs específicas de péptido para la generación de CTL específicos de antígenos primarios. Las APC resultantes son eficientes en la inducción de CTL CD8+ específicos de péptido.

Las células CD8+ activadas pueden separarse de forma efectiva de las células estimuladoras usando uno de una serie de métodos. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales específicos para las células estimuladoras, para los péptidos cargados en las células estimuladoras, o para las células Cd8+ (o un segmento de las mismas) para unir el ligando complementario apropiado. A continuación se pueden extraer moléculas marcadas con anticuerpos de la mezcla de células estimulador-efector mediante los medios apropiados, p.ej., a través de métodos de inmunoprecipitación o de inmunoensayo bien conocidos.

Las cantidades efectivas citotóxicas de las células CD8+ puede variar entre los usos *in vitro* y los *in vivo*, así como con la cantidad y tipo de células que sean la diana final de estas células asesinas. La cantidad también variará dependiendo de la condición del paciente y debería determinarse considerando todos los factores apropiados por parte del médico responsable. Preferiblemente, sin embargo, para humanos adultos se utilizan entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{12} , más preferiblemente entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{11} , e incluso más preferiblemente, entre aproximadamente 1×10^9 y aproximadamente 1×10^{10} células CD8+ activadas, en comparación con entre aproximadamente 5×10^6 y aproximadamente 5×10^7 células usadas en ratones.

Preferiblemente, tal como se ha discutido anteriormente, las células CD8+ activadas son recolectadas de un cultivo celular antes de la administración de células CD8+ al individuo en tratamiento. Es importante destacar, sin embargo, que al contrario que en otras modalidades de tratamiento presentes y propuestas, el presente método usa un sistema de cultivo celular que no es tumorigénico. Por lo tanto, si no se logra una completa separación de células estimuladoras y células CD8+ activadas, no existe ningún peligro inherente conocido asociado a la administración de un número pequeño de células estimuladoras, mientras que la administración de células promotoras de tumor de mama puede ser extremadamente peligroso.

Los métodos para reintroducir componentes celulares son conocidos en la técnica e incluyen procedimientos tales como los mostrados en la Patente de EE.UU. nº 4.844.893 a nombre de Honsik et al., y en la Patente de EE.UU. no 4.690.915 a nombre de Rosenberg. Por ejemplo, la administración de células CD8+ activadas mediante infusión intravenosa sería apropiada.

La invención se describe ahora con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: UNA ESTRATEGIA PARA IDENTIFICAR NEOEPÍTOPOS PARA VACUNACIÓN

Nuestra estrategia para identificar neoepítomos específicos de tumor implica 3 etapas. (1) Identificación de mutaciones de ADN usando secuenciamiento de genoma completo o exoma completo (es decir, solo exones capturados) del tumor frente a muestras de línea germinal coincidentes para cada paciente. Nuestros estudios preliminares demuestran que las células CLL contienen muchos cambios genéticos distintos que alteran la secuencia de aminoácidos y que podrían generar nuevos potenciales epítomos de células T. (2) Aplicación de algoritmos de predicción de unión péptido-MHC altamente validados para generar un conjunto de epítomos de células T candidatos en base a mutaciones no silenciosas presentes en los tumores. Se confirmará la expresión de genes mutados como ARN en muestras de CLL, y a continuación se confirman las predicciones de unión péptido-HLA usando una estrategia experimental para cuantificar la unión de péptidos candidatos a alelos de HLA. (3) Generación de células T específicas de antígeno contra los péptidos mutantes.

EJEMPLO 2: SECUENCIAMIENTO DE GENOMA TUMORAL Y NORMAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES MUTADOS EN TUMORES DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (ETAPA 1)

Para detectar mutaciones específicas de tumor (que no estén presentes en tejidos normales), se tomaron muestras de tumores y de tejidos normales de cada paciente. Para las leucemias, los tumores fueron purificados usando aislamiento con partículas magnéticas o clasificación celular activada por fluorescencia con anticuerpos específicos de células tumorales, p.ej., las células tumorales de pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) expresan los marcadores superficiales CD5 y CD19. Se usaron fibroblastos cutáneos como control de tejido normal. El ADN o el ARN para secuenciamiento se purificaron a partir de células de tejido tumoral o normal aislado. Para melanoma, tumor de ovario y otros tumores sólidos (en los que exista contaminación de células no tumorales), se aisló ADN y ARN de cultivos a corto plazo relativamente homogéneos de células tumorales o de tumor capturado con láser. Se usaron PBMCs como células normales de control. Para todas las muestras, las PBMCs fueron criopreservadas hasta que fueron necesarias para la expansión de células T específicas de péptido mutado. Finalmente, también se

criopreservaron cultivos a corto plazo de células tumorales para uso posterior como dianas de células T expandidas. El ADN o el ARN genómicos aislados fueron evaluados para determinar la integridad y la pureza de ácidos nucleicos antes del secuenciamiento.

5 Para cada muestra de ADN, se cortó ADN y se secuenció, o se capturaron los exones codificadores mediante oligonucleótidos complementarios usando selección de híbridos y después secuenciando (Gnirke et al., Nat Biotechnol. 2009, 27 (2): 182-9). Se generaron y secuenciaron bibliotecas de ADN y ARN usando instrumentos de secuenciamiento de nueva generación Illumina.

10 El secuenciamiento de 64 pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) dio lugar a una media de 23 mutaciones no silenciosas que alteran secuencias de aminoácidos proteínicas (Figura 3) en el tumor con respecto a la secuencia de ADN de la línea germinal. Dichas mutaciones no silenciosas entran dentro de 5 clases distintas con el potencial de generar neoepítopos: contrasentido, de sitio de división, de cambio estructural (*indel*, inserciones y eliminaciones), de lectura y de fusión génica (Figura 4). Las frecuencias de dichas mutaciones varían entre pacientes individuales (Figura 5). Todas estas mutaciones proporcionan neotipos potenciales para la inmunización, generando las mutaciones de cambio estructural, de lectura y de sitio de división (p.ej., con intrones retenidos) tiras más largas de péptidos nuevos, conduciendo las mutaciones contrasentido a péptidos cortos con cambios de aminoácidos individuales y, finalmente, generando las fusiones génicas péptidos híbridos con nuevas secuencias de unión.

EJEMPLO 3: IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE UNIÓN A HLA DERIVADOS DE PROTEÍNAS EXPRESADAS QUE ALBERGAN MUTACIONES ESPECÍFICAS DE TUMOR (ETAPA 2).

20 La siguiente cuestión es si los genes mutados pueden generar péptidos que puedan ser presentados por proteínas MHC/HLA del paciente. En primer lugar, se usaron varios algoritmos para predecir 30 y 137 péptidos de unión a HLA con puntuaciones $IC_{50} < 500$ nM a partir de 10 mutaciones contrasentido del Paciente 1, y a partir de 53 mutaciones contrasentido, 1 *indel* (inserción-eliminación) y 2 fusiones génicas del Paciente 2. Se muestra un ejemplo de mutación contrasentido en un paciente con 6 alelos de HLA específicos con 2 péptidos de unión predichos de entre 54 combinaciones de péptidos de 9-meros y alelos de HLA (Figura 6). Para confirmar que estos genes son expresados en los tumores, se midieron los niveles de ARN para determinar los genes mutados (usando varias estrategias que dependen de la clase de mutación, Figura 7), y se observó que el 98% de los genes mutados con péptidos de unión a HLA eran expresados.

30 La capacidad de unión a HLA de todos los péptidos predichos que pasan la validación de la expresión de ARN es validada experimentalmente a continuación llevando a cabo ensayos de unión competitiva con péptidos de ensayo frente a péptidos de referencia que se sabe que se unen al alelo de HLA. (Sidney et al. Curr Protoc Immunol. 2001, Capítulo 18: Unidad 18.3) (Figura 8A). Del subconjunto que se evaluó mediante confirmación experimental de la unión a HLA, se confirmó que 8 de 17 péptidos predichos (47%) de mutaciones contrasentido en el Pt 1 presentaban elevadas afinidades de unión con los alelos de HLA ($IC_{50} < 500$) (Figura 8B). Para el Pt 2, se confirmó experimentalmente que 25 de 49 péptidos predichos se unían a HLA (Figura 8B). Estos resultados sugieren que todos los péptidos con una IC_{50} predicha < 150 nM muestran unión de HLA experimentalmente, mientras que un valor de corte de < 500 nM genera péptidos de unión verdadera un 40-50% de las veces (Figura 8C). Cabe destacar que 12 de los 25 péptidos mutados confirmados del Pt 2 presentan una afinidad de unión > 2 veces superior a la del péptido de la línea germinal (Figura 9). Aunque dichos péptidos son preferibles para su incorporación en una vacuna tumoral para reducir la probabilidad de que las células T reacciones colateralmente con el péptido de línea germinal, los péptidos que no presentan una unión diferencial todavía pueden proporcionar respuestas específicas de tumor debido a un reconocimiento diferencial del péptido mutante sobre el de línea germinal por parte del receptor de las células T.

45 EJEMPLO 4: RESPUESTAS DE CÉLULAS T CD8+ CONTRA PÉPTIDOS MUTADOS IDENTIFICADOS MEDIANTE SECUENCIAMIENTO DE MUESTRAS DE PACIENTE DE CLL (ETAPA 3)

Tomando como base los péptidos mutados de unión HLA verificada experimentalmente, se puede ya determinar si se pueden generar células T para reconocer dichos péptidos mutados específicos de tumor. Así, se sintetizaron péptidos con puntuaciones de unión inferiores a 1000 nM, que derivaron de genes con expresión validada en las células tumorales. Para generar células T de la especificidad deseada, se estimularon células T de los pacientes secuenciados con APCs autólogas (células dendríticas y células B autólogas expandidas con CD40L) pulsadas con los péptidos (tanto usando péptidos individuales como en conjunto) de forma semanal, en presencia de IL-2 e IL-7. Tras 3-4 rondas de estimulación, las células CD8+ expandidas fueron evaluadas en ELISpot para determinar evidencias de reactividad contra el péptido, en base a la secreción de IFN γ . De los 17 péptidos candidatos del Paciente 1 (Figura 10), se detectó secreción de IFN γ en células T contra DCs autólogas pulsadas con un péptido mutado procedente del gen TLK2.

EJEMPLO 5: EL GEN BCR-ABL MUTADO SE UNE A PROTEÍNAS MHC/HLA DEL PACIENTE Y PUEDE ACTIVAR CÉLULAS T CD8+ ESPECÍFICAS DEL PÉPTIDO MUTANTE

Se llevó a cabo un estudio completo de respuestas de células T a péptidos mutantes específicos de tumor en pacientes con otro tipo de leucemia, la leucemia mieloide crónica (CML). La CML se define por la expresión de una traslocalización específica de tumor, el producto de la fusión génica *BCR-ABL*. Las mutaciones en *BCR-ABL* se desarrollan en pacientes de CML que desarrollan resistencia a fármacos en la terapia farmacológica de primera línea con mesilato de imatinib, cuya diana es el *BCR-ABL*. Potencialmente, estas mutaciones pueden generar neoepítomos que las células T del hospedante, o de un donante normal injertado, pueden reconocer cuando se unen a proteínas de MHC; es probable que dichas células T sean entrenadas mínimamente.

Se consideraron las 20 mutaciones más comunes que evolucionan en pacientes con resistencia a imatinib, y se predijo la unión de péptidos de 9- y 10-meros agrupados alrededor de cada mutación. Usando el algoritmo predictivo NetMHC (Nielsen et al. PLoS One. 2007, 2 (8): e796) o el IEDB (Vita R et al. Nucleic Acids Res. 2010, 38: D854-62), se predijo la unión de 84 péptidos de entre las 20 mutaciones comunes a uno o más 8 alelos de HLA comunes ($IC_{50} < 1000$), derivando muchos péptidos de las tres mutaciones más comunes. Se predijo que 24 de 84 péptidos son ligandos fuertes ($IC_{50} < 50$) (Figura 14), 42 péptidos son ligandos intermedios ($50 < IC_{50} < 500$) y 18 péptidos son ligandos débiles ($500 < IC_{50} < 1000$).

Se centró la atención en un péptido mutante generado a partir de la mutación E255K (E255K-B₂₅₅₋₂₆₃) (KVYEGVWKK) (SEQ ID NO: 10) que se había predicho que se unía con una elevada afinidad a HLA-A3. ($IC_{50} = 33,1$). Usando un ensayo de unión a MHC competitivo (Figura 8A), se confirmó experimentalmente la elevada afinidad de unión del E255K-B con HLA-A3 ($IC_{50} = 17$ nM) con una unión a HLA ~ 10 veces más fuerte del péptido mutante que del péptido progenitor (natural) (Figura 15A). También se verificó experimentalmente que el E255K-B se une a otros miembros de la familia de supertipo A3, HLA-A*1101 y HLA-A*68. A continuación se generaron líneas de células T contra E255K-B procedente de un donante HLA-A3+ normal y 2 pacientes de CML E255K+/HLA-A3+ que mostraron ambos una mayor especificidad contra el péptido mutado que contra el péptido progenitor (Figura 15B, C). Parece ser que el E255K-B se procesa y se presenta endógenamente ya que las células T reactivas frente a E255K-B también respondieron a APCs HLA-A3+ transfectadas con el minigén que engloba los 227 pares base que rodean a la mutación E255K. Finalmente, la reactividad del E255K en un paciente se desarrolló solo tras alo-HSCT curativa (Figura 15D). Estos estudios demuestran que las alteraciones genéticas producidas por la leucemia pueden proporcionar nuevas dianas de antígenos específicos de tumor inmunogénicos que están asociadas a una respuesta clínica *in vivo*. Nuestra estrategia para identificar epítomos de células T inmunogénicos de *BCR-ABL* mutado ilustra por tanto una estrategia efectiva para aplicar herramientas bioinformáticas al descubrimiento de epítomos de células T a partir de genes mutados.

EJEMPLO 6: LOS CLONES DE CÉLULAS T DEL PACIENTE QUE RECONOCEN EPÍTOPOS TUMORALES PUEDEN MATAR SELECTIVAMENTE CÉLULAS QUE PRESENTAN EPÍTOPOS MUTADOS.

La confirmación de la especificidad de diana de las células T se determina mejor a través de la caracterización de clones de células T individuales. Por lo tanto, típicamente se aislaron clones de células T específicos de péptido mutado limitando la dilución de líneas de células T reactivas y usando después ensayos de liberación de cromo estándares para realizar un escrutinio de clones de células T que demuestren un ataque diferencial entre APCs autólogas pulsadas con el péptido mutado y pulsadas con péptido de línea germinal. Empleando una serie de diluciones estándar para cada péptido, se midió la concentración de péptido requerida para una tasa de muerte del 50%. Si la proporción de péptidos naturales a péptidos mutantes necesaria para una tasa de muerte del 50% es superior a un orden de magnitud (es decir, 10 veces superior), se concluye que existe un reconocimiento diferencial de dichos péptidos por parte de las células T, como se ha visto previamente para antígenos tumorales mutados. Se ha llevado a cabo este procedimiento para un antígeno de tumor de CML, el CML66. Para determinar si las células T específicas de péptido de CML66 reconocen epítomos procesados y presentados, se incubaron células T reactivas frente a péptido de CML66 con APCs autólogas transducidas para expresar la proteína CML66 completa. Se expresó CML66 mediante nucleofección de ADN plásmido o de ARN transcrito *in vitro* (en DCs, células B expandidas con CD40L o células K562 con moléculas de HLA modificadas). Tal como se muestra en la Figura 12A, las células T estimuladas fueron específicas del epítomo de péptido derivado de CML66 ligado a HLA-B4403 (péptido 66-72C). Puesto que la proteína CML66 fue expresada eficientemente cuando las células B expandidas con CD40L fueron nucleofectadas con ARNm de CML66 (Figura 12B), se pudo usar dichas células (o células pulsadas con péptidos) como dianas en un ensayo de liberación de cromo estándar y se observó que las células T lisaban dichas dianas celulares de forma efectiva (Figura 12C). Se están llevando a cabo ensayos comparables, que incluyen lisar células tumorales coincidentes del paciente, para cada línea de células T específicas de péptidos mutados generadas a partir de cada paciente de cáncer (p.ej., usando las líneas de células T descritas en los Ejemplos 6 y 7).

EJEMPLO 7: CONDUCTORES TUMORALES MUTADOS COMO ANTÍGENOS TUMORALES POTENCIALES

De 1188 mutaciones no silenciosas a lo largo de 64 pacientes, se identificaron 8 mutaciones recurrentes, que incluyen SF3B1 (16% de los pacientes de CLL), TP53 (12,5%), MYD88 (9%), ATM (9%), FBXW7 (6%), MAPK1 (5%), GNB1 (3%) y M6PR (3%) (Figura 11). Se predice que dichas mutaciones (especialmente las más frecuentes: SF3B1, TP53, MYD88 y ATM) son mutaciones conductoras que son esenciales para el desarrollo o la progresión del tumor. Dichos genes conductores representan antígenos específicos de tumor prometedores para la inclusión en una vacuna.

- 5 El SF3B1 es el gen más frecuentemente mutado en la CLL, se muta en sitios conservados, está expresado altamente en pacientes de CLL (Figura 12), y no ha sido descrito previamente. La mutación SF3B1 más común fue la K700E (40% de las mutaciones de SF3B1); el genotipado de otros 89 pacientes de CLL independientes descubrió 6 tumores de paciente más que albergaban esta mutación. Aplicando algoritmos de unión péptido-HLA a las mutaciones SF3B1, se predijo la unión de los péptidos mutados al alelo HLA-A2 más común (Figura 13). Si un péptido que alberga la mutación más común en la CLL (K700E de SF3B1) se une al alelo de HLA de clase I más común (HLA-A2), entonces dicho péptido es un excelente candidato para su inclusión en una vacuna de CLL para muchos pacientes de CLL.

REFERENCIAS

- Albert, T. J., Molla, M. N., Muzny, D. M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., Richmond, T. A., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Packard, C. J., et al. (2007). Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nat Methods* 4, 903-905.
- 5 Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Canning, C., Neuberg, D., Schlossman, R., Pickett, C., Collins, H., Wang, Y., Anderson, K. C., y Ritz, J. (1998). Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. *Blood* 91, 3671-3680.
- Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 115-130.
- 10 Attia, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., et al. (2005). Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23, 6043-6053.
- 15 Austen, B., Powell, J. E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A. M., Fegan, C., Moss, P., y Stankovic, T. (2005). Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 106, 3175-3182.
- Balakrishnan, A., Bleeker, F. E., Lamba, S., Rodolfo, M., Daniotti, M., Scarpa, A., van Tilborg, A. A., Leenstra, S., Zanon, C., y Bardelli, A. (2007). Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 67, 3545-3550.
- 20 Baskar, S., Kobrin, C. B., y Kwak, L. W. (2004). Autologous lymphoma vaccines induce human T cell responses against multiple, unique epitopes. *J Clin Invest* 113, 1498-1510.
- Baurain, J. F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., y Coulie, P. G. (2000). High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J Immunol* 164, 6057-6066.
- 25 Beck, K. E., Blansfield, J. A., Tran, K. Q., Feldman, A. L., Hughes, M. S., Royal, R. E., Kammula, U. S., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Kleiner, D., et al. (2006). Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 24, 2283-2289.
- Bellucci, R., Wu, C. J., Chiaretti, S., Weller, E., Davies, F. E., Alyea, E. P., Dranoff, G., Anderson, K. C., Munshi, N. C., y Ritz, J. (2004). Complete response to donor lymphocyte infusion in multiple myeloma is associated with antibody responses to highly expressed antigens. *Blood* 103, 656-663.
- 30 Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., y van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24, 175-208.
- Brandle, D., Bresseur, F., Weynants, P., Boon, T., y Van den Eynde, B. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 183, 2501-2508.
- 35 Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., et al. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439-444.
- Chiari, R., Foury, F., De Plaen, E., Baurain, J. F., Thonnard, J., y Coulie, P. G. (1999). Two antigens recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene. *Cancer Res* 59, 5785-5792.
- 40 De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., y Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2274-2278.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., et al. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- 45 Estep, A. L., Palmer, C., McCormick, F., y Rauen, K. A. (2007). Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy. *PLoS ONE* 2, e1279.
- 50 Garcia-Marco, J. A., Caldas, C., Price, C. M., Wiedemann, L. M., Ashworth, A., y Catovsky, D. (1996). Frequent somatic deletion of the 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88, 1568-1575.

- Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* 11, 263-270.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153- 158.
- 5 Gueguen, M., Patard, J. J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renauld, J. C., Van Cangh, P. J., Boon, T., y Van den Eynde, B. J. (1998). An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *J Immunol* 160, 6188-6194.
- Herman, J., Jongeneel, V., Kuznetsov, D., y Coulie, P. G. (1999). Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ by a single amino acid. *Tissue Antigens* 53, 111-121.
- 10 Hocker, T., y Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat* 28, 578-588.
- Hodi, F. S., Butler, M., Oble, D. A., Seiden, M. V., Haluska, F. G., Kruse, A., Macrae, S., Nelson, M., Canning, C., Lowy, I., et al. (2008). Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3005- 3010.
- 15 Hodi, F. S., Mihm, M. C., Soiffer, R. J., Haluska, F. G., Butler, M., Seiden, M. V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., et al. (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4712-4717.
- Huang, J., El-Gamil, M., Dudley, M. E., Li, Y. F., Rosenberg, S. A., y Robbins, P. F. (2004). T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. *J Immunol* 172, 6057-6064.
- 20 Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J., y Doehn, C. (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 363, 594-599.
- 25 Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., y Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-559.
- Keats, J. J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W. J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C. X., Sebag, M., et al. (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12, 131-144.
- 30 Ladetto, M., Omede, P., Sametti, S., Donovan, J. W., Astolfi, M., Drandi, D., Volpato, F., Giaccone, L., Giaretta, F., Palumbo, A., et al. (2002). Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. *Exp Hematol* 30, 529-536.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R. A., Lifke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C., y Wolfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16013-16018.
- 35 Lin, H. H., Ray, S., Tongchusak, S., Reinherz, E., y Brusic, V. (2008). Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* (in press).
- Maker, A. V., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., Hughes, M., Yellin, M. J., Haworth, L. R., Levy, C., et al. (2006). Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* (1997) 29, 455-463.
- 40 Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz-Hillel, A., Feldman, M., Berke, G., y Eisenbach, L. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. *Nat Med* 1, 1179-1183.
- Mandrizzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., y van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186, 785-793.
- 45 Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., Kloosterboer, F. M., Goulmy, E., Kester, M. G., van der Hooft, M. A., van Luxemburg-Heys, S. A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J. W., et al. (2003). Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2742-2747.
- 50 Marina O, Hainz U, Biernacki MA, et al. (2010) Serologic markers of effective tumor immunity against chronic lymphocytic leukemia include nonmutated B-cell antigens. *Cancer Res.* 70, 1344-1355.

- Mullally, A., y Ritz, J. (2007). Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 109, 1355-1362.
- 5 Ofran, Y., Brusic, V., Soiffer, R., Antin, J. H., y Ritz, J. (2008). Identification of human minor histocompatibility antigens (mHa) by combining bioinformatic prediction of peptide epitopes with validation of T cell reactivity in patient blood samples after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant* 14, 1.
- Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., y Castelli, C. (2007). Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol* 178, 1975-1979.
- 10 Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., y Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family; identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 67, 3963-3969.
- Peters, B., Sidney, J., Bourne, P., Bui, H. H., Buus, S., Doh, G., Fleli, W., Kronenberg, M., Kubo, R., Lund, O., et al. (2005). The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. *PLoS Biol* 3, e91.
- 15 Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., et al. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8372-8377.
- Provan, D., Bartlett-Pandite, L., Zwicky, C., Neuberger, D., Maddocks, A., Corradini, P., Soiffer, R., Ritz, J., Nadler, L. M., y Gribben, J. G. (1996). Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood* 88, 2228-2235.
- 20 Reifemberger, J., Knobbe, C. B., Sterzinger, A. A., Blaschke, B., Schulte, K. W., Ruzicka, T., y Reifemberger, G. (2004). Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int J Cancer* 109, 377-384.
- Ribas, A., Camacho, L. H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanagui, C. A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J. M., Seja, E., Parker, C. A., et al. (2005). Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol* 23, 8968-8977.
- 25 Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., y Rosenberg, S. A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183, 1185-1192.
- 30 Rondon, G., Giralt, S., Huh, Y., Khouri, I., Andersson, B., Andreeff, M., y Champlin, R. (1996). Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 18, 669-672.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., y Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10, 909-915.
- 35 Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, L., Porfiri, E., y Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790-1792.
- Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., et al. (2005). Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol* 23, 741-750.
- 40 Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18538- 18543.
- Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G. A., Dohner, H., y Lichter, P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 748-753.
- 45 Segal, N. H., Parsons, D. W., Peggs, K. S., Velculescu, V., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., y Allison, J. P. (2008). Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res* 68, 889-892.
- Sensi, M., y Anichini, A. (2006). Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. *Clin Cancer Res* 12, 5023-5032.

- Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.
- 5 Soiffer, R., Hodi, F. S., Haluska, F., Jung, K., Gillessen, S., Singer, S., Tanabe, K., Duda, R., Mentzer, S., Jaklitsch, M., et al. (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 21, 3343-3350.
- 10 Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., et al. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13141-13146.
- Srivastava, P. K. (2006). Therapeutic cancer vaccines. *Curt Opin Immunol* 18, 201-205.
- 15 Stankovic, T., Hubank, M., Cronin, D., Stewart, G. S., Fletcher, D., Bignell, C. R., Alvi, A. J., Austen, B., Weston, V. J., Fegan, C., et al. (2004). Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. *Blood* 103, 291-300.
- Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., y Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* 63, 2127-2133.
- 20 Thomas, R. K., Baker, A. C., Debiase, R. M., Winckler, W., Laframboise, T., Lin, W. M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L., et al. (2007). High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 39, 347-351.
- Thompson, A. A., Talley, J. A., Do, H. N., Kagan, H. L., Kunkel, L., Berenson, J., Cooper, M. D., Saxon, A., y Wall, R. (1997). Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 90, 1387-1394.
- 25 Thornton, P. D., Gruszka-Westwood, A. M., Hamoudi, R. A., Atkinson, S., Kaczmarek, P., Morilla, R. M., Hilditch, B. L., A'Hern, R., Matutes, E., y Catovsky, D. (2004). Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol J* 5, 47-54. Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., et al. (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, 1517-1526.
- 30 Toze, C. L., Galal, A., Barnett, M. J., Shepherd, J. D., Conneally, E. A., Hogge, D. E., Nantel, S. H., Nevill, T. J., Sutherland, H. J., Connors, J. M., et al. (2005). Myeloablative allografting for chronic lymphocytic leukemia: evidence for a potent graft-versus-leukemia effect associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 36, 825-830.
- 35 Ueda, M., Toji, E., y Noda, S. (2007). Germ line and somatic mutations of BRAF V599E in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 17, 794-797.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., y Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- 40 Van Pel, A., Georlette, M., y Boon, T. (1979). Tumor cell variants obtained by mutagenesis of a Lewis lung carcinoma cell line: immune rejection by syngeneic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5282-5285.
- Van Trappen, P. O., Cullup, T., Troke, R., Swann, D., Shepherd, J. H., Jacobs, I. J., Gayther, S. A., y Mein, C. A. (2007). Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 104, 129-133.
- 45 Willmore-Payne, C., Holden, J. A., Tripp, S., y Layfield, L. J. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol* 36, 486-493.
- Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., y Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.
- 50 Wu, C. J., Biernacki, M., Kutok, J. L., Rogers, S., Chen, L., Yang, X. F., Soiffer, R. J., y Ritz, J. (2005). Graft-versus-leukemia target antigens in chronic myelogenous leukemia are expressed on myeloid progenitor cells. *Clin Cancer Res* 11, 4504-4511.

- Wu, C. J., Chillemi, A., Alyea, E. P., Orsini, E., Neuberg, D., Soiffer, R. J., y Ritz, J. (2000a). Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. *Blood* 95, 352-359.
- 5 Wu, C. J., y Ritz, J. (2006). Induction of tumor immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Adv Immunol* 90, 133-173.
- Wu, C. J., Yang, X. F., McLaughlin, S., Neuberg, D., Canning, C., Stein, B., Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., y Ritz, J. (2000b). Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 106, 705-714.
- 10 Wu, R., Hendrix-Lucas, N., Kuick, R., Zhai, Y., Schwartz, D. R., Akyol, A., Hanash, S., Misek, D. E., Katabuchi, H., Williams, B. O., et al. (2007). Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell* 11, 321-333.
- Yang, X. F., Wu, C. J., McLaughlin, S., Chillemi, A., Wang, K. S., Canning, C., Alyea, E. P., Kantoff, P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., y Ritz, J. (2001). CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7492-7497.
- 15 Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., et al. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348, 203-213.
- Zhang W, Choi J, Zeng W, et al. (2010) Graft-versus-Leukemia Antigen CML66 Elicits Coordinated B-Cell and T-Cell Immunity after Donor Lymphocyte Infusion. *Clin Cancer Res.* 16, 2729-2739.
- 20 Zhou, J., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., y Robbins, P. F. (2005a). Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. *J Immunother* (1997) 28, 53-62.
- Zhou, X., Jun, D. Y., Thomas, A. M., Huang, X., Huang, L. Q., Mautner, J., Mo, W., Robbins, P. F., Pardoll, D. M., y Jaffee, E. M. (2005b). Diverse CD8⁺ T-cell responses to renal cell carcinoma antigens in patients treated with an autologous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transduced renal tumor cell vaccine. *Cancer Res* 65, 1079-1088.
- 25

REIVINDICACIONES

- 1.** Un método para identificar una pluralidad de péptidos neoantigénicos para preparar una composición inmunogénica específica de un sujeto, comprendiendo cada péptido neoantigénico un neoepítipo específico de tumor que comprende una mutación específica de tumor, método que comprende:
- 5 a. identificar una pluralidad de mutaciones tumorales específicas de sujeto en genes expresados de un sujeto que tenga cáncer mediante secuenciamiento de ácidos nucleicos de genoma completo o de exoma completo de muestras del tumor y de tejido normal procedentes del sujeto, donde las mutaciones están presentes en el genoma de las células cancerígenas del sujeto pero no en el tejido normal del sujeto;
- b. donde cuando una mutación identificada en la etapa (a) es una mutación puntual:
- 10 i. identificar un péptido mutante que tenga la mutación identificada en la etapa (a), donde dicho péptido mutante comprende un neoepítipo específico de tumor que se une a una proteína de HLA de clase I con una mayor afinidad que un péptido natural; y que tenga una IC_{50} inferior a 500 nM;
- c. donde cuando una mutación identificada en la etapa (a) sea una mutación de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica:
- 15 i. identificar un polipéptido mutante codificado por la mutación identificada en la etapa (a), donde dicho polipéptido mutante comprende un neoepítipo específico de tumor que se une a una proteína HLA de clase I.
- 2.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud de aproximadamente 8-10 aminoácidos.
- 3.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud de más de 10 aminoácidos.
- 20 **4.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud de más de 15 aminoácidos.
- 5.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud de más de 20 aminoácidos.
- 6.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud igual o superior a 30 aminoácidos.
- 7.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud de entre 8 y 50 aminoácidos.
- 25 **8.** El método de la reivindicación 1, donde cada péptido mutante tiene una longitud de 24-40 aminoácidos.
- 9.** El método de la reivindicación 1, donde una mutación identificada en la etapa (a) es una mutación de cambio estructural o de eliminación que conduce a un nuevo marco de lectura abierto con una nueva secuencia proteínica específica de tumor.
- 30 **10.** El método de la reivindicación 1, que además comprende seleccionar un péptido identificado en la etapa (b) o el polipéptido de la etapa (c) que activa células T CD8 anti-tumorales.

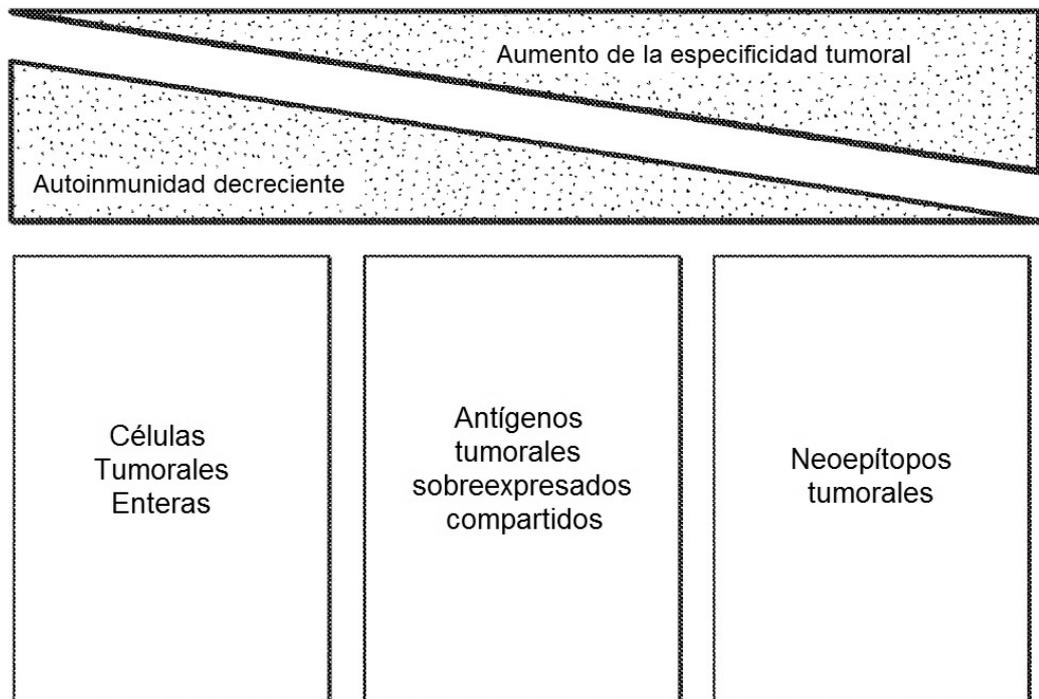


FIG. 1

Estrategia de vacunación con neoantígenos personalizada

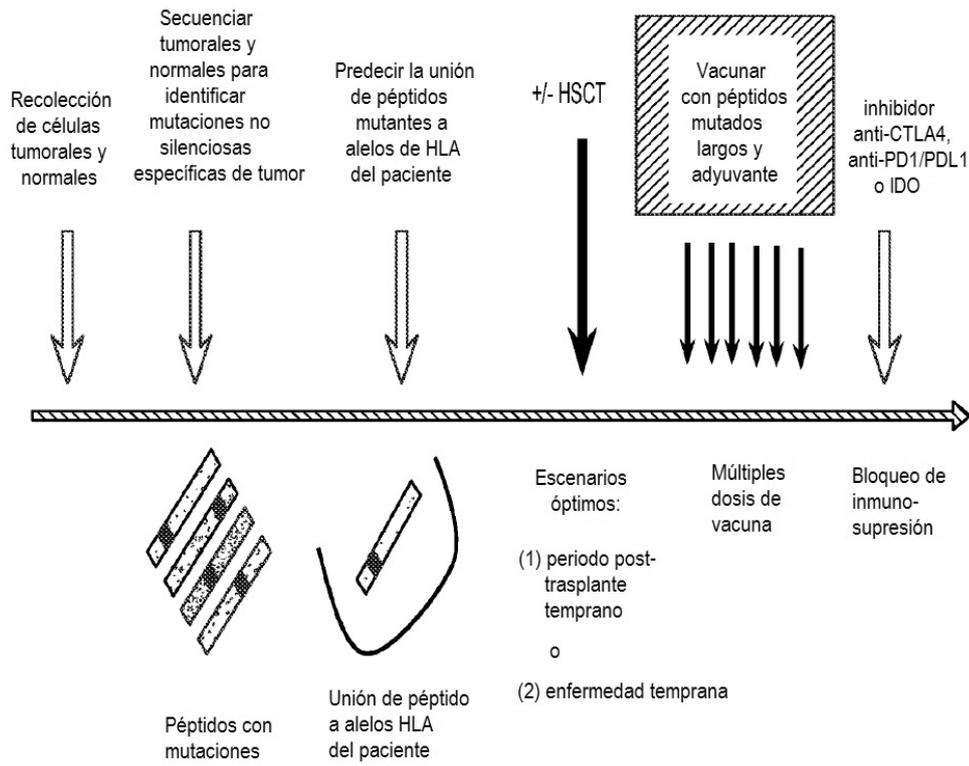


FIG. 2

Una estrategia para identificar neoepítomos tumorales

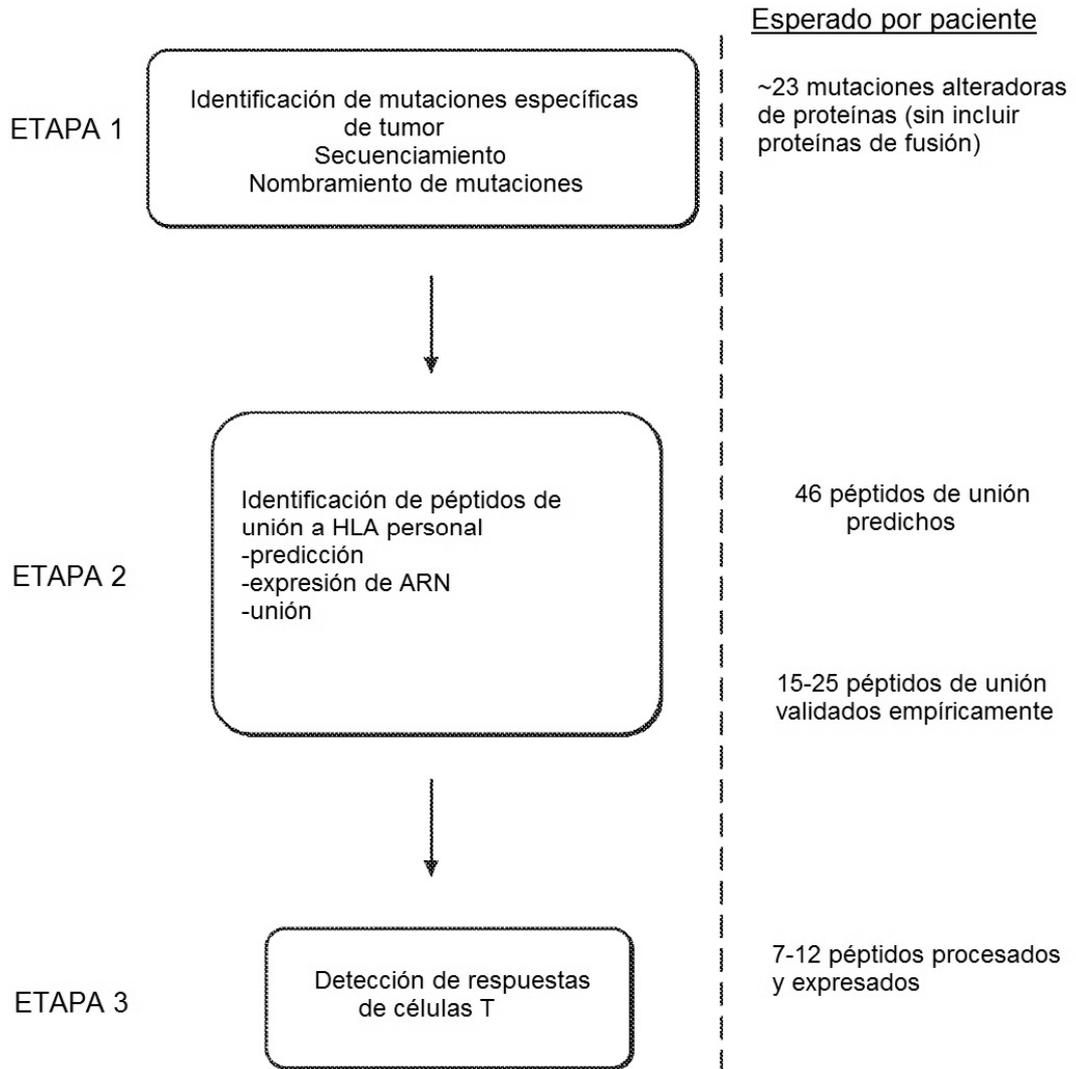


FIG. 3

Etapa 1: Identificar las 5 clases de mutaciones que generan neoepítomos tumorales potenciales

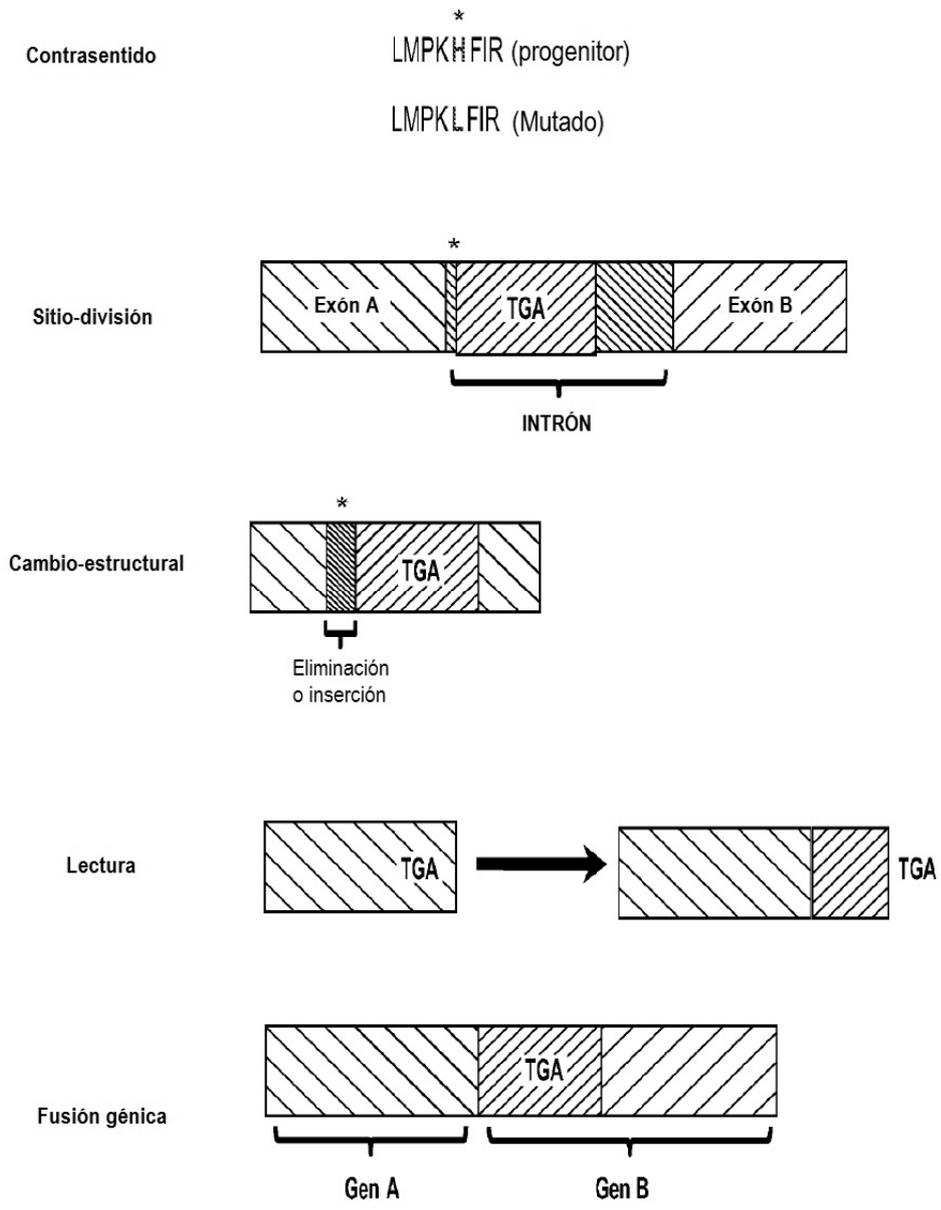


FIG. 4

Frecuencia de mutaciones por clase en pacientes de CLL

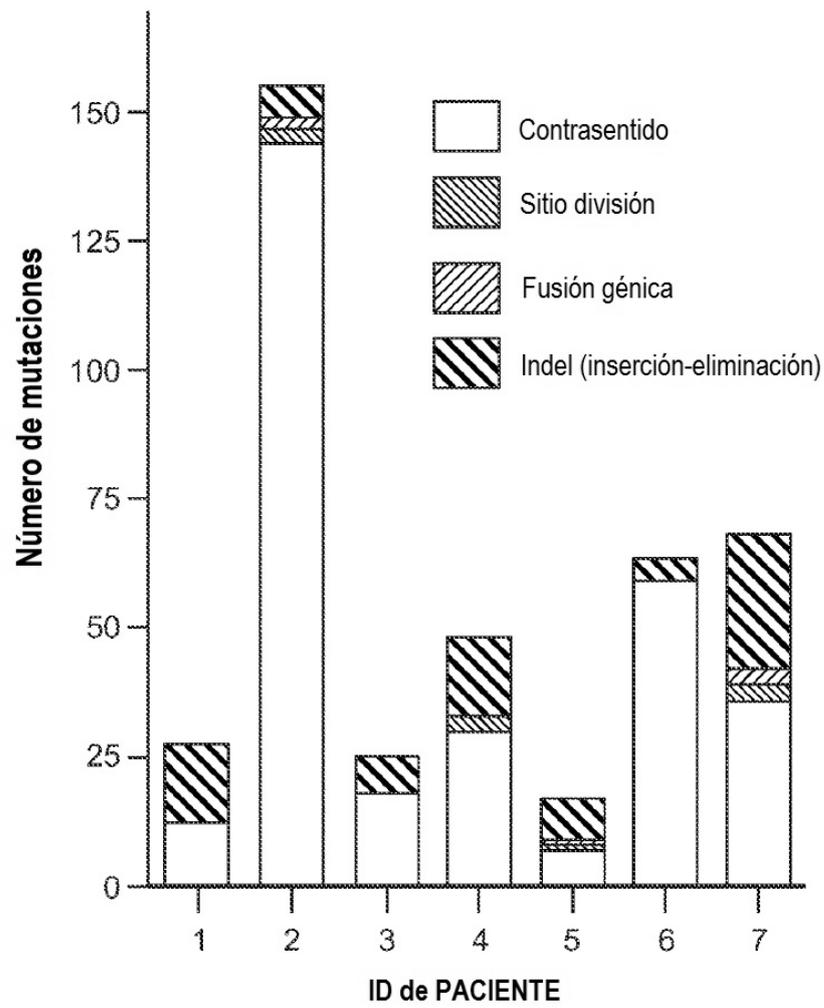


FIG. 5

**Etapas 2A: Predicciones automatizadas de péptidos
contra cada uno de los alelos de los pacientes**

	No mutado	ASILLMTVI	Afinidad de unión fuerte IC ₅₀ < 50 nM	Unión intermedia IC ₅₀ < 500 nM			
Mutado	ASILLMTVT						
Posición	F2R/NM_001992 T@196						
188-196	ASILLMTVT	23671,85	19359,42	29705,82	33914,47	30813,86	29921,85
189-197	SILLMTVTS	33864,61	8502,78	32065,73	14437,61	35076,88	31257,98
190-198	ILLMTVTSI	28921,10	[41,91]	11185,03	921,87	18346,73	13844,36
191-199	LLMTVTSID	32446,28	6105,16	31413,94	19157,37	42419,53	41446,55
192-200	LMTVTSIDR	30402,31	33262,16	41747,34	39837,33	37470,89	35512,98
193-201	MTVTSIDRF	5066,20	17874,71	16830,38	27827,56	7827,33	6665,52
194-202	TVTSIDRFL	25673,87	10165,34	17459,35	29667,50	19864,06	20854,32
195-203	VTSIDRFLA	4397,21	7438,75	27799,40	34937,23	34058,25	28879,51
196-204	TSIDRFLAV	5703,43	527,45	9124,17	[245,43]	11255,57	9553,74

FIG. 6

Etapa 2B: Confirmación de la expresión de ARN de genes mutados

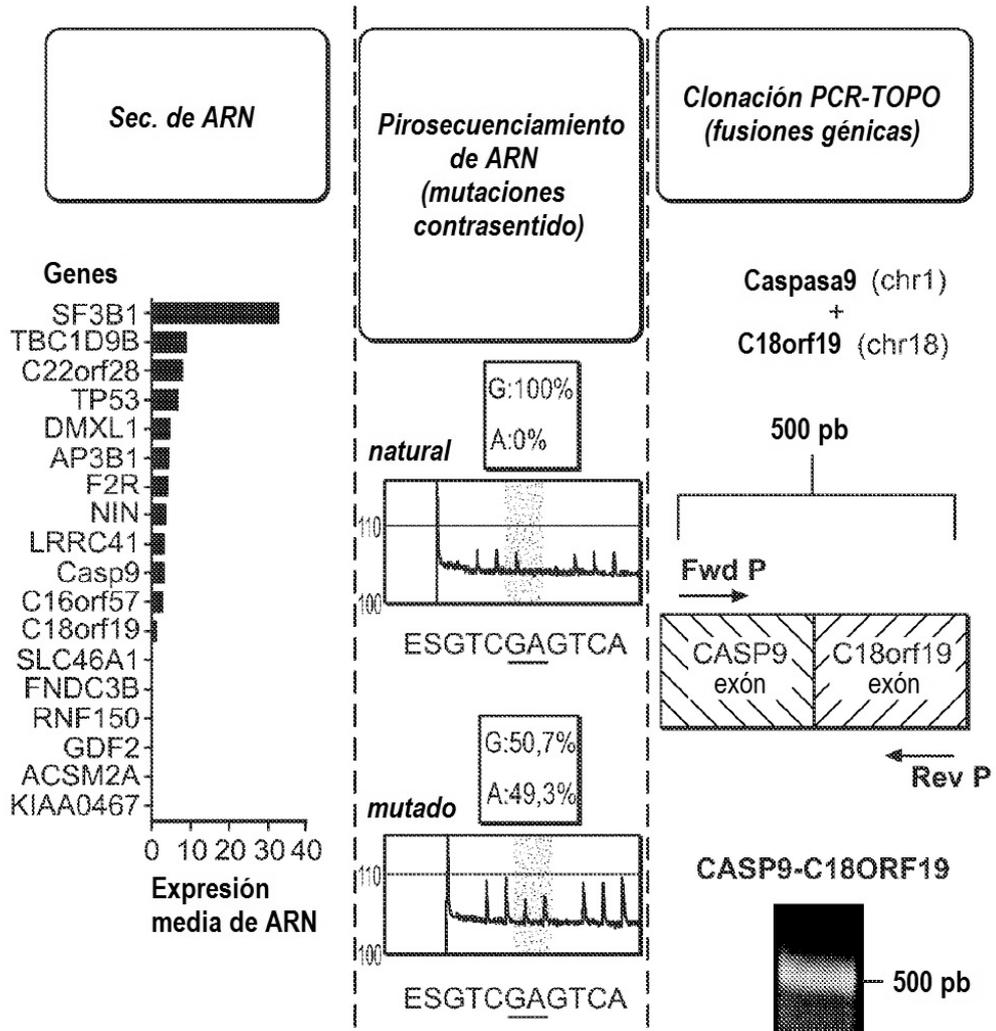


FIG. 7

Etapa 2C: Validación experimental de la unión HLA-péptido

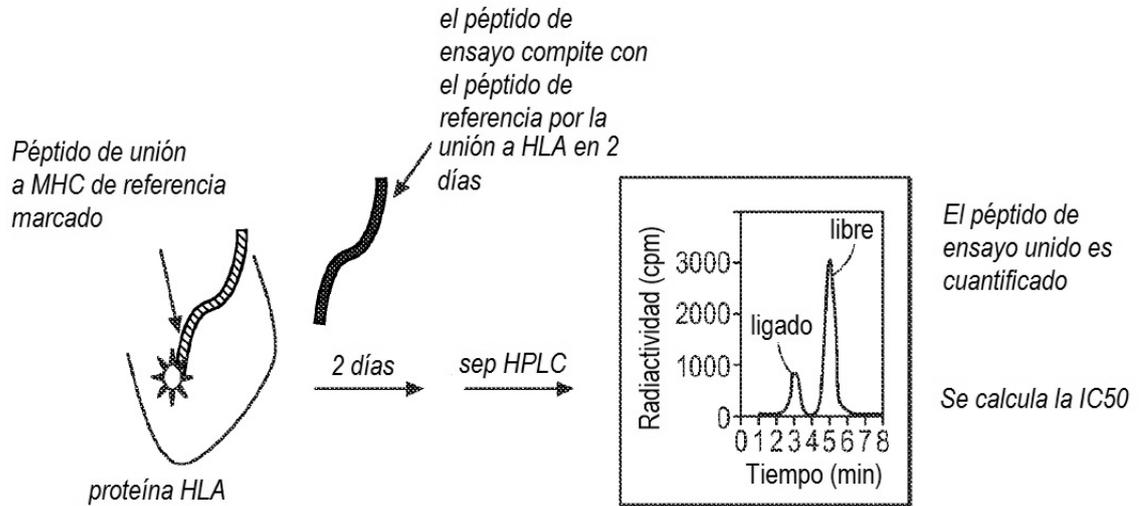


FIG. 8A

Pt	Class of genetic alteration	# mutated genes	# mutated genes predicted to generate HLA binding peptides	# peptides predicted	Peptides experimentally confirmed/ total tested
1	Missense	12	10	30	8/17 (47%)
	Splice site	0	0	0	0
	Indel	16	0	0	0
	Gene fusion				
2	Missense	144	53	116	18/29 (46%)
	Splice site	3	0	0	0
	Indel	6	1	11	
	Gene fusion	2	2	10	7/10 (70%)

FIG. 8B

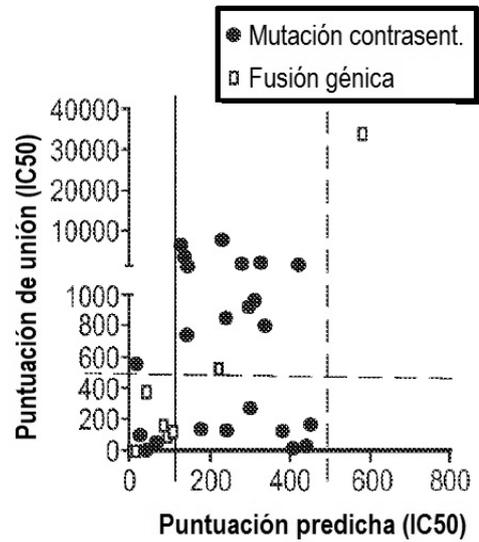


FIG. 8C

Unión diferencial predicha de péptidos mutados vs. línea germinal a alelos de HLA

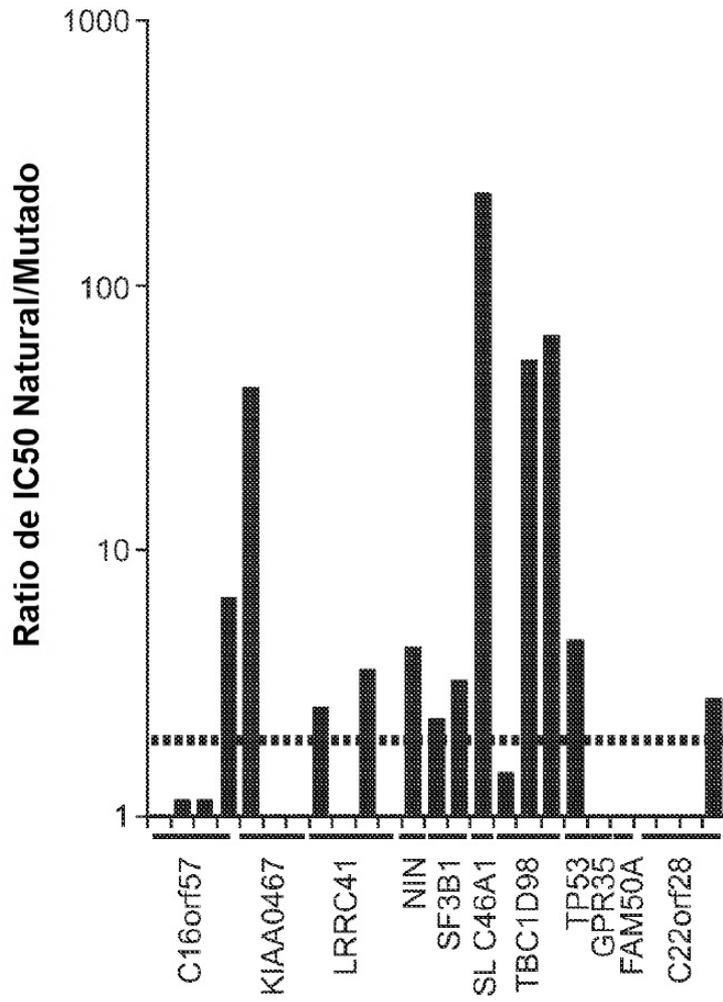


FIG. 9

Etapa 3: Reactividad de células T frente a un neopéptido de CLL personal candidato

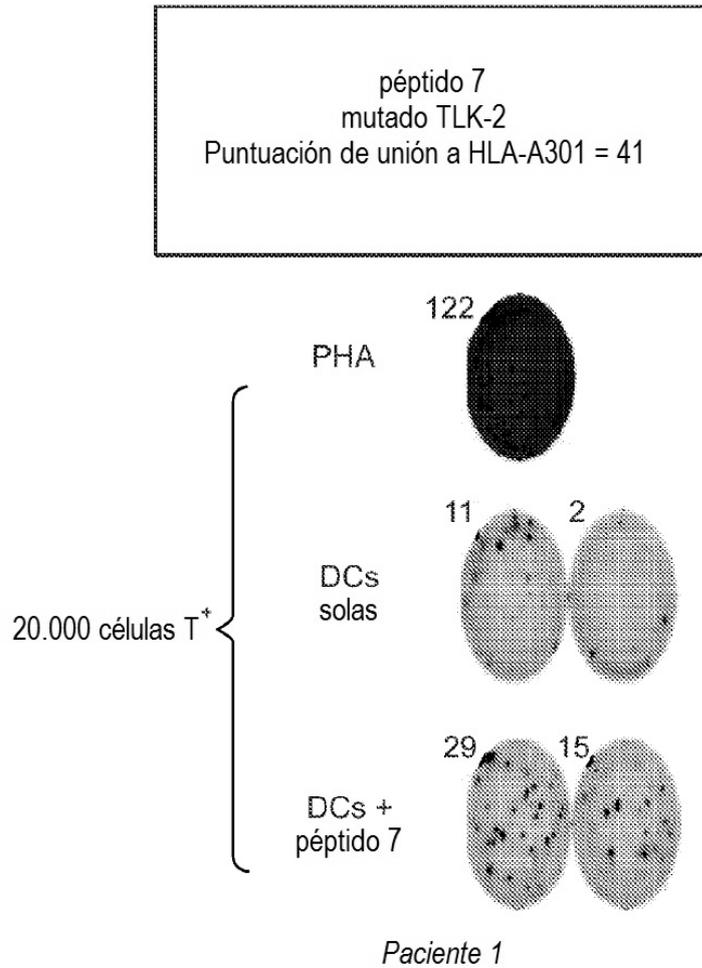


FIG. 10

Las mutaciones BCR-ABL generan muchos péptidos con predicción de unión a alelos de HLA-A y HLA-B

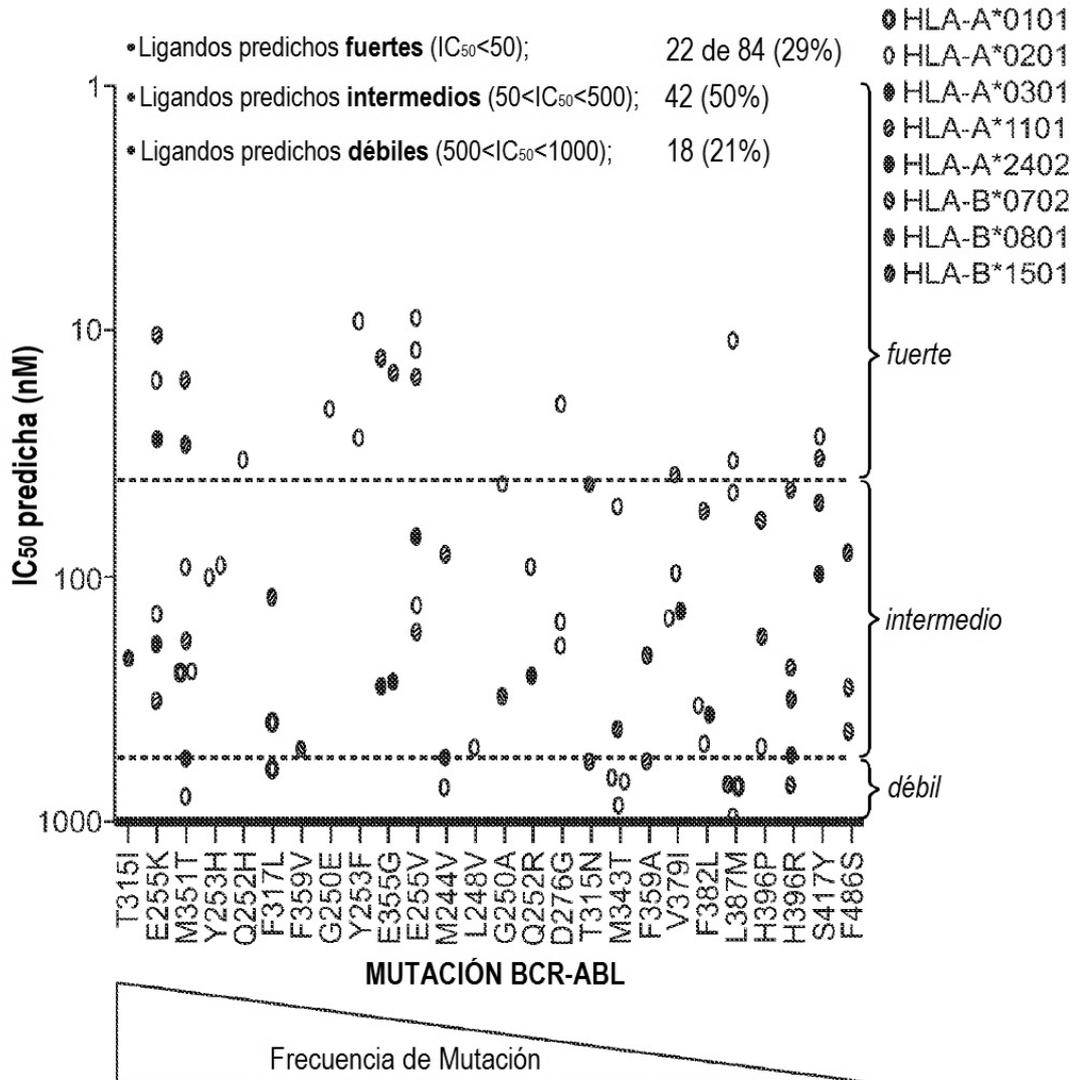


FIG. 11

Péptido	Secuencia	Capacidad de unión a supertipo HLA A03 (IC50 nM)					
		A*0301	A*1101	A*3001	A*3101	A*3301	A*6801
E255K-progenitor	EVYEGVWKK	1074	63	.	.	60	10
E255K-B	KVYEGVWKK	17	39	603	202	42860	45

FIG. 12A

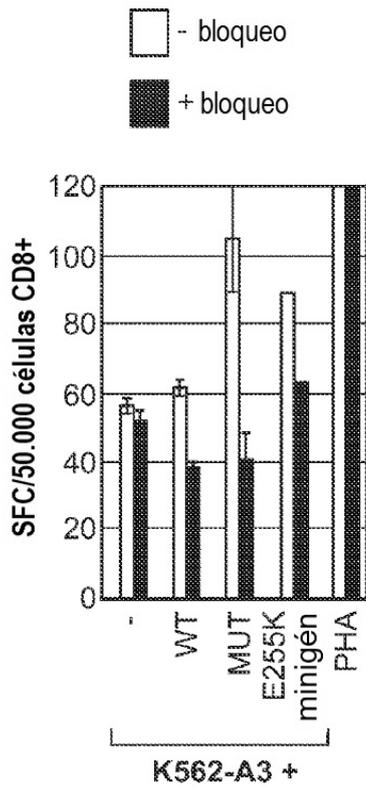


FIG. 12B

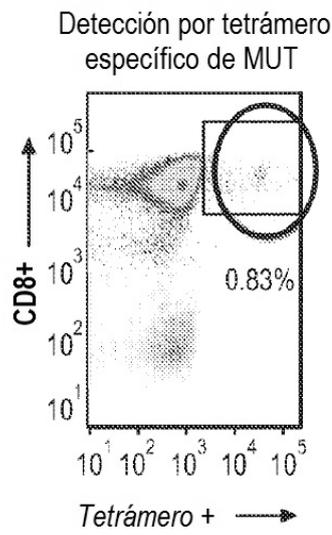


FIG. 12C

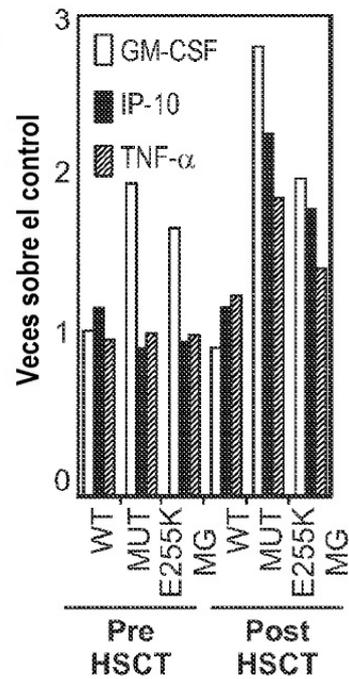


FIG. 12D

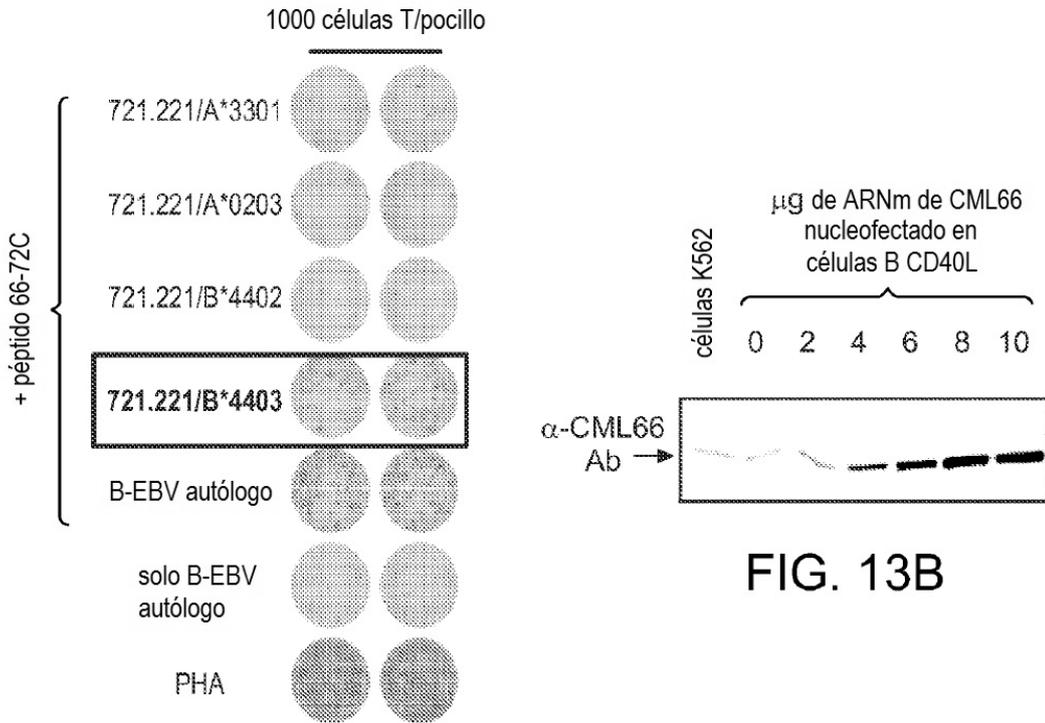


FIG. 13B

FIG. 13A

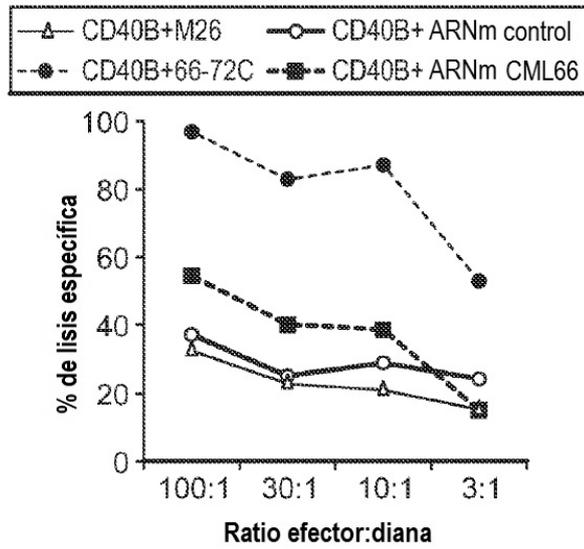


FIG. 13C

FIG. 14A Mutaciones conductoras en CLL

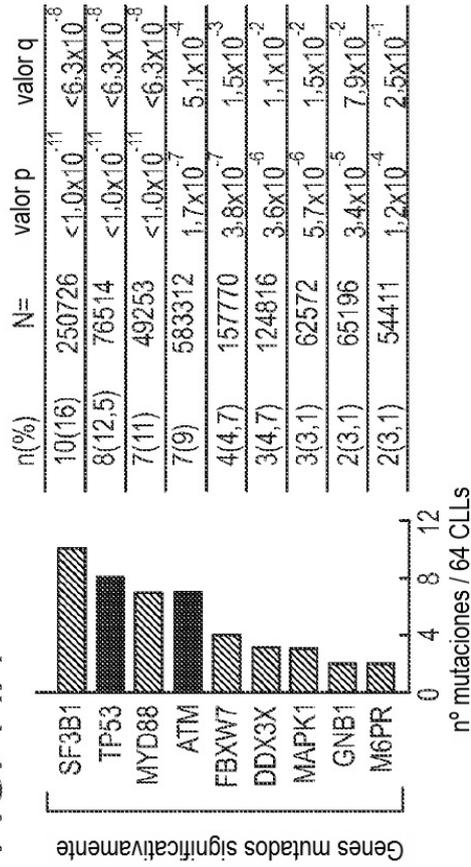


FIG. 14B

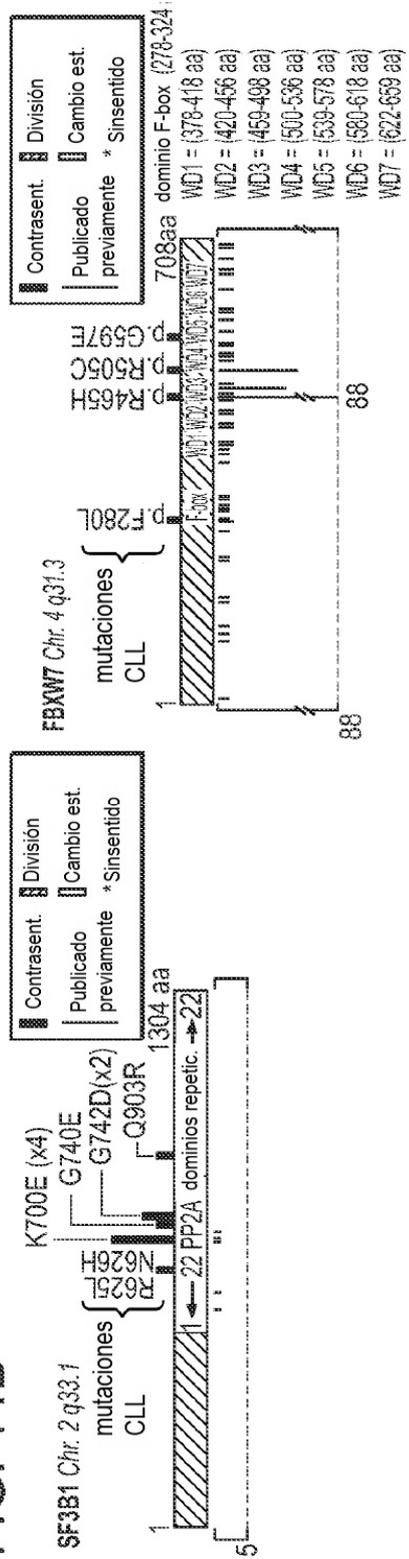
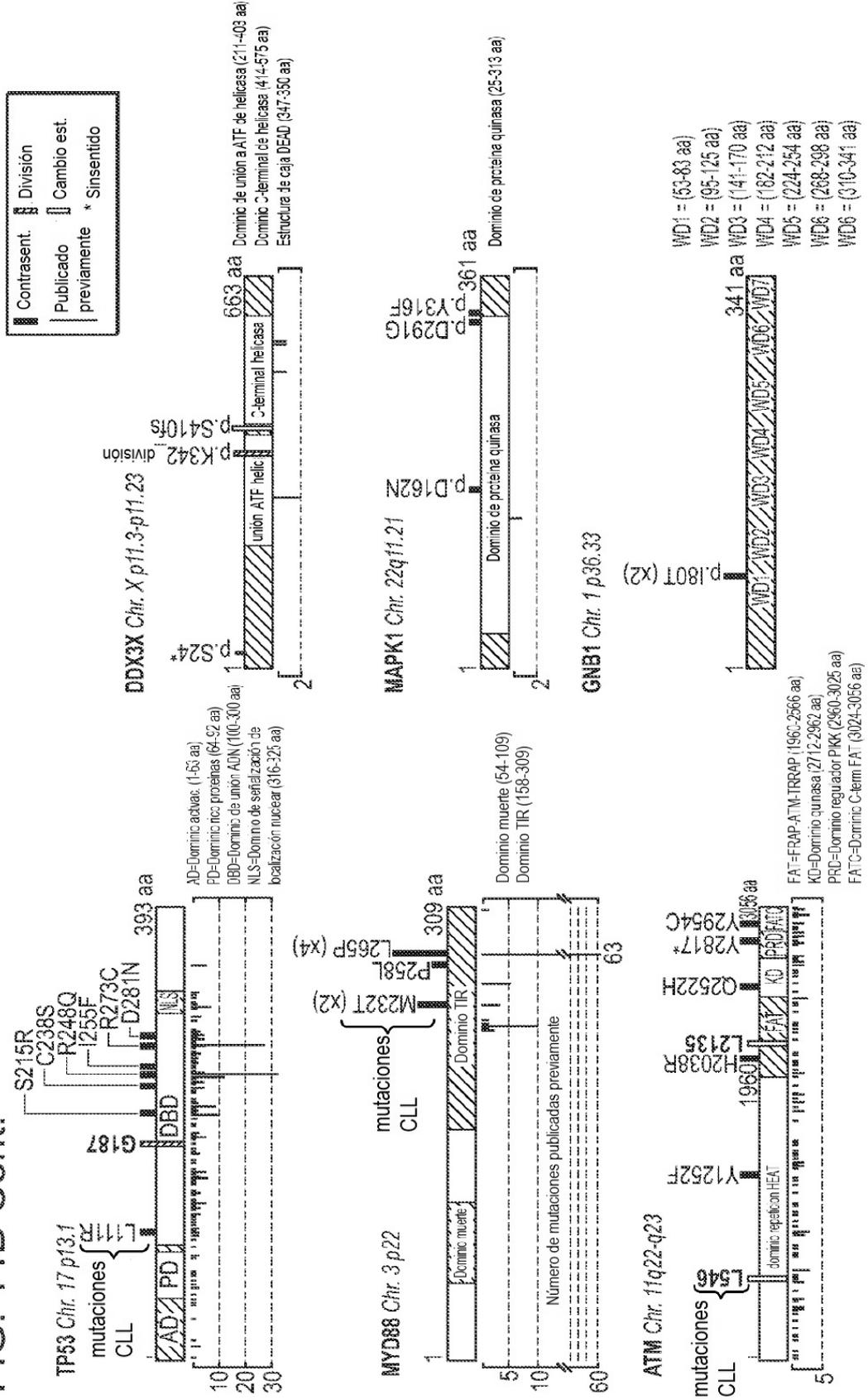


FIG. 14B Cont.



La expresión de SF3B1 es elevada en células de CLL

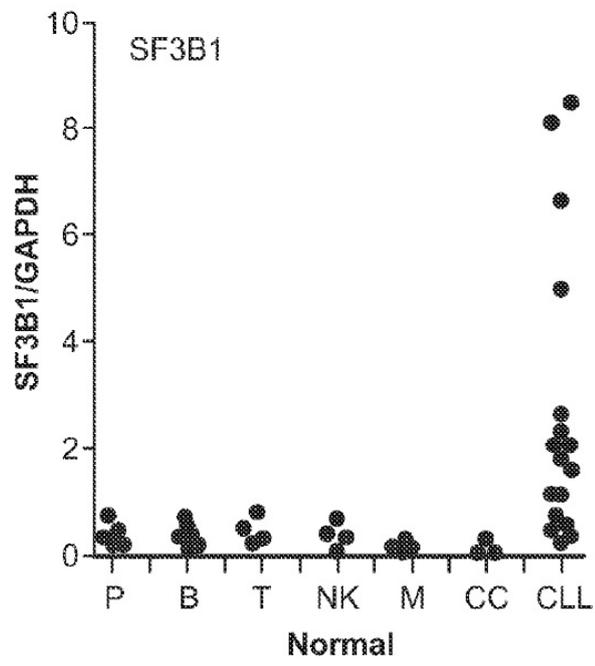


FIG. 15

Las mutaciones SF3B1 generan péptidos con unión predicha a alelos de HLA de pacientes de CLL secuenciados

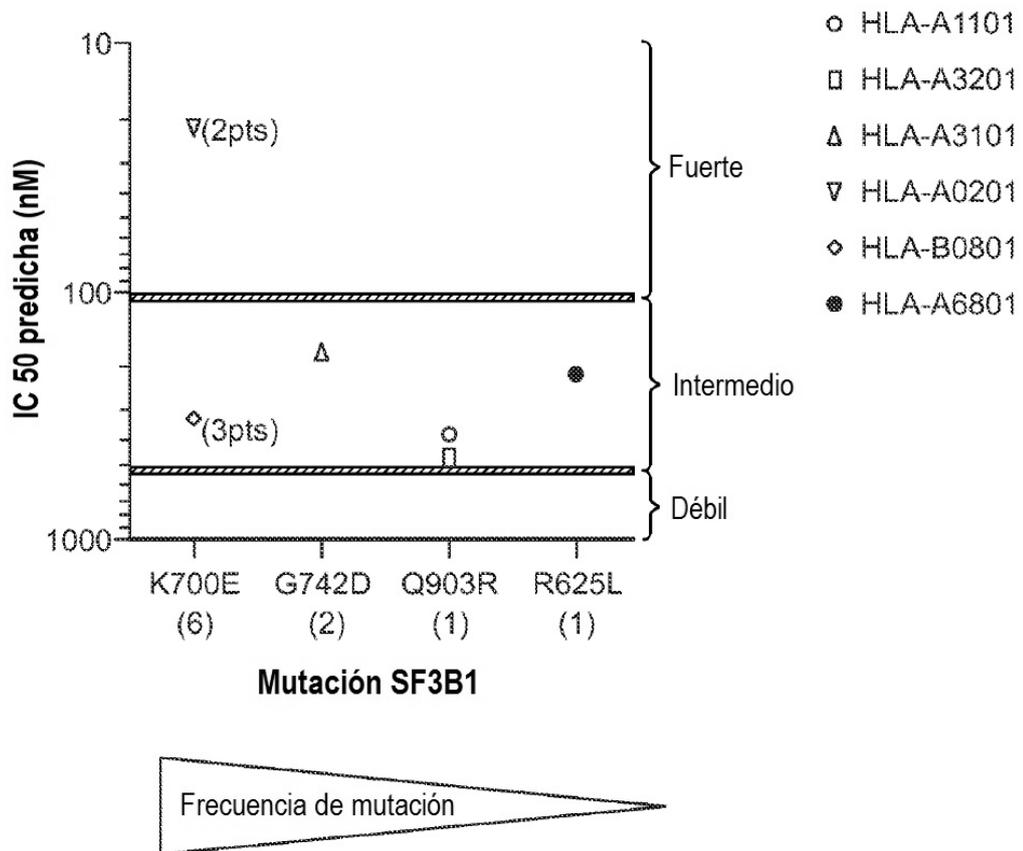


FIG. 16