

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 038**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/EP2014/077033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086590**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14828148 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3079715**

54 Título: **Una mezcla de péptidos**

30 Prioridad:

09.12.2013 EP 13196333

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

18.09.2018

73 Titular/es:

**TARGOVAX ASA (100.0%)
Lilleakerveien 2 C
0283 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

ERIKSEN, JON AMUND

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 682 038 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

Una mezcla de péptidos

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona mezclas de péptidos que comprende péptidos de la proteína RAS para desencadenar una respuesta inmunitaria, y mezclas de linfocitos T que comprenden linfocitos T específicos para dichos péptidos cuando se presentan en moléculas del MHC. La invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprende dichas mezclas de péptidos y mezclas de linfocitos T, y dichas mezclas de péptidos y mezclas de linfocitos T para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Los antecedentes genéticos de la aparición del cáncer son las alteraciones en proto-oncogenes, oncogenes y genes supresores tumorales. Los proto-oncogenes son genes normales de la célula que tienen el potencial de convertirse en oncogenes. Todos los oncogenes codifican y funcionan mediante una proteína. En la mayoría de los casos se ha demostrado que son componentes de rutas de transducción de la señal. Los oncogenes aparecen en la naturaleza a partir de proto-oncogenes mediante mutaciones puntuales o translocaciones, dando como resultado de esta manera
15 un estado transformado de la célula que alberga la mutación. El cáncer se desarrolla mediante un proceso multi-etapa que implica varios eventos mutacionales en los oncogenes y supresores tumorales de las células.

En su forma más simple, una única sustitución de bases en un proto-oncogén puede producir que la proteína codificada se diferencie en un aminoácido.

20 En los modelos experimentales que implican tumores murinos, se ha demostrado que las mutaciones puntuales en las "auto"-proteínas intracelulares pueden dar lugar a antígenos de rechazo tumoral que consisten en péptidos que se diferencian en un único aminoácido del péptido normal. Los linfocitos T que reconocen estos péptidos en el contexto de moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) en la superficie de las células tumorales son capaces de destruir las células tumorales y de esta manera se rechaza el tumor del huésped (Boon, T. y col, Cell 1989, Vol. 58, p. 293-303).

25 En las últimas tres décadas, se ha hecho un esfuerzo particular dedicado al análisis de anticuerpos contra antígenos tumorales humanos. Se ha sugerido que dichos anticuerpos se pueden utilizar para fines tanto diagnósticos como terapéuticos, por ejemplo, en conexión con un agente anti-cáncer. Un problema es que los anticuerpos solo se pueden unir a los antígenos tumorales que están expuestos en la superficie de las células tumorales. Por esta razón, los esfuerzos para producir un tratamiento para el cáncer basado en el sistema inmunitario del cuerpo han sido
30 menos satisfactorios de lo esperado.

Los anticuerpos reconocen normalmente antígenos libres en una conformación nativa y pueden reconocer potencialmente casi cualquier sitio expuesto en la superficie del antígeno. Al contrario que con los anticuerpos producidos en los linfocitos B, los linfocitos T reconocen antígenos solo en el contexto de moléculas MHC, denominado HLA (antígeno leucocitario humano) en los seres humanos, y solo después de un procesamiento
35 apropiado del antígeno, que consiste habitualmente en la fragmentación proteolítica de la proteína, dando como resultado péptidos que se ajustan a las moléculas del MHC. Esto hace que los linfocitos T sean capaces de reconocer péptidos derivados de proteínas intracelulares. Los linfocitos T pueden de esta manera reconocer péptidos aberrantes derivados de cualquier sitio en la célula tumoral, cuando se presentan en la superficie de la célula tumoral por las moléculas del MHC. El linfocito T puede activarse posteriormente para eliminar la célula tumoral que alberga el péptido aberrante.
40

Los linfocitos T pueden controlar el desarrollo y crecimiento del cáncer mediante una variedad de mecanismos. Los linfocitos T citotóxicos, tanto de clase HLA O restringidos a CD8+ y Clase HLA II restringidos a CD4+, pueden destruir células tumorales directamente que lleven los antígenos tumorales apropiados. Los linfocitos T auxiliares CD4+ son necesarios para la inducción y el mantenimiento de las respuestas de los linfocitos T citotóxicos, así como
45 para la respuesta de anticuerpos, y para inducir la destrucción por macrófagos y linfocitos citotóxicos activados por linfocinas (linfocitos LAK).

Se han identificado muchos oncogenes y sus productos proteicos. Además, se ha demostrado que el repertorio de linfocitos T de una persona sana incluye linfocitos T con especificidad contra un fragmento peptídico sintético derivado de un producto oncogénico p21 RAS, cuando se presenta sobre una molécula del HLA apropiada. Además,
50 se anticipa que aproximadamente el 20 % de todos los cánceres se asocian con una mutación en el oncogén RAS.

Existe una gran preocupación sobre el uso de mezclas peptídicas para la vacunación de pacientes debido al riesgo de que algunos de los péptidos de la mezcla son inmunodominantes y por lo tanto suprimen la presentación por el HLA de los otros péptidos (Pion S, y col., Blood, 1999 Feb 1; 93(3): p. 952-62). A partir de los experimentos que se han llevado a cabo *in vitro*, se sabe que distintos péptidos de RAS mutados pueden competir por la unión a la
55 molécula HLA responsable de la presentación a los linfocitos T relevantes y que los péptidos de la misma longitud, pero que representan diferentes mutaciones pueden inhibir la unión y reconocimiento de un péptido que representa

otra mutación con diferentes grados de eficacia (T. Gedde-Dahl III y col., Human Immunol. 1994, 33, p. 266-274, y B. H. Johanssen y col., Scand. J. Immunol., 1994, 33, p. 607-612). A partir de estos hechos, el problema de inmunodominancia se ha considerado como un problema para las vacunas de péptidos de RAS mutados.

5 El documento WO 92/14756 desvela péptidos sintéticos y fragmentos de productos proteicos oncogénicos que desencadenan la inmunidad de linfocitos T, para su uso en vacunas contra los cánceres asociados con RAS y composiciones para el tratamiento del cáncer. Los péptidos deben corresponderse con un fragmento activo del oncogén según se presenta en la célula cancerosa e incluye una mutación en una o más posiciones correspondientes con la mutación del oncogén. Este documento desvela mutaciones en la posición 12, 13 y 61 de la proteína RAS y desvela específicamente solo las mutaciones G12A, G12V, G12C, G12S, G12K, G12D, G12R, 10 Q61R, Q61K, Q61L, Q61H, G13V y G13D. Además, aunque este documento menciona que las vacunas pueden comprender una selección de péptidos que tienen las mutaciones más comunes que se encuentran en las proteínas oncogénicas, no sugiere ninguna combinación específica.

15 El documento WO 00/66153 expone mezclas de péptidos sintéticos que desencadenan la inmunidad de linfocitos T para su uso en vacunas para el cáncer. Las mezclas de péptidos consisten en péptidos mutantes p21 de RAS y este documento desvela específicamente solo las mutaciones G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, Q61H, Q61K, Q61L, Q61R y G13D. Este documento también desvela que la repuesta inmunitaria desencadenada por un coctel de péptidos era significativamente mayor que la desencadenada por un único péptido; sin embargo, no sugiere que cualquier otra combinación de péptidos distinta de la que se desvela en él pueda ser útil.

20 El documento GB 2328689 desvela que un péptido capaz de inducir respuestas específicas de linfocitos T citotóxicos (CD8+) comprende 8 a 10 aminoácidos de la proteína proto-oncogénica p21 RAS que incluye la posición que comprende la posición 12 y/o 13, o la posición 61, de la proteína proto-oncogénica p21 RAS y tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 12, 13 o 61. Este documento también desvela que el péptido se puede utilizar como una vacuna para el cáncer y en composiciones para el tratamiento anti-cáncer. Sin embargo, no se desvelan mezclas de péptidos específicas que sean particularmente útiles.

25 Además, ninguno de estos documentos expone cómo los péptidos particulares se asocian con tipos particulares de cáncer, y no afrontan la redundancia de péptidos en la mezcla que comprende un número de péptidos.

30 Gjertsen y col. (Int. J. Cancer 2001, 92, p. 441-450) desvela un ensayo en fase I/II que implica pacientes con adenocarcinoma de páncreas vacunados con péptidos RAS mutantes sintéticos en combinación con un factor estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos. Este ensayo utilizaba vacunas de péptidos únicos o una mezcla de cuatro péptidos mutantes. La vacuna de combinación consistía en las cuatro mutaciones K-RAS más comunes que se encuentran en el adenocarcinoma pancreático, a saber, los péptidos que tienen una mutación, G12V, G12D, G12C o G12R. Sin embargo, este documento no desvela ninguna otra combinación de péptidos que pueda ser útil, no desvela ninguna otra mutación de la proteína RAS que se asocie con el cáncer, y no expone cómo se asocian los péptidos particulares con los tipos particulares de cáncer.

35 Wedén y col. (Int. J. Cancer 2010, 128(5), p. 1120-1128) informa el seguimiento a largo plazo de pacientes con adenocarcinoma pancreático vacunados con péptidos de RAS mutantes sintéticos. La vacuna consistía en un único péptido de RAS o un coctel de siete péptidos de RAS. En particular, los siete péptidos de RAS utilizados en este ensayo tenían una mutación G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V o G13D. Sin embargo, este documento no trata de cómo se asocian los péptidos particulares con tipos particulares de cáncer, y no desvela ninguna 40 combinación de péptidos que pueda ser útil.

45 Hunger y col. (Exp. Dermatol. 2001, 10: 161-167) informa de un estudio clínico piloto de la inmunogenicidad *in vivo* de péptidos RAS con seguridad como el objetivo primario y la inmunogenicidad de péptidos RAS como objetivo secundario. Se inmunizaron pacientes de melanoma intradérmicamente con péptidos N-ras (49-73 restos) con cuatro mutaciones del codón 61. Ocho de los pacientes presentaban respuestas DTH positivas. Sin embargo, este documento no expone cómo se asocian los péptidos particulares con tipos particulares de cáncer, y no desvela ninguna combinación de péptidos que pueda ser útil.

50 Prior y col. (Cancer Res. 2012, 72(10), p. 2457-2467) desvela que diferentes tipos de cáncer están acoplados a la mutación de una isoforma de RAS particular y que cada isoforma tiene una firma de mutación de un codón distintivo. Además, Prior y col. desvela que se producen un total de 18 mutaciones en las posiciones 12, 13 y 61 de la proteína RAS, existiendo seis mutaciones en cada posición. Esta revisión también expone los efectos de estas mutaciones sobre la función de RAS y los mecanismos potenciales que dan lugar a patrones diferenciales de las mutaciones de isoformas de RAS. Sin embargo, este documento no afronta el tratamiento o profilaxis del cáncer, o el problema de la inmunodominancia y la redundancia en una vacuna. Además, no se desvela una vacuna o tratamiento contra el cáncer, y este documento no desvela ninguna combinación de péptidos que pueda ser útil.

55 Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar vacunas adicionales y/o tratamientos contra el cáncer más eficaces. En particular existe la necesidad de proporcionar vacunas y/o tratamientos que se dirigen a cánceres en particular, que superen los problemas de inmunodominancia y redundancia y que sean baratos.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona soluciones a los problemas expuestos anteriormente debido a que se ha descubierto que las mezclas de péptidos que comprenden al menos dos péptidos tienen mutaciones puntuales en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS, en las que cada péptido tiene una mutación diferente, se pueden utilizar como una vacuna contra y/o un tratamiento para los cánceres asociados con la mutación en la proteína RAS. En particular, se ha descubierto que al menos algunas mezclas de péptidos de la presente invención se pueden utilizar como vacunas contra y/o tratamientos para más del 99 % de los cánceres asociados con mutaciones en las proteínas RAS. Las mezclas de péptidos de la presente invención alivian los problemas de inmunodominancia y reducen la redundancia de ingredientes activos en una composición farmacéutica, haciendo de esta manera que las mezclas de péptidos sean vacunas y/o tratamientos más baratos. Además, la presente invención permite que la vacunación y/o tratamiento se dirija a tipos específicos de cáncer y procedimientos de selección de mezclas de péptidos dirigidas a tipos específicos de cáncer.

Por lo tanto, la invención proporciona una mezcla de péptidos adecuada para desencadenar una respuesta inmunitaria que comprende, un primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, y octavo péptido, que corresponde cada uno a un fragmento de la proteína RAS en la que: el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, y octavo péptido son:

un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21,
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y
 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26,
 y en el que cada uno de los péptidos comprende no más de 30 aminoácidos.

Ventajosamente, cada uno del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, y octavo péptido no contiene más de 28, 26, 24, 22, 20 o 18 aminoácidos.

Preferentemente el primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo péptido son:

un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21,
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y
 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una mezcla de linfocitos T que comprende linfocitos T específicos para cada uno de los péptidos de las mezclas de péptidos de la invención, cuando se presentan sobre una molécula del MHC.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la mezcla de péptidos o la mezcla de linfocitos T de la invención, y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una mezcla de péptidos de la invención, una mezcla de linfocitos T de la invención o una composición farmacéutica de la invención, para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer en un paciente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una mezcla de péptidos de la invención, una mezcla de linfocitos T de la invención o una composición farmacéutica de la invención, para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es cáncer colorrectal, pulmonar y/o pancreático.

Ventajosamente, dicho uso comprende la identificación de la sustitución de aminoácidos de la proteína RAS presente en una muestra que se toma del paciente.

El cáncer puede ser un cáncer de glándula adrenal, ganglios autónomos, tracto biliar, hueso, mama, sistema nervioso central, de cuello uterino, colorrectal, endometrial, hematopoyético, linfóide, de riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, esófago, ovario, pancreático, próstata, glándula salivar, piel, intestino delgado, estómago, testicular, timo, tiroides, tracto aerodigestivo superior y tracto urinario y/o melanoma maligno.

En algunos casos, el cáncer puede ser un cáncer colorrectal, pulmonar y/o pancreático.

La mezcla de péptidos, péptido, péptido para su uso, mezcla de linfocitos T, preparación de linfocitos T o composición farmacéutica pueden ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del melanoma maligno.

Como se desvela en el presente documento, el uso de mezclas de péptidos, linfocitos T o composiciones farmacéuticas de la invención en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer puede comprender:

- 5 i) identificar las mutaciones en la proteína RAS presentes en una muestra tomada de un paciente;
 ii) seleccionar una mezcla de péptidos de la invención que comprende un péptido que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra; o seleccionar un péptido para su uso como se desvela en el presente documento que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra; o
 10 seleccionar un péptido como se desvela en el presente documento que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una mutación de la proteína RAS identificada en la muestra; o seleccionar una mezcla de linfocitos T de la invención o preparación del linfocitos T como se desvela en el presente documento, que comprende linfocitos T específicos de un péptido, cuando se presenta sobre una molécula del MHC, que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS
 15 identificada en la muestra; o seleccionar una composición farmacéutica de la invención o como se desvela en el presente documento que comprende una mezcla de péptidos, un péptido para su uso como una vacuna o un medicamento o un péptido que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra, o una mezcla de linfocitos T o preparación del linfocitos T que comprende linfocitos T específicos de un péptido, cuando se presenta sobre una molécula del
 20 MHC, que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra y
 iii) administrar la mezcla de péptidos, el péptido para su uso, mezcla de linfocitos T o preparación de linfocitos T al paciente.

25 También se desvela en el presente documento un procedimiento de selección de una mezcla de péptidos, un péptido para su uso en una vacuna o un medicamento, un péptido, una mezcla de linfocitos T, una preparación de linfocitos T o una composición farmacéutica para la administración a un paciente que comprende:

- i) identificar las mutaciones en la proteína RAS presentes en una muestra tomada de un paciente;
 ii) seleccionar una mezcla de péptidos de la invención que comprende un péptido que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra; o
 30 seleccionar un péptido para su uso como se desvela en el presente documento que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra; o seleccionar un péptido como se desvela en el presente documento que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una mutación de la proteína RAS identificada en la muestra; o seleccionar una
 35 mezcla de linfocitos T de la invención o preparación del linfocitos T como se desvela en el presente documento, que comprende linfocitos T específicos de un péptido, cuando se presenta sobre una molécula del MHC, que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra; o seleccionar una composición farmacéutica de la invención o como se desvela en el presente documento que comprende una mezcla de péptidos, un péptido para su uso como una vacuna o un medicamento o un péptido que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las
 40 mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra, o una mezcla de linfocitos T o preparación del linfocitos T que comprende linfocitos T específicos de un péptido, cuando se presenta sobre una molécula del MHC, que comprende una mutación puntual correspondiente a al menos una de las mutaciones de la proteína RAS identificada en la muestra.

45 Adicionalmente se desvela en el presente documento el uso de una mezcla de péptidos de la invención, un péptido para su uso como se desvela en el presente documento o un péptido como se desvela en el presente documento para la preparación de una mezcla de linfocitos T o una preparación de linfocitos T de la invención o como se desvela en el presente documento.

Las mezclas de péptidos de la invención, y los péptidos para su uso y los péptidos descritos posteriormente se asila de su ambiente natural.

50 El término "péptido" como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero de restos de aminoácidos que es (o tiene una secuencia que se corresponde a) un fragmento de una proteína más larga. El término también se aplica a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un resto modificado, o un resto de origen no natural, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

55 El porcentaje de "identidad" entre dos secuencias se puede determinar utilizando la versión 2.2. del algoritmo BLASTP (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) utilizando los parámetros por defecto. En particular, se puede acceder al algoritmo BLAST en internet utilizando la URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

La expresión “respuesta inmunitaria”, como se utiliza en el presente documento, se refiere en algunas realizaciones a una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a la presentación de un péptido por las moléculas de histocompatibilidad principal (MHC) en la superficie de las células, y en particular se refiere a la activación de linfocitos T a la presentación del péptido.

- 5 La expresión “proteína RAS”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la clase de pequeñas GTPasas proteicas codificadas por el proto-oncogén *ras* e incluye las tres isoformas de la proteína RAS: HRAS, KRAS y NRAS. En algunas realizaciones, la expresión “proteína RAS” se refiere a la proteína correspondiente al número P01112.1 de UniProtKB/Swiss-Prot y como se muestra en la SEQ ID NO: 33.

- 10 La expresión “posición 13 de la proteína RAS”, como se utiliza en el presente documento, se refiere al decimotercer aminoácido de la cadena de aminoácido que forma la estructura primaria de la proteína RAS de tipo silvestre, contando a partir del extremo N.

La expresión “posición 12 de la proteína RAS”, como se utiliza en el presente documento, se refiere al decimosegundo aminoácido de la cadena de aminoácido que forma la estructura primaria de la proteína RAS de tipo silvestre, contando a partir del extremo N.

- 15 La expresión “posición 61 de la proteína RAS”, como se utiliza en el presente documento, se refiere al sexagésimo primer aminoácido de la cadena de aminoácido que forma la estructura primaria de la proteína RAS de tipo silvestre, contando a partir del extremo N.

- 20 La expresión “el aminoácido correspondiente a la posición 13”, como se utiliza en el presente documento, significa un aminoácido en un péptido de una proteína RAS localizada en la cadena de aminoácidos del péptido en una posición correspondiente al decimotercer aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína RAS, contando a partir del extremo N. Se atribuyen significados correspondientes a las expresiones “el aminoácido correspondiente a la posición 12” y “el aminoácido correspondiente a la posición 61”.

- 25 La expresión “mezcla de péptidos”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a dos o más péptidos que se mezclan, pero no se combinan químicamente. Las mezclas pueden estar presentes en un polvo seco, solución, suspensión o coloide, y pueden ser homogéneas o heterogéneas.

La expresión “mutaciones de la proteína RAS”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una o más mutaciones puntuales presentes en las proteínas RAS presentes en una muestra tomada de un sujeto.

La expresión “mutación puntual” como se utiliza en el presente documento, se refiere a la sustitución de un único resto de aminoácido en la cadena polipeptídica de un producto proteico con un resto de aminoácido diferente.

- 30 La expresión, por ejemplo “una mutación G12V”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una mutación puntual que da como resultado que una glicina (G) en la posición 12 de la proteína RAS de tipo silvestre se ha sustituido por una valina (V). Se aplican definiciones similares a expresiones similares, tales como G13C, G13R, Q61H, etc.

- 35 La expresión “composición farmacéutica”, como se utiliza en el presente documento, significa una preparación adecuada para la administración a un sujeto animal o humano al que se dirige con fines terapéuticos.

Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es un gráfico que muestra la incidencia de mutaciones de RAS presente en todos los cánceres.

- 40 La Figura 2 es un gráfico que muestra la incidencia respectiva de las mutaciones de RAS en todos los cánceres correspondientes a los péptidos en mezclas de dos péptidos (TG02 y TG03) desveladas en el presente documento.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la incidencia respectiva de las mutaciones de RAS en el cáncer pulmonar correspondientes a los péptidos de las mezclas de dos péptidos (TG02 y TG03) desveladas en el presente documento.

- 45 La Figura 4 es un gráfico que muestra la incidencia respectiva de las mutaciones de RAS en el cáncer colorrectal correspondientes a los péptidos de las mezclas de dos péptidos (TG02 y TG03) desveladas en el presente documento.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la incidencia respectiva de las mutaciones de RAS en el melanoma maligno correspondientes a los péptidos de las mezclas de dos péptidos (TG02 y TG03) desveladas en el presente documento.

- 50 La Figura 6 es un gráfico que muestra la respuesta proliferativa de linfocitos T a tres rondas de estimulación *in vitro* con una mezcla de un péptido de RAS que tiene una mutación G13C (SEQ ID NO: 19) y un péptido de RAS que tiene una mutación G13R (SEQ ID NO: 27), en donantes sanos. APC: células presentadoras de antígeno

(PBMC), CPM: recuentos por minuto.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la respuesta proliferativa de linfocitos T a tres rondas de estimulación *in vitro* con una mezcla de un péptido de RAS que tiene una mutación G13C (SEQ ID NO: 19), un péptido G13D (SEQ ID NO: 20), un péptido G12A (SEQ ID NO: 21), un péptido G12C (SEQ ID NO: 22), un péptido G12D (SEQ ID NO: 23), un péptido G12R (SEQ ID NO: 24), un péptido G12S (SEQ ID NO: 25), un péptido G12V (SEQ ID NO: 26) y un péptido G13R (SEQ ID NO: 27), en un donante sano. APC: células presentadoras de antígeno (PBMC), CPM: recuentos por minuto.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la respuesta de linfocitos T al péptido de RAS G13C (SEQ ID NO: 19) después de tres rondas de estimulación *in vitro* con TG02+13R, en un donante sano. APC: células presentadoras de antígeno (PBMC), CPM: recuentos por minuto.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la respuesta proliferativa de los esplenocitos recolectados de ratones vacunados con una mezcla de péptidos de RAS (TG02 ; ratón nº 4 y nº 7) y TG02 + Viscogel™ (ratón nº 24, nº 29 y nº 30). ConA: Concanavalina A (control positivo).

Breve descripción del listado de secuencias

15 La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G13C.
 La SEQ ID NO: 2 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G13R
 La SEQ ID NO: 3 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G13D
 La SEQ ID NO: 4 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G13V
 La SEQ ID NO: 5 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G13A
 20 La SEQ ID NO: 6 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G13S
 La SEQ ID NO: 7 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G12A
 La SEQ ID NO: 8 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G12C
 La SEQ ID NO: 9 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G12D
 La SEQ ID NO: 10 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G12R
 25 La SEQ ID NO: 11 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G12S
 La SEQ ID NO: 12 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación G12V
 La SEQ ID NO: 13 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación Q61R
 La SEQ ID NO: 14 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación Q61K
 La SEQ ID NO: 15 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación Q61H
 30 La SEQ ID NO: 16 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación Q61L
 La SEQ ID NO: 17 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación Q61E
 La SEQ ID NO: 18 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS que tiene una mutación Q61P
 La SEQ ID NO: 19 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G13C
 35 La SEQ ID NO: 20 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G13D
 La SEQ ID NO: 21 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G12A
 La SEQ ID NO: 22 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G12C
 40 La SEQ ID NO: 23 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G12D
 La SEQ ID NO: 24 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G12R
 45 La SEQ ID NO: 25 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G12S
 La SEQ ID NO: 26 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG02 que tiene una mutación G12V
 La SEQ ID NO: 27 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG03 que tiene una mutación G13R
 50 La SEQ ID NO: 28 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG03 que tiene una mutación G13V
 La SEQ ID NO: 29 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG03 que tiene una mutación Q61R
 55 La SEQ ID NO: 30 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG03 que tiene una mutación Q61K
 La SEQ ID NO: 31 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG03 que tiene una mutación Q61H
 La SEQ ID NO: 32 muestra una secuencia de aminoácidos del péptido de RAS de TG03 que tiene una mutación Q61L
 60 La SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia de aminoácidos completa de la proteína RAS de tipo silvestre.

Descripción detallada de la invención

Se desvela en el presente documento una mezcla de péptidos que comprenden al menos un primer y un segundo péptidos de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, en el que cada uno del al menos primer y segundo péptido tiene una mutación puntual en la posición 13, y en el que las mutaciones en la posición 13 son diferentes entre ellas.

Los péptidos de la mezcla pueden ser péptidos de cualquiera de HRAS, KRAS o NRAS. Las tres isoformas de RAS comparten identidad de secuencia en todas las regiones responsables de la unión GDP/GTP, es decir, las regiones sometidas a mutación en el cáncer.

Como se desvela en el presente documento, cada uno del primer y segundo péptido comprende independientemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 20, al menos 24 o al menos 30 aminoácidos. Cada uno del primer y segundo péptido puede comprender al menos 8 aminoácidos. De manera alternativa, cada uno del primer y segundo péptido puede comprender al menos 17 aminoácidos.

Cada uno del primer y segundo péptido independientemente puede tener no más de 30 aminoácidos. Por ejemplo, cada uno del primer y segundo péptido puede comprender independientemente no más de 28, 26, 24, 22, 20, 18, 17, 16, 14, 12, 10 o 8 aminoácidos en algunos casos. Cada uno del primer y segundo péptido puede comprender no más de 17 aminoácidos.

Como se desvela en el presente documento, cada uno del primer y segundo péptido puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 con la proteína RAS. En algunas alternativas, cada uno del primer y segundo péptido puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6. Cada uno del primer y segundo péptido puede tener independientemente al menos un 95 % de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6. Cada uno del primer y segundo polipéptido puede tener independientemente un 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6. Por ejemplo, el primer péptido puede tener un porcentaje de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6 y el segundo péptido puede tener un porcentaje de secuencia de identidad diferente en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6 diferente. De manera alternativa, el primer péptido puede tener un porcentaje de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6 y el segundo péptido puede tener el mismo porcentaje de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de una de las SEQ ID NO: 1-6 diferente. En todas las divulgaciones del presente documento cada uno del primer y segundo péptido es capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria.

Cada uno del primer y segundo péptido de la mezcla de péptidos puede tener una mutación puntual en la posición 13 de la proteína RAS, en el que la mutación puntual en el primer péptido es diferente de la mutación puntual del segundo péptido. La proteína RAS de tipo silvestre comprende glicina (G) en la posición 13. Por lo tanto, la mutación en la posición 13 puede ser una mutación puntual de glicina en cualquier otro aminoácido. Sin embargo, se ha descubierto que las mutaciones G13A, G13C, G13D, G13R, G13S y G13V están particularmente asociadas con el cáncer. Por lo tanto, la mutación puntual de cada uno del primer y segundo péptido puede ser independientemente una de las mutaciones G13A, G13C, G13D, G13R, G13S y G13V. Como se desvela en el presente documento, la mutación puntual en la posición 13 de uno del primer y segundo péptido puede ser independientemente una mutación G13C o G13R. También se desvela en el presente documento, la mutación puntual en la posición 13 de uno del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13C. Como se desvela en el presente documento, la mutación puntual en la posición 13 de uno del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13R.

Como se desvela en el presente documento, la mutación puntual en la posición 13 del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13C y la mutación puntual en la posición 13 del otro péptido puede ser una mutación G13D.

De manera alternativa, la mutación puntual en la posición 13 del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13R y la mutación puntual en la posición 13 del otro péptido puede ser una mutación G13V.

En alternativas adicionales, la mutación puntual en la posición 13 del primer o segundo péptido puede ser una mutación G13C y la mutación puntual en la posición 13 del otro péptido puede ser G13R.

La mezcla peptídica puede comprender al menos un tercer péptido de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. El al menos tercer péptido puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS que es diferente a las

mutaciones en la posición 13 del primer y segundo péptido. La mutación puntual puede ser una de las mutaciones G13A, G13C, G13D, G13R, G13S y G13V, independientemente de las mutaciones puntuales del primer y segundo péptido. Como se desvela en el presente documento, el primer péptido puede tener una mutación G13C, el segundo péptido puede tener una mutación G13D y el tercer péptido puede tener una mutación G13R.

- 5 La mezcla de péptidos puede comprender adicionalmente al menos un péptido adicional de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos. Dicha región del al menos un péptido adicional puede incluir la posición 12 de la proteína RAS. Dicha región del al menos un péptido adicional puede incluir la posición 61 de la proteína RAS.

10 Cuando la mezcla de péptidos comprende al menos un tercer péptido, cada uno de los péptidos puede comprender independientemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 20, al menos 24 o al menos 30 aminoácidos. Cada uno de los péptidos puede comprender al menos 8 aminoácidos. De manera alternativa, cada uno de los péptidos puede comprender al menos 17 aminoácidos. En alternativas adicionales, cada uno de los péptidos puede comprender al menos 18 aminoácidos. En general, cada péptido de la mezcla de péptidos puede comprender un número diferente de aminoácidos respecto a uno o más de los otros péptidos de la mezcla de péptidos. En algunas alternativas, cada péptido de la mezcla de péptidos puede comprender no más de 30 aminoácidos. Por ejemplo, cada péptido de la mezcla de péptidos puede comprender independientemente no más de 28, 26, 24, 22, 20, 18, 17, 16, 14, 12, 10 o 8 aminoácidos. Como se desvela en el presente documento, cada péptido de la mezcla de péptidos puede comprender no más de 17 aminoácidos.

20 Cuando la mezcla de péptidos comprende al menos un péptido adicional que comprende una región que incluye la posición 12 de la proteína RAS, el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS puede tener una mutación puntual. En la proteína RAS de tipo silvestre, el aminoácido de la posición 12 es la glicina (G). Por lo tanto, la mutación puntual en la posición 12 puede ser con un aminoácido distinto de glicina. Cada mutación puede ser, independientemente, una mutación G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o G12V. Como se desvela en el presente documento, el al menos un péptido adicional puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencias en posiciones distintas a la región que incluye la posición 12 con la proteína RAS. Como se desvela en el presente documento, el al menos un péptido adicional puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de secuencia de identidad en posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 con respecto a una de las SEQ ID NO: 7-12 y 21-26. Como también se desvela en el presente documento, puede haber más de un péptido adicional de la proteína RAS que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluya la posición 12 de la proteína RAS y que tenga una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS. En dichas mezclas de péptidos, cada uno de los péptidos que tienen una mutación en la posición 12 puede tener una mutación puntual diferente.

40 Cuando la mezcla de péptidos comprende al menos un péptido adicional que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 61 de la proteína RAS, el aminoácido correspondiente a la posición 61 de la proteína RAS puede tener una mutación puntual. En la proteína RAS de tipo silvestre, el aminoácido en la posición 61 es glutamina (Q). Por lo tanto, la mutación puntual en la posición 61 puede ser un aminoácido distinto de la glutamina. La mutación puntual puede ser una mutación Q61E, Q61H, Q61K, Q61L, a Q61P o a Q61R. Como se desvela en el presente documento, el al menos un péptido adicional puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 61 de la proteína RAS. De manera alternativa, el al menos un péptido adicional puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia respecto a una de las SEQ ID NO: 13-18 y 29-32. Puede haber más de un péptido adicional de la proteína RAS que comprenda una región de al menos 8 aminoácidos que incluya la posición 61 de la proteína RAS y que tenga una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 61 de la proteína RAS. En dichos casos, cada uno de los péptidos que tienen una mutación en la posición 61 puede tener una mutación puntual diferente.

55 La mezcla de péptidos puede comprender adicionalmente al menos dos péptidos de la proteína RAS, que comprende cada uno una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 o 61 de la proteína RAS. En dichos casos, los al menos dos péptidos adicionales pueden comprender al menos un péptido que tiene una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 12 de la proteína RAS, que tiene una mutación puntual en el aminoácido que corresponde a la posición 12 de la proteína RAS, y al menos un péptido que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 61 de la proteína RAS, que tiene una mutación puntual en el aminoácido que se corresponde con la posición 61 de la proteína RAS. La mutación puntual en la posición 12 puede ser una de las mutaciones G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o a G12V. La mutación puntual en la posición 61 puede ser una de las mutaciones Q61E, Q61H, Q61K, Q61L, a Q61P, o a Q61R. El al menos un péptido que incluye la posición 12 de la proteína RAS puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un

95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 de la proteína RAS. Como se desvela en el presente documento, el al menos un péptido adicional que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con las posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 respecto a una de las SEQ ID NO: 7-12 y 21-26. El al menos un péptido que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 61 de la proteína RAS puede tener al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de secuencia de identidad con posiciones distintas de la región que incluye la posición 61 respecto a una de las SEQ ID NO: 13-18 y 29-32. Cualquier combinación de las mutaciones y SEQ ID NO mencionadas anteriormente están contempladas en las mezclas desveladas en el presente documento.

La mezcla de péptidos puede consistir en un péptido que tiene una mutación G13C, un péptido que tiene una mutación G13D, un péptido que tiene una mutación G12A, un péptido que tiene una mutación G12C, un péptido que tiene una mutación G12D, un péptido que tiene una mutación G12R, un péptido que tiene una mutación G12S, y un péptido que tiene una mutación G12V. En dichas alternativas, la mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente de las SEQ ID NO: 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, y 12. La mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente de las SEQ ID NO: 19-26. Se hace referencia a esta mezcla de péptidos como TG02 cuando hay un 100 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 19-26. La Tabla 4 y la Figura 2 muestra los péptidos que se presentan preferentemente en TG02. La incidencia de estas mutaciones en cánceres asociados con una mutación en RAS, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal se muestra en las Figuras 1, 3 y 4 respectivamente. Los resultados de un ensayo de proliferación de esplenocitos, a continuación de la vacunación de ratones con TG02, se muestran en la Figura 9, y demuestran que la TG02 es eficaz en la inducción de una respuesta inmunitaria.

De manera alternativa, la mezcla de péptidos puede consistir en un péptido que tiene una mutación G13R, un péptido que tiene una mutación G13V, un péptido que tiene una mutación Q61H, un péptido que tiene una mutación Q61K, un péptido que tiene una mutación Q61L, y un péptido que tiene una mutación Q61R. La mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye las posiciones 13 y 61 respectivamente respecto a las SEQ ID NO: 2, 4, 13, 14, 15 y 16. De manera alternativa, la mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con las posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 o 61 respectivamente de las SEQ ID NO: 27-32. Se hace referencia a esta mezcla de péptidos en el presente documento como TG03 cuando hay una secuencia de identidad del 100 % respecto a las SEQ ID NO: 27-32. La Tabla 5 y la Figura 2 muestran los péptidos de TG03. La incidencia de estas mutaciones en el melanoma maligno se muestra en la Figura 5.

La mezcla de péptidos puede consistir en un péptido que tiene una mutación G13C, un péptido que tiene una mutación G13D, un péptido que tiene una mutación G13R, un péptido que tiene una mutación G12A, un péptido que tiene una mutación G12C, un péptido que tiene una mutación G12D, un péptido que tiene una mutación G12R, un péptido que contienen una mutación G12S, y un péptido que tiene una mutación G12V. La mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Alternativamente, la mezcla de péptidos puede consistir en péptidos que tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye las posiciones 12 o 13 respectivamente de las SEQ ID NO: 19-27. Los resultados de un ensayo de proliferación de linfocitos T, después de la estimulación *in vitro* de las PBMC con esta mezcla de péptidos se muestra en la Figura 7, y demuestra que los linfocitos T se estimulaban con esta mezcla. Por lo tanto, las mezclas de péptidos de la invención y como se desvela en el presente documento son eficaces en la inducción de una respuesta inmunitaria.

En general, los péptidos desvelados en el presente documento, en una región de 8 aminoácidos que incluyen la posición 12, 13, o 61, tienen al menos 6 restos de aminoácidos, distintos del resto en la posición 12, 13, o 61, respectivamente, que son idénticos a la región correspondientes de la proteína RAS. Además, en general, los péptidos desvelados en el presente documento, en posiciones distintas de la región que incluye la posición 12, 13 o

61 de la proteína RAS puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia respecto a una de las SEQ ID NO: 1-32, respectivamente.

5 En algunas mezclas, la mezcla de péptidos puede consistir en un primero, segundo, tercero y cuarto péptido, en la que el primer y segundo péptido es como se ha descrito anteriormente. Cada uno del tercer y cuarto péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 13 de la proteína RAS, y cada uno del tercer y cuarto péptido tienen independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de la proteína RAS. Cada uno del tercer y cuarto péptido puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 37 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o 100 % de identidad con posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 respecto a una de las SEQ ID NO: 1-6, 19, 20, 27 o 28. Cada uno del tercer y cuarto péptido tiene una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS, y cada uno del primer, segundo, tercer y cuarto péptido tiene una mutación puntual que es diferentes de las mutaciones puntuales de los otros péptidos. En una mezcla, el primer péptido es un péptido que tiene una mutación G13R, el segundo péptido es un péptido que tiene la mutación G13A, el tercer péptido es un péptido que tiene una mutación G13S y el cuarto péptido es un péptido que tiene la mutación G13V.

20 En algunas mezclas de péptidos, hay un máximo de 8 péptidos diferentes en la mezcla de péptidos. En algunas mezclas de péptidos, hay un máximo de 9 péptidos diferentes en la mezcla de péptidos. En otras mezclas de péptidos, hay un máximo de 10, 12, 14 o 16 péptidos diferentes. Cuando la mezcla de péptidos comprende al menos un péptido adicional que comprende una región que incluye la posición 12 de la proteína RAS, la mezcla de péptidos puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 12 de la proteína RAS y que tienen una mutación puntual en la posición correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS. Cuando la mezcla de péptidos comprende al menos un péptido adicional que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 61 de la proteína RAS, la mezcla de péptidos puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 péptidos que comprenden una región que incluye la posición 61 de la proteína RAS y que tiene una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 61 de la proteína RAS, en el que cada uno de los péptidos tiene una mutación puntual diferente.

En algunas mezclas de péptidos, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 13 de la proteína RAS puede comprender las posiciones 1 a 30 de la proteína RAS. En mezclas de péptidos alternativas, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 13 de la proteína RAS puede comprender las posiciones 5 a 21 de la proteína Ras. En mezclas de péptidos adicionales, los aminoácidos correspondientes a la posición 13 de la proteína Ras puede estar en el extremo C del péptido. En mezclas de péptidos adicionales, el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS puede estar en el extremo N del péptido. En general, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS puede consistir en 8 posiciones cualquiera de la proteína RAS que incluya la posición 13. Por ejemplo, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 puede consistir en aminoácidos desde la posición 6 a la posición 13, la posición 7 a la posición 13, la posición 8 a la posición 15, la posición 9 a la posición 16, la posición 10 a la posición 17, la posición 11 a la posición 18, la posición 12 a la posición 19, o la posición 13 a la posición 20 de la proteína RAS.

Como se desvela en el presente documento, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la región 12 de la proteína RAS puede comprender las posiciones 1 a 30 de la proteína RAS. En otras mezclas de péptidos, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 12 de la proteína Ras puede comprender las posiciones 5 a 21 de la proteína RAS. En mezclas de péptidos alternativas, el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína Ras puede estar en el extremo C del péptido. En mezclas de péptidos adicionales, el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS puede estar en el extremo N del péptido. En general, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS puede consistir en cualquiera de las 8 posiciones de la proteína RAS que incluyen la posición 12. Por ejemplo, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 consiste en los aminoácidos de la posición 5 a la posición 12, la posición 6 a la posición 13, la posición 7 a la posición 14, la posición 8 a la posición 15, la posición 9 a la posición 16, la posición 10 a la posición 17, la posición 11 a la posición 18 o la posición 12 a la posición 19 de la proteína RAS.

55 En algunas mezclas de péptidos, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 61 de la proteína RAS pueden comprender las posiciones 47 a 76 de la proteína Ras. En otras mezclas de péptidos, los péptidos que comprenden una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 61 de la proteína RAS puede comprender las posiciones 52 a 69 de la proteína RAS. En mezclas de péptidos alternativas, el aminoácido correspondiente a la posición 61 de la proteína RAS puede estar en el extremo C del péptido. En mezclas de péptidos adicionales, el aminoácido correspondiente a la posición 61 de la proteína RAS puede estar en el extremo N del péptido. En general, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 61 de la proteína RAS puede consistir en cualquiera de las 8 posiciones de la proteína RAS que incluye la posición 61. Por

ejemplo, la región que tiene al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 61 puede consistir en los aminoácidos de la posición 45 a la posición 61, la posición 55 a la posición 62, la posición 56 a la posición 63, la posición 57 a la posición 64, la posición 58 a la posición 65, la posición 59 a la posición 66, la posición 60 a la posición 67 o la posición 61 a la posición 68 de la proteína RAS.

5 Las mezclas de péptidos pueden contener los péptidos en proporciones iguales o diferentes. En algunas mezclas de péptidos, el primer y segundo péptido puede estar presente en la mezcla en igual proporción, es decir, cada péptido comprende un 50 % del componente peptídico de la mezcla de péptidos. En otras mezclas de péptidos puede haber una proporción mayor del primer péptido en la mezcla de péptidos que del segundo péptido. Por ejemplo, el primer péptido puede comprender al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % del componente peptídico de la mezcla de péptidos. En mezclas de péptidos alternativas, existe una mayor proporción del segundo péptido en la mezcla de péptidos que del primer péptido. Por ejemplo, el segundo péptido puede comprender al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % del componente peptídico de la mezcla de péptidos. En mezclas de péptidos que comprenden al menos un péptido adicional, los péptidos pueden estar presentes en el componente peptídico de la mezcla de péptidos en proporciones iguales. En otras mezclas de péptidos, el primer, segundo y el al menos un péptido adicional pueden estar presentes en proporciones diferentes entre ellos. Por ejemplo, cada uno del primer, segundo y al menos un péptido adicional pueden comprender independientemente al menos un 1 %, al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % del componente peptídico de la mezcla de péptidos.

20 Las mezclas de péptidos alternativas incluyen una mezcla de péptidos que comprenden al menos cinco péptidos de la proteína RAS en la que cada uno de los cinco péptidos comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. Cada uno de los al menos cinco péptidos pueden tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintas de la región que incluye la posición 13 de la proteína RAS, y/o independientemente tiene al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad de secuencia en posiciones distintos de la región que incluye la posición 13 respecto a una de las SEQ ID NO: 1-6, 19, 20, 27 y 28. Cada uno de los cinco péptidos puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS, seleccionada independientemente de entre una mutación G13A, G13C, G13D, G13R, G13S o G13V, y la mutación puntual de cada péptido es diferentes de la mutación puntual de los otros péptidos.

35 La mezcla de péptidos adecuada para desencadenar una respuesta inmunitaria puede consistir en seis péptidos de la proteína RAS en la que cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 12 de la proteína RAS. Cada uno de los péptidos puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 de la proteína Ras, y/o independientemente tiene al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 de una de las SEQ ID NO: 7-12 y 21-26. Cada uno de los péptidos puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 12 de la proteína RAS, que se selecciona de entre una mutación G12A, G12C, G12D, G12R, G12S o G12V, y la mutación puntual de cada péptido puede ser diferente de la mutación puntual de los otros péptidos.

45 La mezcla de péptidos adecuada para desencadenar una respuesta inmunitaria puede consistir en un primer, segundo, tercero y cuarto péptido de la proteína Ras, en la que cada uno del primer, segundo y tercer péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluyen la posición 12 de la proteína RAS, y el cuarto péptido de la proteína RAS comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. Cada uno del primer, segundo, tercero y cuarto péptido puede tener independientemente al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad de secuencia como posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 o 13 respectivamente en la proteína RAS, y/o independientemente tiene al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 66 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 95 %, al menos un 99 % o el 100 % de identidad de secuencia con posiciones distintas de la región que incluye la posición 12 o 13 respectivamente respecto a una de las SEQ ID NO: 7-12, 21-26 1-6, 19, 20, 27 y 28, respectivamente. Cada uno del primer, segundo, tercer y cuarto péptido puede tener una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a dicha posición 12 o 13 de la proteína RAS, respectivamente. En algunas mezclas de péptidos, el primer péptido puede ser un péptido que tiene una mutación G12A, el segundo puede ser un péptido que tiene una mutación G12R, el tercer péptido puede ser un péptido que tenga una mutación G12S, y el cuarto péptido puede ser un péptido que tenga una mutación G13C.

Se desvela en el presente documento un péptido adecuado para desencadenar una respuesta inmunitaria que

corresponde con un fragmento de la proteína RAS. El péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS y la región de al menos 8 aminoácidos que tiene al menos 6 restos de aminoácido, distintos de los de la posición 13, que son idénticos a la región correspondiente de la proteína RAS. El péptido tiene una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS que es una de las mutaciones G13C o G13R. En algunos casos, el péptido puede tener una mutación G13C. En otros casos, el péptido puede tener una mutación G13R. La estimulación de linfocitos T con dicho péptido inducía una respuesta proliferativa (Figura 8), indicando que dichos péptidos son capaces de inducir una respuesta inmunitaria. El péptido correspondiente a un fragmento de la proteína RAS, y que comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, puede comprender no más de 30 restos de aminoácido. Por ejemplo, el péptido puede comprender no más de 28, 26, 24, 22, 20, 18, 17, 16, 14, 12, 10 u 8 aminoácidos. El péptido puede comprender no más de 17 aminoácidos.

También se desvela en el presente documento un péptido para su uso como una vacuna o medicamento. El péptido se corresponde con un fragmento de la proteína RAS y comprende una región de al menos aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS. La región de al menos 8 aminoácidos tiene al menos 6 restos de aminoácido, distintos del de la posición 13, que son idénticos a la región correspondiente de la proteína RAS. El péptido para su uso como una vacuna o medicamento tiene una mutación puntual en el aminoácido correspondiente a la posición 13 de la proteína RAS que es una de las mutaciones G13C y G13R.

Los péptidos desvelados en el presente documento son péptidos que se corresponden con los fragmentos de la proteína RAS presentados por moléculas del MHC II en la superficie de las células. Por lo tanto, los péptidos son péptidos que se corresponden con fragmentos de proteína que resultan de la degradación proteolítica de las proteínas RAS, que entonces se pueden presentar sobre las moléculas del HLA y contra la que los individuos en general tiene un linfocito T reactivo en su repertorio de linfocitos T. Como se muestra en las Figuras 6-8, las mezclas de péptidos de acuerdo con realizaciones de la presente invención y los péptidos desvelados en el presente documento inducían una respuesta proliferativa de linfocitos T, ya que la vacunación de ratones con mezclas de péptidos de las realizaciones de la invención inducía la proliferación de esplenocitos (Figura 9).

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una mezcla de linfocitos T que comprende linfocitos T específicos para cada uno de los péptidos de una de las mezclas de péptidos de acuerdo con las divulgaciones anteriores. También se desvela una preparación de linfocitos T que comprende linfocitos T específicos de un péptido de acuerdo con las divulgaciones anteriores, cuando se presentan sobre una molécula del MHC. La mezcla de linfocitos T o la preparación puede producirse estimulando al menos un linfocito T reactivo con una mezcla de péptidos que comprende un primer y un segundo péptido de la proteína RAS, o un péptido de la proteína RAS. Por ejemplo, la mezcla de linfocitos T puede comprender una pluralidad de linfocitos T en la que un primer y un segundo linfocito T son específicos de un primer y segundo péptido, respectivamente, correspondientes a un fragmento de la proteína Ras, en el que cada péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, en el que cada uno del primer y segundo linfocito T es específico para una mutación puntual en el aminoácido del péptido correspondiente a dicha posición 13 y la mutación puntual para la cual es específico el primer linfocito T es diferentes de la mutación puntual para la cual es específico el segundo linfocito T. De manera alternativa, por ejemplo, la preparación de linfocitos T puede comprender una pluralidad de linfocitos T específicos para un péptido correspondiente a un fragmento de la proteína RAS, en el que el péptido comprende una región de al menos 8 aminoácidos que incluye la posición 13 de la proteína RAS, en el que cada linfocito T es específico para una mutación puntual en el aminoácido del péptido correspondiente a dicha posición 13.

Las mezclas de péptidos, péptidos, mezclas de linfocitos T y preparaciones de linfocitos T de la presente invención y como se desvelan en el presente documento son para el uso en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, y en particular cánceres asociados con mutaciones en el oncogén Ras. Los cánceres pueden incluir el cáncer de glándula adrenal, ganglios autónomos, tracto biliar, hueso, mama, sistema nervioso central, de cuello uterino, colorrectal, endometrial, hematopoyético, linfoide, riñón, intestino grueso, hígado, pulmón, esófago, ovárico, pancreático, próstata, glándulas salivares, piel, intestino delgado, estómago, testicular, timo, tiroides, tracto aerodigestivo superior y tracto urinario, y melanoma maligno y las mezclas de péptidos, péptidos, mezclas de linfocitos T y preparaciones de linfocitos T de la presente invención y como se desvelan en el presente documento se pueden utilizar para la profilaxis y/o tratamiento de más de uno de estos tipos de cáncer. Una mezcla de péptidos en la que uno del primer y segundo péptido tenga una mutación G13C, un péptido en el que el péptido tenga una mutación G13C, una mezcla de linfocitos T en la que uno del primer y segundo linfocito T es específico para un péptido que tenga una mutación G13C o una preparación de linfocitos T en la que los linfocitos T sean específicos para un péptido que tenga una mutación G13C, es para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer. En dichos casos, se preferible que el cáncer sea uno o más de entre cáncer colorrectal, de pulmón y pancreático. De manera alternativa, una mezcla de péptidos en la que uno del primer y segundo péptido tenga una mutación G13R, un péptido en el que el péptido tenga una mutación G13R, una mezcla de linfocitos T en la que uno del primer y segundo linfocito T es específico para un péptido que tenga una mutación G13R o una preparación de linfocitos T en la que los linfocitos T sean específicos para un péptido que tenga una mutación G13R, es para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer. En dichos casos, se preferible que el cáncer sea un melanoma maligno. En particular, se ha descubierto que la mezcla de péptidos a la que se hace referencia como TG02 cubre el 99 % de los cánceres asociados con mutaciones en la proteína RAS de manera que tiene un amplio espectro de uso, mientras que la mezcla de péptidos

a la que se hace referencia como TG03 cubre un 14 % de los cánceres asociados con las mutaciones en la proteína Ras. Por lo tanto, en una realización, se puede utilizar TG02 en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer. En algunos casos, el cáncer es uno o más de entre cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y cáncer pancreático. Se puede utilizar TG03 en la profilaxis o tratamiento del cáncer. El cáncer puede ser un melanoma maligno.

5 También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprende las mezclas de péptidos, péptidos, mezclas de linfocitos T o preparaciones de linfocitos T que se han descrito anteriormente. dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender también al menos un vehículo, diluyente y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente uno o más principios activos adicionales y/o adyuvantes. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente uno o más ingredientes terapéuticamente eficaces para la misma indicación de la enfermedad. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente uno o más agentes quimioterápicos, uno o más anticuerpos, una o más moléculas pequeñas y/o uno o más estimulantes inmunitarios (por ejemplo, citocinas). La mezcla de péptidos o composición farmacéutica se puede utilizar en combinación con otras formas de inmunoterapia. Como se muestra en la Figura 9, la vacunación con una mezcla de péptidos de acuerdo con una realización de la presente invención inducía la proliferación de esplenocitos, indicando que los péptidos de la presente invención son capaces para inducir una respuesta inmunitaria.

Se ha descubierto que ciertos tipos de cáncer se asocian con ciertas mutaciones de la proteína RAS, y se ha descubierto más recientemente que las mutaciones G13C y G13R se asocian diferencialmente con el cáncer, de manera que las mutaciones G13C se encuentran más comúnmente en algunos tipos de cáncer mientras que las mutaciones G13R se encuentran más comúnmente en otros tipos de cáncer. Por lo tanto, es posible configurar las mezclas de péptidos, péptidos, mezclas de linfocitos T y preparaciones de linfocitos T para que se dirijan a ciertos tipos de cáncer. Por lo tanto, la presente invención proporciona la ventaja de que las vacunas y tratamientos sean más específicos para el tipo de cáncer del paciente. Esto significa que se necesitan menos péptidos y linfocitos T con el fin de asegurar que la vacuna y/o el tratamiento sea eficaz, lo que proporciona la ventaja de que se incluyan menos péptidos y/o linfocitos T irrelevantes en la vacuna y/o tratamiento. A su vez, esto reduce el problema de inmunodominancia, ya que hay menos péptidos que puedan competir entre ellos internamente. Además, la disminución del número de péptidos y/o linfocitos T necesario significa que los fármacos y tratamientos farmacéuticos sean más baratos de producir.

La mezcla de péptidos, péptido o composición farmacéutica de la invención y como se desvelan en el presente documento se puede administrar a un sujeto por cualquier técnica de suministro adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, entre otras técnicas, la mezcla de péptidos, péptido o composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto mediante inyección, en forma de solución, en forma de liposomas o en forma seca (por ejemplo, en forma de partículas revestidas, etc.). En algunos casos, la mezcla de péptidos, péptido o composición farmacéutica se puede administrar en una cantidad, por ejemplo, de entre 1 µg y 1 g de cada péptido una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez al mes, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses o una vez cada seis meses.

Las mezclas de linfocitos T de la presente invención y las preparaciones de linfocitos T desveladas en el presente documento se pueden administrar por inyección intravenosa y/o infusión, y se pueden administrar en una cantidad, por ejemplo, de entre 10^6 y 10^{12} de cada linfocito T específico para un péptido o la mezcla de péptidos o péptido una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses o una vez al año. Preferentemente, la dosificación se administra una vez al mes durante entre 2 y 5 meses y posteriormente se administra menos frecuentemente.

Como se ha mencionado anteriormente, el hallazgo de que diferentes tipos de cáncer se asocian con diferentes mutaciones de la proteína RAS significa que las vacunas y tratamientos se pueden dirigir a cánceres específicos. Por lo tanto, una mezcla de péptidos, péptidos, una mezcla de linfocitos T y una preparación de linfocitos T se puede utilizar en un procedimiento que comprende el diagnóstico del cáncer y la selección de un tratamiento apropiado. El procedimiento comprende las etapas de a) identificar las mutaciones puntuales de la proteína RAS presentes en una muestra tomada de un paciente, y b) seleccionar una mezcla de péptidos como se ha descrito anteriormente que comprende un péptido, seleccionar un péptido como se ha descrito anteriormente, seleccionar una mezcla de linfocitos T como se ha descrito anteriormente que comprende un linfocito T específico para un péptido y/o seleccionar una preparación linfocitos T como se ha descrito anteriormente que comprende un linfocito T específico para un péptido, que comprende una mutación puntual correspondiente con al menos una de las mutaciones puntuales de la proteína RAS identificada en la muestra. Por ejemplo, si se descubriera que la muestra que se toma del sujeto contiene proteínas RAS que tienen una mutación G13C, se seleccionaría una mezcla de péptidos que contenga un péptido, un péptido, una mezcla y/o una preparación de linfocitos T que comprendan un linfocito T específico para un péptido, que comprenda una mutación G13C. En situaciones en las que la muestra contenga, por ejemplo, proteínas RAS que comprendan una mutación G13C y una mutación G12R, se selecciona una mezcla de péptidos que comprenda un péptido que comprenda una mutación G13C y un péptido que comprenda una mutación G12R y/o una mezcla de linfocitos T que comprenda un linfocito T específico para un péptido que comprenda la mutación G13C y un linfocito T específico para un péptido que comprenda una mutación G12R. El procedimiento también comprende la etapa de administrar una composición farmacéutica que comprenda la mezcla de péptidos, péptido y/o mezcla y/o preparación de linfocitos T seleccionadas al paciente.

También se desvela en el presente documento un kit que incluye una mezcla de péptidos, un péptido, una mezcla de linfocitos T y/o una preparación de linfocitos T como se ha descrito en el presente documento. La mezcla de péptidos, péptido, mezcla de linfocitos T y/o preparación de linfocitos T puede estar presente en el kit como tal, o la mezcla de péptidos, péptido, mezcla de linfocitos T y/o preparación de linfocitos T puede estar presente en el kit como una formulación farmacéutica. La mezcla de péptidos, péptido, mezcla de linfocitos T y/o preparación de linfocitos T puede envasarse, por ejemplo, en un vial, botella, frasco, que puede envasarse adicionalmente, por ejemplo, en una caja, sobre o bolsa. El kit puede comprender una mezcla de péptidos y/o una mezcla de linfocitos T en las que los péptidos y/o los linfocitos T se proporcionan en recipientes distintos, de manera que los péptidos y/o linfocitos T se mezclan por el usuario.

5

10 Tablas

Tabla 1. Péptidos de RAS mutados en la posición 13 de las SEQ ID NO: 1-6

| 1 | 13 | 30 |
|----|----|--|
| | | MTEYKLVVVGAG C VGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 1) |
| | | MTEYKLVVVGAG R VGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 2) |
| 15 | | MTEYKLVVVGAG D VGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 3) |
| | | MTEYKLVVVGAG V VGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 4) |
| | | MTEYKLVVVGAG A VGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 5) |
| | | MTEYKLVVVGAG S VGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 6) |

Tabla 2. Péptidos de RAS mutados en la posición 12 de las SEQ ID NO: 7-12

| 20 | 12 | 30 |
|----|----|---|
| | | MTEYKLVVVG A AGVGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 7) |
| | | MTEYKLVVVG A CGVGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 8) |
| | | MTEYKLVVVG A DVGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 9) |
| | | MTEYKLVVVG A RVGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 10) |
| 25 | | MTEYKLVVVG A SGVGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 11) |
| | | MTEYKLVVVG A VVGKSALTIQLIQNHFVD (SEQ ID NO: 12) |

Tabla 3. Péptidos de Ras mutados en la posición 61 de las SEQ ID NO: 13-18

| 30 | 61 | 76 |
|----|----|--|
| | | DGETCLLDILD T AG R EEYSAMRDQYMRTGE (SEQ ID NO: 13) |
| | | DGETCLLDILD T AG K EEYSAMRDQYMRTGE (SEQ ID NO: 14) |
| | | DGETCLLDILD T AG H EEYSAMRDQYMRTGE (SEQ ID NO: 15) |
| | | DGETCLLDILD T AG L EEYSAMRDQYMRTGE (SEQ ID NO: 16) |
| | | DGETCLLDILD T AG E EEYSAMRDQYMRTGE (SEQ ID NO: 17) |
| | | DGETCLLDILD T AG P EEYSAMRDQYMRTGE (SEQ ID NO: 18) |

35 Tabla 4. Péptidos contenidos en TG02

| 40 | 21 |
|----|--|
| | KLVVVGAG C VGKSALTI (SEQ ID NO: 19) |
| | KLVVVGAG D VGKSALTI (SEQ ID NO: 20) |
| | KLVVVG A AGVGKSALTI (SEQ ID NO: 21) |
| 40 | KLVVVG A CGVGKSALTI (SEQ ID NO: 22) |

KLVVVGADGVGKSALTI (SEQ ID NO: 23)

KLVVVGARGVGKSALTI (SEQ ID NO: 24)

KLVVVGASGVGKSALTI (SEQ ID NO: 25)

KLVVVGAVGVGKSALTI (SEQ ID NO: 26)

5 Tabla 5. Péptidos contenidos en TG03

5 21

KLVVVGAGRVGKSALTI (SEQ ID NO: 27)

KLVVVGAGVVGKSALTI (SEQ ID NO: 28)

53 69

10 LDILDTAGREEYSAMRD (SEQ ID NO: 29)

LDILDTAGKEEYSAMRD (SEQ ID NO: 30)

LDILDTAGHEEYSAMRD (SEQ ID NO: 31)

LDILDTAGLEEYSAMRD (SEQ ID NO: 32)

Ejemplos

15 **Ejemplo 1**

En este ejemplo, se recolectaron las capas leucocitarias de 4 donantes humanos normales (leucocitos 1, leucocitos 2, leucocitos 3, y leucocitos 4) y se cultivaron *in vitro*. Las PBMC se estimularon *in vitro* con un único péptido de RAS o una mezcla de péptidos de RAS, y se llevaron a cabo los ensayos de proliferación de linfocitos T. Los resultados se muestran en las Figuras 6-8.

20 **Procedimiento**

Equipamiento/reactivos

- Hettich Rotina 420 (radio 210) o equivalente
- Campana de flujo laminar KOJAIR Silverline Blue Series o equivalente
- Incubadora con CO₂, Forma Scientific Model 3111 o equivalente
- 25 - Baño de agua a 37 °C
- Portaobjetos KOVA Glasstic (N.º de Cat. 87144E, Hycor Biomedical Inc, Garden Grove, EE. UU.)
- Contador de centelleo de microplacas TopCount (Packard Instrument Company, Meriden, EE. UU.)
- Malla filtrante de recolección celular 196 Harvester, (Packard Instrument Company, Meriden, EE. UU.)
- Unifilter GF/C (N.º de Cat. 6-005174, Nerliens Meszansky, Oslo, Noruega) o equivalente
- 30 - Líquido de centelleo Microscint-0 (N.º de Cat. 6013611, Nerliens Meszansky, Oslo, Noruega) o equivalente
- Topseal-A (N.º de Cat. 6005185, Nerliens Meszansky, Oslo, Noruega) o equivalente
- ³H-Timidina (N.º de Cat. ART178-D, Nerliens Meszansky, Oslo, Noruega) o equivalente
- Medio CellGro DC (N.º de Cat. 0020801-0500, CellGenix GmbH, Freiburg, Alemania) o equivalente
- RPMI-1640 (N.º de Cat. E15-840) PAA Labs, Linz, Austria) o equivalente
- 35 - Dimetilsulfóxido (DMSO) (N.º de Cat. D5879-500ML, Sigma-Aldrich Noruega AS, Oslo, Noruega) o equivalente
- Mucomyst (N.º de Cat. 019249, Meda AS, Asker, Noruega) o equivalente
- Interleucina-2 recombinante humana (IL-2, Proleukin®), (Chiron Therapeutics, Emeryville, EE. UU.) o equivalente
- 40 - Tampón de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 1M (N.º de Cat. S11-001, Fisher Scientific AS, Oslo, Noruega) o equivalente
- IL-7 (N.º de Cat. 207-IL-025, R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) o equivalente
- Gentamicina 40 mg/ml (N.º de Cat. Sanofi Aventis Norge AS, Lysaker, Noruega) o equivalente
- Albúmina sérica humana al 20 %, (N.º de Cat. SW2G0013, Baxter AS, Oslo, Noruega) o equivalente
- 45 - Placas de cultivo tisular de 24 pocillos (N.º de Cat. 734-1605, VWR International AS, Oslo, Noruega) o equivalente
- Microplaca de 96 pocillos, de fondo redondo (N.º de Cat. 734-1797, VWR International AS, Oslo, Noruega) o equivalente
- Enterotoxina estafilocócica tipo C (SEC-3) (N.º de Cat. CT333, Toxin Technology Inc, Sarasota, EE. UU.).

50

Medio CellGro DC completo utilizado para los cultivos

Se añadió lo siguiente a 500 ml de medio CellGro DC para las concentraciones finales:

- Gentamicina 50 µg/ml (añadir 630 µl de materia prima a 40 mg/ml a 500 ml de medio)
- Mucomyst 1,6 mg/ml (añadir 4 ml de materia prima a 200 mg/ml a 500 ml de medio)
- 5 Tampón HEPES buffer 0,01 M (añadir 5 ml de materia prima 1 M a 500 ml de medio)

Procedimiento

a. Descongelación de las PBMC congeladas

El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente hasta el punto 5. Todo manejo de células al exterior se hace en una campana de flujo laminar vertical.

- 10 1. Se transfieren rápidamente los viales, cada vial con PBMC congeladas de una capa leucocitaria (leucocitos 1, leucocitos 2, leucocitos 3, y leucocitos 4), a un baño de agua a 37 °C.
- 2. Se agitan los viales manualmente a intervalos regulares (aproximadamente 2-3 min) y se retiran del baño de agua mientras esté todavía presente algo de hielo.
- 15 3. Cuando se ha fundido todo el hielo, se transfiere 1 ml de medio CellGro DC gota a gota a la suspensión celular.
- 4. Se transfiere la suspensión celular a un tubo de 50 ml que contiene 20 ml de medio CellGro DC.
- 5. Se centrifugan las células a 500 G durante 5 min a temperatura ambiente.
- 6. Se resuspenden las células en 5 ml de medio CellGro DC.
- 20 7. Se cuenta el número de células viables utilizando una cámara de Bürker o portaobjetos Galsstic KOVA y se ajusta la concentración celular a 2×10^6 células/ml en medio CellGro DC completo (véase la receta). Número total de células: leucocitos 1 – 45×10^6 , leucocitos 2 – $27,5 \times 10^6$, leucocitos 3 – $40,5 \times 10^6$, y leucocitos 4 – $40,5 \times 10^6$ células.

b. Cultivos en masa para aumentar el número de linfocitos T reactivas al péptido de RAS

- 25 1. Se transfiere 1 ml de PBMC descongeladas (2×10^6 células/ml en medio DC) a cada pocillo en una placa de 24 pocillos.

Tabla 6. Re-estimulación: Número de pocillos estimulados con las mezclas de péptidos

| | Número total de células (mill) | Mezcla de péptidos: 13C+13R | Mezcla de péptidos: 13R+mezclaTG02 |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Leucocitos 1 | 45 | 11 | 11 |
| Leucocitos 2 | 27.5 | 6 | 6 |
| Leucocitos 3 | 40.5 | 10 | 10 |
| Leucocitos 4 | 40.5 | 10 | 10 |

- 2. Se añaden 20 µl de cada uno de los péptidos 13C y 13R, o 20 µl de 13R y 60 µl de la mezcla TG02 a los pocillos a una concentración final de 10 µM de cada péptido.
- 30 3. Se cultivan las células en una incubadora humidificada a 37 °C/un 5 % de CO₂ durante 3 días.
- 4. El día 3: Se añade una concentración final de 20 UI/ml de interleucina-2 recombinante humana (rIL-2) (es decir, 50 µl de la solución de materia prima de 100 UI/ml) y una concentración final de 5 ng/ml de IL-7 recombinante humana (es decir, 10 µl de la solución de materia prima de 500 µg/ml) a los cultivos celulares y se continúa con la incubación a 37 °C/un 5 % de CO₂. Esta etapa es opcional si las células crecen bien.
- 35 5. Días 4-6: Las células se comprueban regularmente en el microscopio y se dividían cuando era necesario (se retiraban 500 µl de cada pocillo y se reemplazaba con 500 µl de medio CellGro reciente, suplementado con 40 UI/ml de IL-2 e IL-7).
- 6. Días 7-14: Las células se comprobaban cada día y los pocillos con células de crecimiento lento se mezclaban juntas.

40 c. i) Ensayo de proliferación de linfocitos T de 3 días

- 1. Se recolectan, lavan y cuentan los linfocitos T en los cultivos en masa de la etapa b.;

Tabla 7: Número total de linfocitos T

| | Mezcla de péptidos: 13C+13R | Mezcla de péptidos: 13R+mezclaTG02 |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Leucocitos 1 | 0,9 x 10 ⁶ | 0,72 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 2 | 5,0 x 10 ⁶ | 4,05 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 3 | 7,65 x 10 ⁶ | 7,2 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 4 | 6,3 x 10 ⁶ | 2,7 x 10 ⁶ |

2. Se transfieren 5 x 10⁴ linfocitos T de los cultivos en masa por pocillo en las placas de 96 pocillos de fondo redondo.

5 3. Se descongela 1 vial de muestra de PBMC autólogas en medio CellGro DC. Se irradian las PBMC (30 Gy), se cuentan y se añaden 5 x 10⁴ células a cada pocillo y se ajusta a un volumen total de 200 µl/pocillo con medio DC.

4. Se preparan las siguientes muestras por triplicado, de acuerdo con la distribución en las placas:

- Controles negativos:

Solo linfocitos T

10 Linfocitos T de cada momento + PBMC irradiadas

- Control positivo:

Linfocitos T de cada momento + PBMC irradiadas + 1 µg/ml de SEC-3

- Muestra de ensayo

Linfocitos de cada momento + PBMC irradiadas (10 µM de cada péptido):

15 I) Para los cultivos en masa estimulados con 13C+13R: mezcla de 13C+13R o únicamente péptidos G13C
II) Para los cultivos en masa estimulados con TG02+13R: TG02+13R, mezcla 13C+13R, o solo péptidos G13C. Se incuban las células durante 48 horas a 37 °C/un 5 % de CO₂.

5. Se añaden 20 µl de ³H-Timidina (3,7 x 10⁴ Bq).

6. Se incuba a 37 °C/un 5 % de CO₂ durante 17 horas.

20 7. Se recolectan las células en Unifilters utilizando el Recolector de malla filtrante 195 y se secan los filtros a 45 °C hasta el secado completo (normalmente esto se consigue después de 1,5 pero el número de horas que se deja a 45 °C después no es crítico, por tanto, se puede hacer el recuento en las placas 60 horas después).

25 8. Se cubre el fondo de los Unifilters con cubiertas adhesivas (suministradas con los Unifilters) y se añaden 25 µl de líquido de micro centelleo en cada pocillo. Se cubre la placa con un TopSeal y se colocan los filtros en un contador beta de centelleo de microplacas TopCount Packard. Se mete el ensayo en el programa wizard. Se selecciona el protocolo/programa de ³H-timidina por triplicado. Se mete la definición del informe y el resultado en archivo ASCII. Debajo del directorio, se selecciona la carpeta de datos (cada usuario debería tener una carpeta distinta). Se elige el nombre del archivo de experimento para guardarlo. La apiladora se enciende o apaga (se usa la apiladora si hay más de una placa). Se comienza con el programa de ensayo.

30 ii) Segunda estimulación de los cultivos en masa

Las células restantes (1-2 x 10⁶ linfocitos T/pocillo) se re-estimularon una vez más con PBMC autólogas (1 mill/pocillo) y mezclas de péptidos (como se ha descrito en la etapa b.).

Tabla 8: Estimulación – Número de pocillos estimulados con las mezclas de péptidos

| | Mezcla de péptidos: 13C+13R | Mezcla de péptidos: 13R+mezclaTG02 |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Leucocitos 1 | 1 | 1 |
| Leucocitos 2 | 2 | 2 |
| Leucocitos 3 | 3 | 3 |
| Leucocitos 4 | 3 | 1 |

35 1. Se cultivan las células en una incubadora humidificada a 37 °C/un 5 % de CO₂ durante 3 días (como se describe en la etapa b).

2. Día 17: Se añade una concentración final de 40 UI/ml de interleucina-2 recombinante humana y una concentración final de 5 ng/ml de IL-7 recombinante humana a los cultivos celulares y se continúa con la

incubación a 37 °C/un 5 % de CO₂. Las células se comprueban regularmente bajo el microscopio y se dividen si es necesario.

3. Días 19-21: Se retiran 500 µl de cada pocillo y se remplazan con 500 µl de medio CellGro DC reciente suplementado con 40 UI/ml de IL-2 e IL-7.

5 4. Días 22-27: Las células se comprueban regularmente cada día, y los pocillos con crecimiento lento se mezclan juntos (como en la etapa b.).

d. i) Ensayo de proliferación de linfocitos T

1. Se recolectan, lavan y cuentan los linfocitos T en los cultivos en masa

Tabla 9: Número de células total

| | Mezcla de péptidos: 13C+13R | Mezcla de péptidos: 13R+mezclaTG02 |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Leucocitos 1 | 0,09 x 10 ⁶ | 0,18 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 2 | 4,5 x 10 ⁶ | 5,4 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 3 | 2,7 x 10 ⁶ | 3,15 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 4 | 1,35 x 10 ⁶ | 1,76 x 10 ⁶ |

10

2. Se transfieren 5 x 10⁴ linfocitos T desde los cultivos en masa a cada pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo.

3. Se descongela 1 vial de muestra de PBMC en medio CellGro DC. Se irradian las PBMC (30 Gy), se cuentan y se añaden 5 x 10⁴ células a cada pocillo y se ajusta hasta un volumen total de 200 µl/pocillo con medio DC (como se describe en la etapa c. i)).

15

ii) Días 27-42: Tercera estimulación de los cultivos en masa

Las células restantes (1-2 mil de linfocitos T/pocillo) se re-estimularon una vez más con PBMC autólogas (1 mill/pocillo) y la mezcla de péptidos (como se describe en la etapa b.).

Tabla 10: Estimulación – Número de células estimuladas

| | Mezcla de péptidos: 13C+13R | Mezcla de péptidos: 13R+mezclaTG02 |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Leucocitos 1 | 0 | 0 |
| Leucocitos 2 | 2 | 2 |
| Leucocitos 3 | 1 | 1 |
| Leucocitos 4 | 1 | 1 |

20

e) Ensayo de proliferación de linfocitos T de 3 días

1. Recolección, lavado y recuento de linfocitos T en los cultivos en masa.

Tabla 11: Número total de células

| | Mezcla de péptidos: 13C+13R | Mezcla de péptidos: 13R+mezclaTG02 |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Leucocitos 1 | 0 | 0 |
| Leucocitos 2 | 0,9 x 10 ⁶ | 0,63 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 3 | 0,27 x 10 ⁶ | 0,675 x 10 ⁶ |
| Leucocitos 4 | 0,315 x 10 ⁶ | 0,18 x 10 ⁶ |

25 2. Se transfieren 5 x 10⁴ linfocitos T desde los cultivos en masa a cada pocillo de las placas de 96 pocillos de fondo redondo.

3. Se descongela 1 vial de a muestra de PBMC autólogas en medio CellGro DC. Se irradian la PBMC (30 Gy), se

cuentan y se añaden 5×10^4 células a cada pocillo y se ajustó a un volumen total de 200 μ l/pocillo con medio DC (como se describe en la etapa c.i)).

Resultados

5 Los resultados de los ensayos de proliferación de linfocitos T con las mezclas de péptidos, después de tres rondas de estimulación de los cultivos en masa, se muestran en las Tablas 12-14, y las Figuras 6-8, respectivamente. Las Tablas 12-14 muestran los recuentos por minuto (CPM) de cada repetición, y la media de CPM de cada donante.

10 Tabla 12: Recuentos por minuto (CPM) después de la estimulación con una mezcla de péptidos que consiste en los péptidos 13C y 13R. Durante las tres rondas de estimulación *in vitro* de los cultivos en masa, el Donante n° 3 se estimuló con la mezcla de péptidos TG02+13R, mientras que el donante n° 4 se estimuló con la mezcla de péptidos 13C + 13R.

| | APC | APC + linfocitos T | APC + linfocitos T + 13 C + 13 R |
|-------------------------------|------------|--------------------|-------------------------------------|
| Donante n° 3 | 337 | 8337 | 28.422 |
| | 235 | 12.061 | 28.264 |
| | 375 | n/a | n/a |
| Media del Donante n° 3 | 316 | 10.199 | 28.343 |
| Donante n° 4 | 137 | 9696 | 32.476 |
| | 421 | 8412 | 23.499 |
| | 249 | n/a | n/a |
| Media del Donante n° 4 | 269 | 9054 | 27.987 |

Tabla 13: Recuentos por minuto (CPM) después de la estimulación con una mezcla de péptidos que consiste en los péptidos 13C, 13D, 12A, 12C, 12D, 12R, 12S, 12V y 13R (es decir, TG02+13R). Durante las tres rondas de estimulación *in vitro* de los cultivos en masa, el Donante n° 3 se estimuló con la mezcla de péptidos TG02+13R

| | APC | APC + linfocitos T | APC+linfocitos T+13R+TG02 |
|-------------------------------|------------|--------------------|---------------------------|
| Donante n° 3 | 337 | 4954 | 28.796 |
| | 235 | 6073 | 21.201 |
| | 375 | 5513 | n/a |
| Media del Donante n° 3 | 316 | 5513 | 24.998 |

15 Tabla 14: Recuentos por minuto (CPM) después de la estimulación con un péptido 13C. Durante las tres rondas de estimulación *in vitro* de los cultivos en masa, el Donante n° 3 se estimuló con la mezcla de péptidos TG02+13R

| | APC | APC+linfocitos T | APC+linfocitos T+13 C |
|-------------------------------|------------|------------------|-----------------------|
| Donante n° 3 | 337 | 4954 | 27813 |
| | 235 | 6073 | 32522 |
| | 375 | 5513 | 28869 |
| Media del Donante n° 3 | 316 | 5513 | 29735 |

20 Los resultados del control positivo se confirmaron, pero no se incluyen en las Figuras 6-8 por razones de escalado. Como se puede ver, ambas mezclas de péptidos y solo el péptido inducían la proliferación de linfocitos T, indicando que el péptido y las mezclas de péptidos eran capaces de inducir una respuesta inmunitaria en seres humanos.

Ejemplo 2

25 En este Ejemplo, se vacunaron repetidamente ratones por vía subcutánea con TG02, con el fin de analizar la respuesta inmunitaria. A continuación de la vacunación, se recolectaron los esplenocitos, y se midió la respuesta proliferativa de los esplenocitos. Los resultados se muestran en la Figura 9.

Procedimiento

Caracterización del artículo de ensayo

Nombre: TG02
 Producto: TG02 consiste en cantidades iguales (por peso) de 8 péptidos diferentes (12A, 12C, 12D, 12R, 12S, 12V, 13C, 13D)
 Lote N.º 12A: lote nº 1034804; 12C: lote nº 1034803;
 12D: lote nº 1034801; 12R: lote nº 1034802;
 12S: lote nº 1034805; 12V: lote nº 1034800;
 13C: lote nº 1050468; 13D: lote nº 1034806
 Indicación terapéutica: Cáncer
 Estado físico: polvos
 Color: Blanco
 Pureza: 80 mg netos de péptido por vial (10 mg netos de cada péptido)
 Condiciones de almacenamiento: -15 °C - -20 °C y protegido de la luz
 Fecha de caducidad: 31.12.2014
 Precauciones de seguridad: Procedimientos higiénicos de rutina fueron suficientes para asegurar la salud y seguridad del personal.

Caracterización del Vehículo 1

Nombre: ViscoGel
 Lote N.º: VG14056
 Indicación terapéutica: cáncer
 Estado físico: partículas de gel
 Color: sin color
 Contenido en agua: 99 %
 Condiciones de almacenamiento: 2-8 °C
 Fecha de caducidad: 01.06.2015
 Precauciones de seguridad: Procedimientos higiénicos de rutina fueron suficientes para asegurar la salud y seguridad del personal.

Caracterización del Vehículo 2

El vehículo 2 que se va a utilizar en este estudio será *aqua ad injectionem*. Las especificaciones proporcionadas por el proveedor se enumeran de la siguiente manera:

Nombre: *aqua ad injectionem*
 Estado físico: líquido
 Condiciones de almacenamiento: temperatura ambiente
 Precauciones de seguridad: Procedimientos higiénicos de rutina fueron suficientes para asegurar la salud y seguridad del personal.

Preparación del artículo de ensayo

Se añadieron 5 ml de *aqua ad injectionem* a un vial de TG02 (80 mg) y se gira suavemente (evitando que se forma espuma) para obtener una solución de materia prima homogénea de 16 mg de TG02 por ml. Para los animales del grupo 1 (véase la Tabla 12), se extrajo 1 ml de la solución de materia prima de TG02 con una jeringa y se mezcló con 1 ml de *aqua ad injectionem* para obtener una concentración final de 8 mg/ml.

Para los animales de los grupos 2 y 3 (véase la Tabla 12), se extrajo 1 ml de solución de materia prima de TG02 con una jeringa y se mezcló con 1 ml de ViscoGel™ para obtener una concentración final de 8 mg/ml.

Las formulaciones del artículo de ensayo se consideraron estable durante 6 h a 2-8 °C.

Sistema de ensayo

Especie/cepa: ratones BALB/c saludables (barrera completa) BALB/cAnNCrl
 Fuente: Charles River, 97633 Sulzfeld, Alemania
 Sexo: hembra
 Edad al inicio del periodo de tratamiento: aproximadamente 6-8 semanas de edad
 Número de animales: 30 (10 animales por grupo)
 Los animales se derivaban de un sistema de cría mantenido con una barrera completa controlada (SPF). De acuerdo con el Art. 9.2, N.º 7 del Acta alemana de Bienestar Animal, los animales se criaron con fines experimentales.

Alojamiento y condiciones de alimentación

- Barrera completa en una habitación con aire acondicionado.
- Temperatura: 22 ± 3 °C
- Humedad relativa: 55 ± 10 %
- 5 - Luz artificial, siendo la frecuencia de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad.
- Intercambio de aire: 10x/hora.
- Acceso libre a la dieta de mantenimiento Altromin 1324 para ratas y ratones.
- Libre acceso a agua corriente, acidificada con azufre a un pH de aproximadamente 2,8 (agua potable, control de residuos municipal, controles microbiológicos a intervalos regulares).
- 10 - Los animales se mantuvieron en grupos de 5 animales por jaula en jaulas IVC, tipo II L, jaulas de polisulfona sobre lecho de fibra de serrín.
- Los certificados del alimento, agua y lecho se presentaron en el BSL BIOSERVICE
- Periodo de aclimatación adecuado (al menos 5 días) a las condiciones de laboratorio.

Alojamiento e identificación de los animales

- 15 Los animales presentaban signos patológicos antes de la administración se excluyeron del estudio. Se proporcionaron animales suplementarios del mismo proveedor como intercambio. Cada animal se marcó con una identificación individual con una marca en la oreja.

Procedimiento experimental

- 20 El estudio se llevó a cabo con 3 grupos, cada uno comprendía 10 ratones hembras de BALB/c. El inicio del estudio se llevó a cabo en dos días separados en los que se trataban 5 de los animales por grupo. A continuación, los grupos se dividieron en parte I y parte II. Los animales se trataron por vía subcutánea en diferentes momentos (Tabla 12).

- 25 Durante el periodo de administración, se observaron con precisión los animales cada día en cuanto a signos de toxicidad. Se practicó la eutanasia de los animales 48 horas después de la última administración, se examinaron macroscópicamente y se preparó el bazo para análisis posteriores.

Dosificación

En todos los grupos el artículo de ensayo se administró en momentos repetidos (Tabla 15) mediante inyección subcutánea entre la nuca y los hombros. El volumen de aplicación para todos los grupos era de 0,1 ml (0,80 mg TG02).

30 Tabla 15: Tratamiento e identificación animal

| Grupo | Tratamiento | N.º de Animal Parte I | N.º de Animal Parte II | Momentos de la aplicación subcutánea (Día) | Sometidos a necropsia (horas después de la última administración) |
|-------|------------------|-----------------------|------------------------|--|---|
| 1 | TG02 | 1-5 | 6-10 | 1, 8, 15, 22 | 48 |
| 2 | TG02 + ViscoGel™ | 11-15 | 16-20 | 1, 8, 15, 22 | 48 |
| 3 | TG02 + ViscoGel™ | 21-25 | 26-30 | 1, 22 | 48 |

Observaciones clínicas

Se observaron todos los animales en cuanto a los signos clínicos durante el periodo de tratamiento completo de 24 días.

- 35 Las observaciones clínicas generales se hicieron al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y cuando se consideraba el periodo de pico de los efectos previstos después de la dosificación. Se registró el estado de salud de los animales.

- 40 En cada uno de los animales, las observaciones clínicas generales incluían cambios en la piel y el pelaje, los ojos, y las membranas mucosas se llevaron a cabo preferentemente a la misma hora cada día y cuando se consideraba el periodo de pico de los efectos previstos después de la dosificación. También se examinaban los sistemas respiratorio, circulatorio, sistema nerviosos central y autónomos y actividad somatomotora y patrón de comportamiento. Se prestaba una atención particular a la observación de signos de reacciones anafilactoides, parálisis, temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, somnolencia y coma. Además, se prestó atención al

sitio de la inyección.

Patología – Necropsia macroscópica

48 horas después de la última administración (día 24 de estudio) se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se sometieron a necropsia macroscópica detallada que incluye el examen cuidadoso de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos.

Cultivo celular y estimulación de células esplénicas

Se retiró el bazo de todos los animales, se transfirió a un medio de cultivo celular (medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de FCS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina, y 50 µM de beta-mercaptoetanol) y se almacenó en hielo. Todas las etapas se llevaron a cabo en esterilidad y se mantuvieron las células en hielo.

Se generó una única suspensión celular de células esplénicas utilizando un filtro celular. Después de la centrifugación (350 g, 5 min, 5 ± 3 °C), se retiró el sobrenadante y el aglomerado celular se resuspendió en tampón ACK y se incubó durante 5 min a TA. Se añadieron 10 ml de medio de cultivo celular. Las muestras se dejaron 5 minutos en la gradilla para permitir que se sedimentaran los desechos celulares. La suspensión por encima de los desechos celulares se transfirió a otro tubo y se centrifugó (350 g, 5 min, 5 ± 3 °C). Se retiró el sobrenadante y el aglomerado celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo celular. Después de contar las células, se sembraron 0,2 mill células en una placa de 96 pocillos (180 µl por pocillo; $1,1 \cdot 10^6$ células/ml). Se colocaron 9 réplicas en placas en cada placa para cada bazo.

- (1) 1 placa para la recolección de sobrenadante para la medición de citocinas después de 24 h (resultados no mostrados)
- (2) 1 placa para la recolección del sobrenadante para la medición de citocinas después de 48 h (resultados no mostrados)
- (3) 1 placa para el ensayo de proliferación

Se llevaron a cabo las siguientes estimulaciones:

- 3 réplicas: sin estimular (adición de 20 µl de medio de cultivo)
- 3 réplicas: estimulación con 10 µM de TG02 (8 péptidos, 10 µM de concentración final por péptido, adición en 20 µl de medio de cultivo celular)
- 3 réplicas: estimulación con 1 µg/200 µl de ConA (Concanavalina A) (adición de 1 µg de ConA en 20 µl de medio de cultivo celular)

Incubación a 37 °C y un 5 % de CO₂ durante 24 h (1), 48 h (2) o 5 días (3).

El resto de las células se centrifugó (350 g, 5 min, 5 ± 3 °C), se transfirieron a un tubo de 1,5 ml, se centrifugó de nuevo (350 g, 5 min, 5 ± 3 °C), se retiraron completamente los sobrenadantes y los aglomerados celulares se congelaron a ≤ -70 °C.

- (1) Después de 24 h, las placas correspondientes se centrifugaron (350 g, TA) y se recolectaron 150 µl del sobrenadante y se congelaron a ≤ -70 °C.
- (2) Después de 48 h, las placas correspondientes se centrifugaron (350 g, TA) y se recolectaron 150 µl del sobrenadante y se congelaron a ≤ -70 °C.

Ensayo de proliferación

- (3) Después de 5 días, se añadió 1 mCi/pocillo de ³H-timidina a las muestras, que se incubaron entonces durante 18 horas a 37 °C y un 5 % de CO₂. Las placas se congelaron entonces a ≤ -20 °C.

Las placas se descongelaron a TA. Después del lavado del recolector, las muestras se transfirieron a una placa de filtro utilizando el recolector seguido por 5 etapas de lavado utilizando agua. Las placas de filtro se secaron a TA durante una noche. Se metió una lámina en el fondo de las placas de filtro y se añadieron 20 µl de líquido de centelleo a los pocillos. Después de la incubación de 1 h a TA, las muestras se midieron utilizando un TopCount NXT y se calculó el índice de estimulación (SI). SI = CPM de muestras estimuladas/CPM de muestras de control.

Resultados

La Tabla 16 y la Figura 9 muestra los resultados del ensayo de proliferación de esplenocitos. La Tabla 16 muestra el CPM de cada réplica, y el CPM medio de cada ratón. Como se puede ver, los esplenocitos estimulados con TG02 presentaban un aumento del CPM en comparación con los esplenocitos no estimulados, indicando que TG02 inducía una respuesta inmunitaria.

ES 2 682 038 T3

<210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Arg Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

10

<210> 3
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

20

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 4

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Val Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Ala Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

35

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 6

ES 2 682 038 T3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Ser Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

5
 <210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

10
 <210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val
 20 25

15
 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

20
 <210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

ES 2 682 038 T3

<210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 11

 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

 10
 <210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 12

 Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
 1 5 10 15

 Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp
 20 25 30

 20
 <210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 13

 Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu
 1 5 10 15

 Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu
 20 25 30

 30
 <210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

 Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Lys Glu
 1 5 10 15

 Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu
 20 25 30
 35

 <210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 15

ES 2 682 038 T3

Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly His Glu
 1 5 10 15

Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu
 20 25 30

5
 <210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu

10 20 25 30

15
 <210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17

Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu
 20 25 30

20
 <210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 18

Asp Gly Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Pro Glu
 1 5 10 15

Glu Tyr Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu
 20 25 30

30
 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 19

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Cys Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

5
 <210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Asp Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

10
 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ala Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

20
 <210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Cys Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

30
 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 23

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

40
 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Arg Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

5 <210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 25

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

15 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 26

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

25 <210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Arg Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

30 <210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 28

Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Val Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr
 1 5 10 15

Ile

40 <210> 29
 <211> 17

ES 2 682 038 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

5

Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Arg Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg
1 5 10 15

Asp

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 30

Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Lys Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg
1 5 10 15

Asp

15

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 31

Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly His Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg
1 5 10 15

Asp

25

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 32

Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr Ser Ala Met Arg
1 5 10 15

Asp

35

<210> 33
<211> 189
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 33

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

ES 2 682 038 T3

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
 20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
 35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
 50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
 65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr
 85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
 100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg
 115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr
 130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
 145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu
 165 170 175

Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser
 180 185

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla de péptidos adecuada para desencadenar una respuesta inmunitaria que comprende un primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo péptido, cada uno correspondiente a un fragmento de la proteína RAS, en la que:
 - 5 el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo péptidos son:
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21,
 - 10 un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y
 - un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26,

y en el que cada uno de los péptidos comprende no más de 30 aminoácidos.
 - 15 2. Una mezcla de péptidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que cada uno del primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo péptidos comprende no más de 28, 26, 24, 22, 20 o 18 aminoácidos.
 3. Una mezcla de péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo y octavo péptidos son:
 - 20 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19,
 - un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20,
 - un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21,
 - un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22,
 - un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23,
 - 25 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24,
 - un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, y
 - un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
 4. Una mezcla de linfocitos T que comprende linfocitos T específicos de cada uno de los péptidos de la mezcla de péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, cuando se presentan sobre una molécula del MHC.
 - 30 5. Una composición farmacéutica que comprende la mezcla de péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la mezcla de linfocitos T de la reivindicación 4 y un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 6. Una mezcla de péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una mezcla de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer en un paciente.
 - 35 7. Una mezcla de péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una mezcla de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 4 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer, en el que el cáncer es un cáncer colorrectal, de pulmón y/o pancreático.
 8. Una mezcla de péptidos, una mezcla de linfocitos T, o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha profilaxis y/o tratamiento comprende la identificación de sustituciones de aminoácidos de la proteína RAS presentes en una muestra tomada del paciente.
 - 40

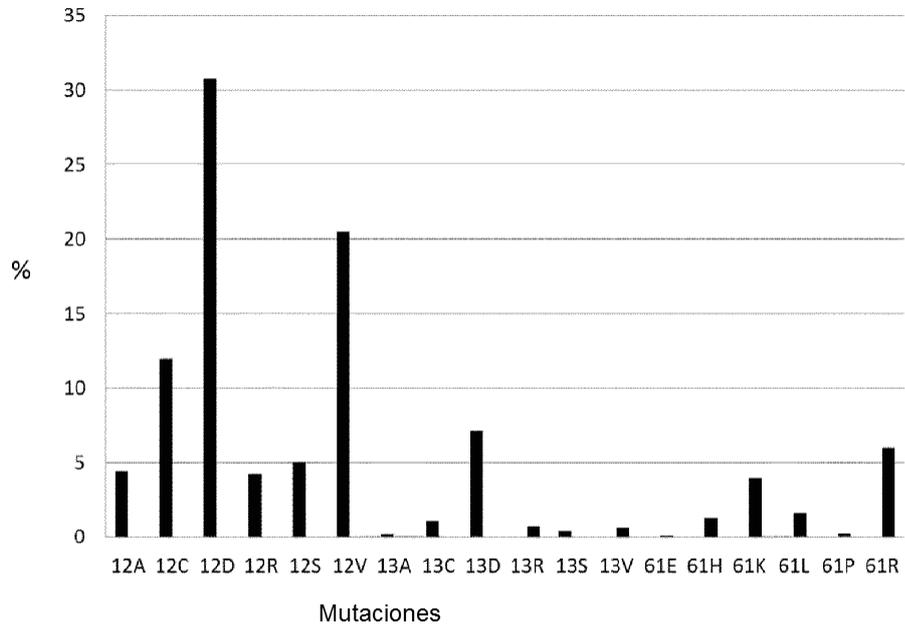


Fig. 1

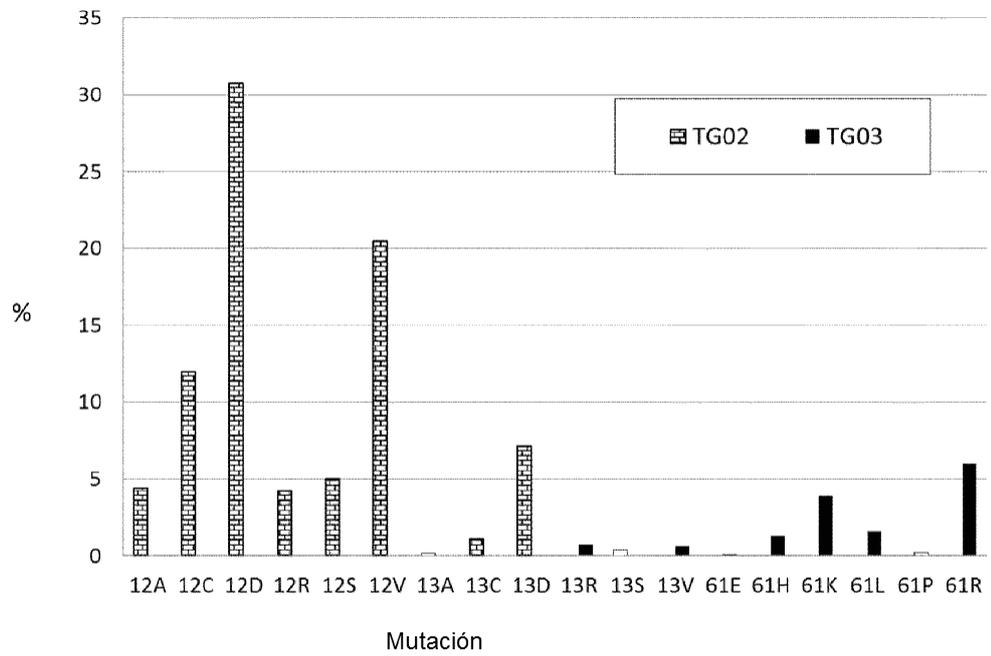


Fig. 2

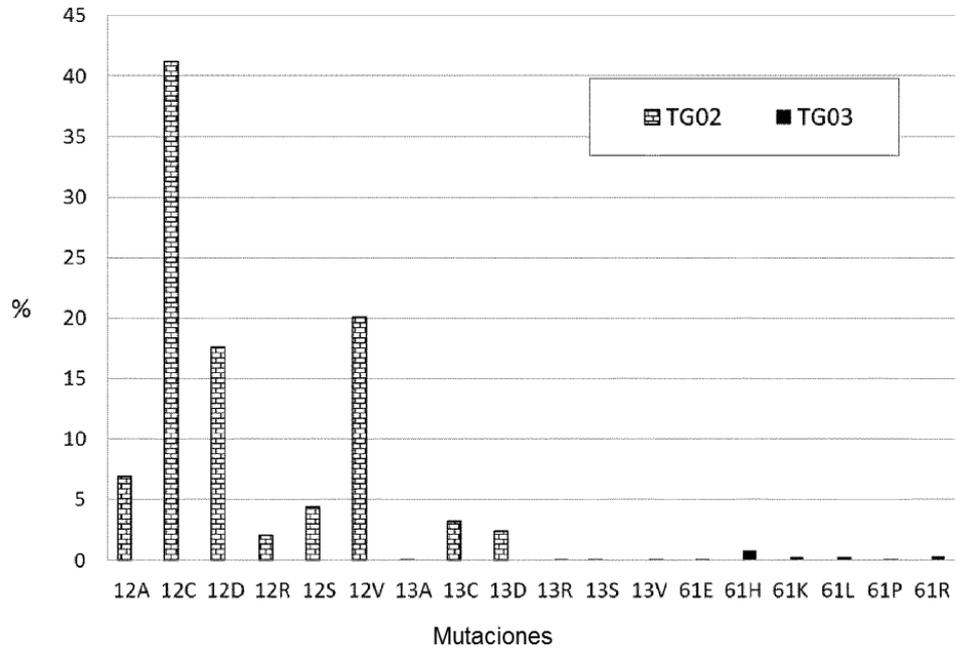


Fig. 3

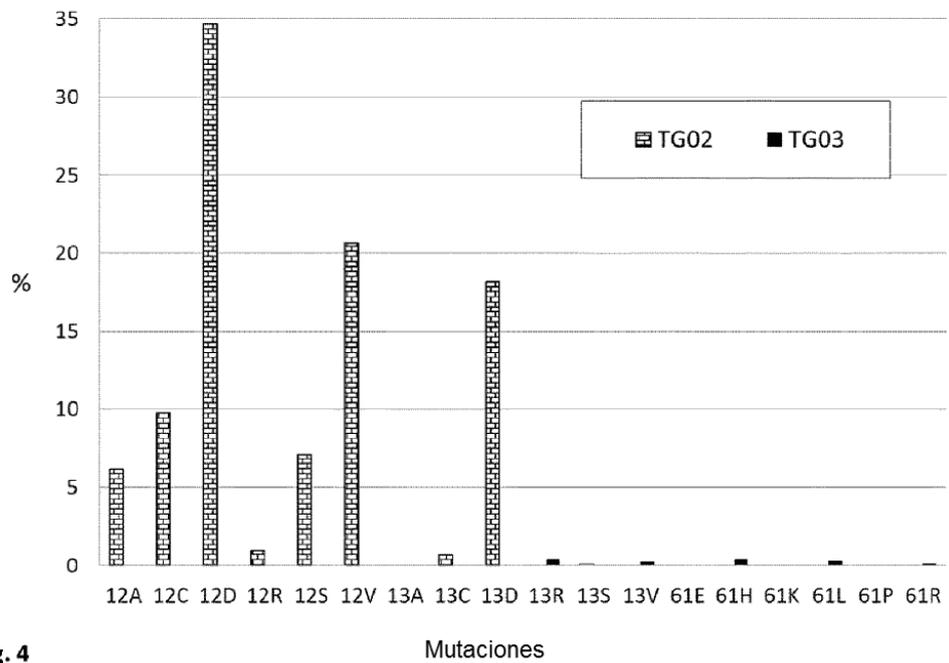


Fig. 4

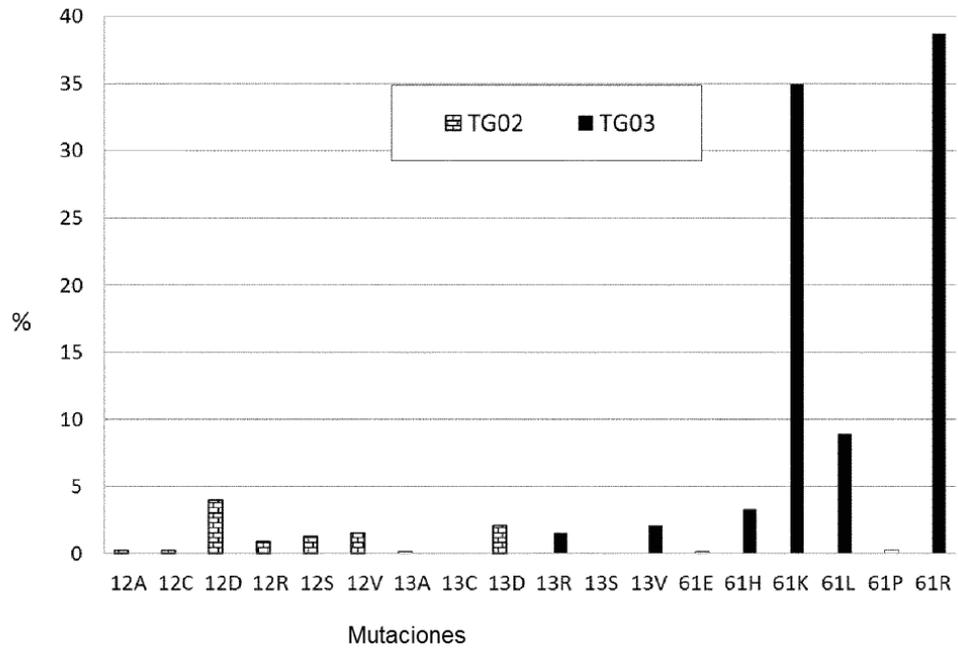


Fig. 5

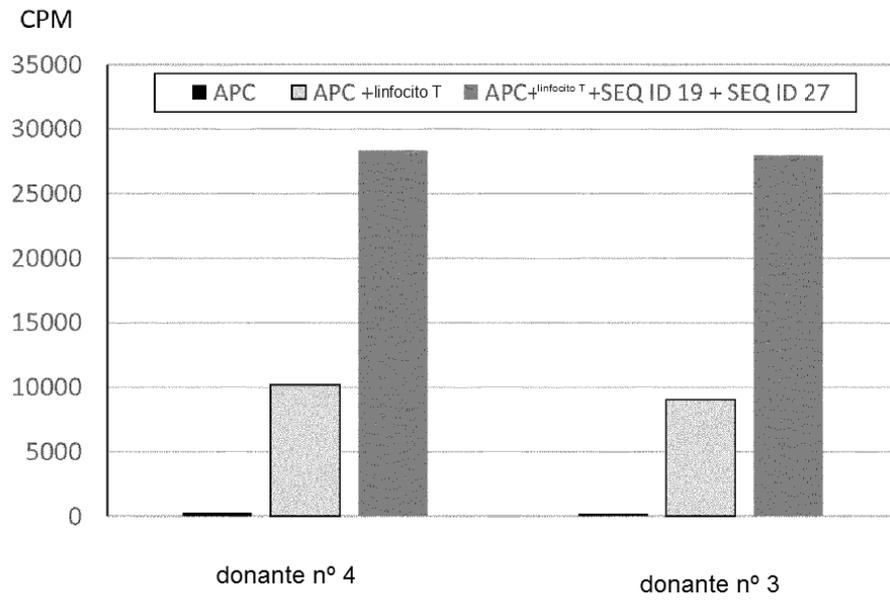


Fig. 6

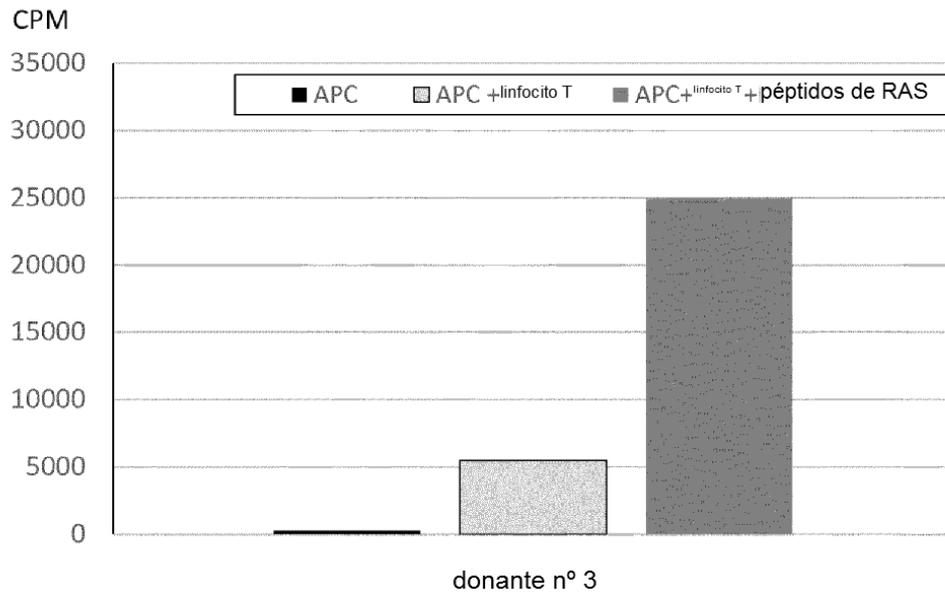


Fig. 7

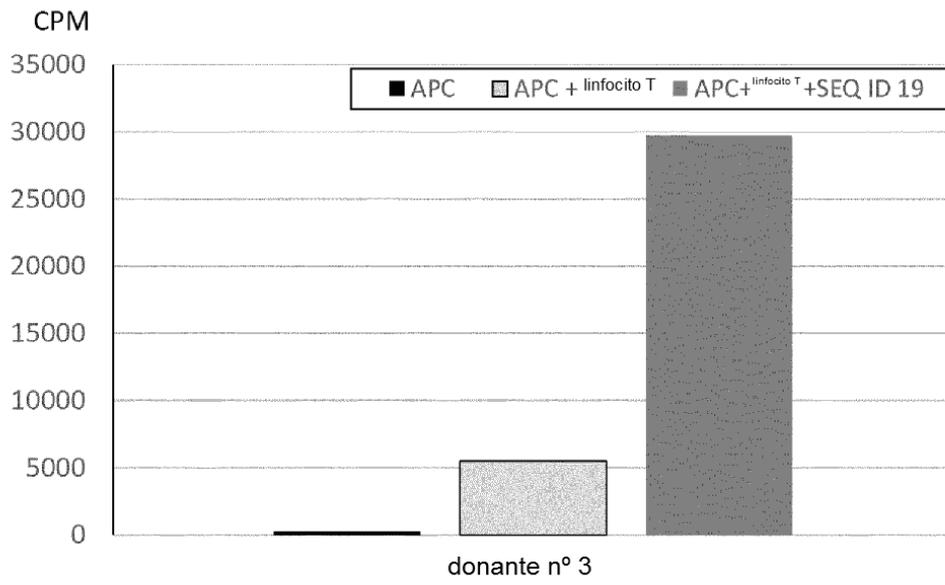


Fig. 8

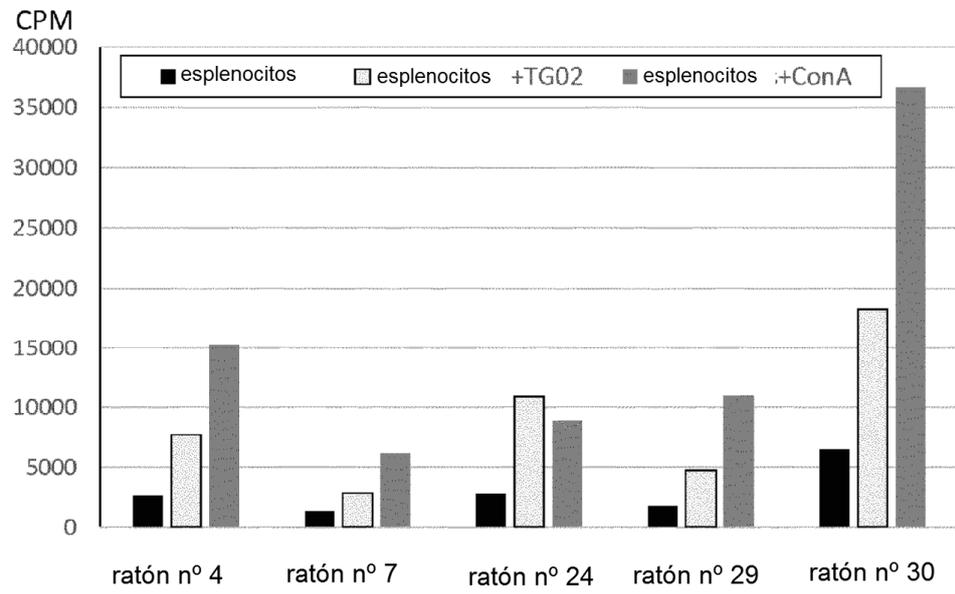


Fig. 9