

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 757**

51 Int. Cl.:

G06F 19/00 (2008.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2013** **PCT/US2013/062100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014** **WO14052707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2013** **E 13840946 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 2901341**

54 Título: **Identificación de epítomos protectores contra tumores para el tratamiento de cánceres**

30 Prioridad:

28.09.2012 US 201261707295 P

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

15.01.2020

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF CONNECTICUT (100.0%)
263 Farmington Avenue
Farmington, CT 06030, US

72 Inventor/es:

SRIVASTAVA, PRAMOD K.;
MANDOIU, ION y
DUAN, FEI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 737 757 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

Identificación de epítomos protectores contra tumores para el tratamiento de cánceres

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a métodos de identificación de epítomos específicos de tumor, a composiciones farmacéuticas tales como composiciones de vacunas que comprenden péptidos de epítomos específicos de tumor y a moléculas de ácido nucleico que codifican dichos péptidos.

10

Antecedentes

A pesar de los profundos avances en la comprensión de la biología del cáncer, el tratamiento de los cánceres más comunes en adultos, tales como los de mama, próstata, pulmón, colon, ovarios, etc., está lejos de ser satisfactorio. Sin lugar a dudas, ha habido grandes avances; igualmente, sin lugar a dudas, permanece insatisfecha una gran necesidad médica. El tratamiento exitoso de cualquier enfermedad requiere una comprensión clara de lo que es singular de la enfermedad, seguido de encontrar una forma de atacar la enfermedad en el punto de su singularidad. Este principio ha sido la base de todos los grandes éxitos en medicina.

15

20

Los cánceres, a diferencia de las infecciones bacterianas, por ejemplo, no son entidades extrañas; derivan de nosotros mismos. Debido a la abrumadora similitud entre los cánceres y nuestros tejidos sanos, el cáncer se ha abordado tratando de encontrar las vías biológicas que usan los cánceres y que nuestros cuerpos normales usan menos, es decir, para apuntar a la selectividad en lugar de a la especificidad. Este enfoque, ilustrado por la quimioterapia, es el principal enfoque no quirúrgico de la terapia contra el cáncer en la actualidad. Es algo eficaz, pero como la eficacia no se basa en la especificidad sino en la selectividad, la quimioterapia también ataca a los tejidos normales, lo que conduce a los efectos secundarios bien conocidos del tratamiento, que también limitan su uso.

25

Los últimos años han visto herramientas de quimioterapia cada vez más sofisticadas, pero el problema fundamental es que la quimioterapia no es específica del cáncer, sino que solo es selectiva y así ha sido durante varias décadas.

30

Una excepción que confirma la regla es el imatinib, un tratamiento para una leucemia en adultos común. Este tipo de leucemia, la leucemia mielógena crónica o LMC, se debe a un cambio muy específico en las células sanguíneas. El cambio es conocido y también se sabe que el cambio se produce solamente en las células leucémicas. El fármaco imatinib apunta específicamente a este cambio y es enormemente eficaz contra la LMC. Desafortunadamente, la CML sigue siendo un ejemplo bastante singular en el que la especificidad puede definirse y se ha definido; afortunadamente, también es un buen ejemplo del hecho de que la definición de la especificidad puede conducir a una terapia contra el cáncer altamente eficaz.

35

Lo que se necesita son métodos para determinar la base de la especificidad del cáncer y después aplicar esta especificidad para desarrollar terapias exitosas y no tóxicas. Castle J. C. et al (*Cancer Research*, 72(5); 1081-91 [2012-01-01]) proporciona un análisis sobre el aprovechamiento del mutanoma para la vacunación contra tumores. Segal N. H. et al (*Cancer Research*, 68(3); 889-92 [2008-02-01]) proporciona un análisis sobre el escenario de epítomos en el cáncer de mama y colorrectal. El documento WO2012159754 desvela vacunas individualizadas contra el cáncer. El documento US2011293637 desvela composiciones y métodos para de identificación de neoantígenos específicos de tumores.

40

45

Breve resumen

La invención reivindicada proporciona un método de identificación de epítomos tumorales en un paciente con cáncer, que comprende:

50

secuenciar al menos una porción del ARN o ADN del paciente con cáncer tanto en un tejido sano como en un tejido canceroso, para producir una secuencia de ARN o ADN de tejido sano y una secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso,

55

comparar la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ADN o ARN de tejido canceroso e identificar las diferencias entre la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso para producir un conjunto de marcadores de ADN de diferencia,

60

analizar el conjunto de marcadores de ADN de diferencia para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el conjunto de epítomos específicos de tumor comprende uno o más epítomos específicos de tumor, proporcionar un valor numérico denominado Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo en el conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el Índice Agretópico Diferencial (o el "IAD") se calcula restando una puntuación numérica para un epítopo normal de una puntuación numérica para el epítopo específico de tumor, donde las puntuaciones numéricas se producen usando un algoritmo predictivo que determina la unión de los péptidos de epítopo a las moléculas del CMH, y

65

clasificar el conjunto de epítomos específicos de tumor mediante el Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo del conjunto.

Se describe un proceso adicional para producir una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor o uno o más polinucleótidos que codifican uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor, en el que los uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor se seleccionan entre el conjunto de epítomos específicos de tumor en función del Índice Agretópico Diferencial. Esta composición farmacéutica puede administrarse al paciente con cáncer.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden opcionalmente además un agente adyuvante o inmunomodulador.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos de epítomos específicos de tumor o uno o más polipéptidos que contienen epítomos específicos de tumor o polinucleótidos que codifican péptidos de epítomos específicos de tumor, en las que los péptidos de epítomos específicos de tumor se identifican mediante el método anterior; y métodos de administración de las composiciones farmacéuticas a pacientes con cáncer.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor o uno o más polipéptidos que contienen los epítomos específicos de tumor o polinucleótidos que codifican uno o más péptidos específicos de tumor, en la que los uno o más péptidos específicos de tumor provienen de un conjunto de epítomos específicos de tumor, en la que el conjunto de epítomos específicos de tumor no incluye epítomos de vías causantes de cáncer conocidas, en la que el conjunto de epítomos específicos de tumor es específico de un tumor de un paciente con cáncer.

También se describe un método de identificación de un paciente con cáncer como candidato para inmunoterapia, que comprende secuenciar al menos una porción del ARN o ADN del paciente con cáncer tanto en un tejido sano como en un tejido canceroso, para producir una secuencia de ARN o ADN de tejido sano y una secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso,

comparar la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ADN o ARN de tejido canceroso e identificar las diferencias entre la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso para producir un conjunto de marcadores de ADN de diferencia,

analizar el conjunto de marcadores de ADN de diferencia para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el conjunto de epítomos específicos de tumor comprende uno o más epítomos específicos de tumor, cuantificar el porcentaje de variantes de un solo nucleótido no sinónimas en el conjunto de epítomos específicos de tumor, e

identificar al paciente con cáncer como candidato para inmunoterapia cuando menos del 65 % de las variantes de un solo nucleótido en el conjunto de epítomos específicos de tumor son variantes de un solo nucleótido no sinónimas.

Breve descripción de los dibujos

Con referencia ahora a los dibujos en los que elementos similares se numeran de manera similar en varias FIGURAS:

La Figura 1 muestra una representación esquemática de la canalización de bioinformática Epi-Seq utilizada para identificar epítomos específicos de tumor a partir de lecturas de RNA-Seq.

La Figura 2 muestra la distribución cromosómica de los epítomos restringidos por el CMH I del sarcoma Meth A. Los epítomos presentados con L, K y D se muestran en los paneles superior, medio e inferior, respectivamente, en cada cromosoma. Para el eje x, 1,5e + 08 es la posición cromosómica 150.000.000 y 0 es la posición cromosómica 0. Debido a la exclusión alélica de la expresión génica en el cromosoma X, el filtro de heterocigosidad utilizado en la canalización Epi-Seq no se aplicó a las mutaciones en ese cromosoma. Las mutaciones del cromosoma X en esta figura se predicen usando mutaciones tanto homocigóticas como heterocigóticas.

Las Figuras 3-5 muestran la inmunogenicidad de los epítomos generados mediante mutaciones puntuales. Se inmunizaron ratones en la almohadilla de la pata con los péptidos indicados. Una semana después, se recogieron los ganglios linfáticos de drenaje (Gld) y sus células se estimularon durante la noche *in vitro* sin péptidos (sin pép) o con péptidos mutados (Mut) o sus homólogos sin mutar (WT, del inglés *wild type* (silvestre)). Se contaron las células positivas para CD44 de superficie e IFN- γ intracelular en 20.000 células CD8+ activadas.

La Figura 3 muestra ejemplos representativos de péptidos mutantes que no provocaron ninguna respuesta (panel superior izquierdo), provocaron una respuesta específica de tumor (es decir, específica del péptido mutante) (panel superior derecho), una respuesta tumoral/auto-reactiva cruzada (panel inferior izquierdo) o ninguna respuesta específica (panel inferior derecho).

La Figura 4 muestra ejemplos representativos de homólogos sin mutar de péptidos mutantes seleccionados que no provocaron ninguna respuesta (panel izquierdo), provocaron una respuesta específica de péptido sin mutar (panel central) o una respuesta CD8 funcional con reactividad cruzada (como en la Figura 3) (panel derecho).

La Figura 5 muestra un resumen de las respuestas de linfocitos T inducidas por péptidos mutados de fibrosarcomas de ratón Meth A (n = 92, números absolutos) (panel superior izquierdo) o CMS5 (n = 27, números absolutos) (panel central) o una combinación de los dos (% de cada tipo de respuesta de linfocitos T) (panel superior derecho). El gráfico circular inferior muestra el % de cada tipo de respuesta de linfocitos T provocada por homólogos sin mutar de péptidos mutados (n = 119).

Las Figuras 6-8 muestran el escenario de una inmunidad protectora contra tumores provocada por péptidos específicos de tumor. Se inmunizaron ratones con los péptidos indicados, se sometieron a prueba de provocación

con células tumorales vivas y se controló el crecimiento del tumor como se describe en Métodos. El área bajo la curva (ABC) para cada curva de crecimiento tumoral individual se calculó y se normalizó estableciendo el grupo sin tratamiento previo en un valor de 100, que se muestra mediante una línea horizontal en las Figuras 6 y 7. Las barras correspondientes a péptidos que muestran una inmunogenicidad protectora contra tumores estadísticamente significativa se rellena en color gris y se indica con un asterisco ($P =$ entre 0,015 y 0,03).

La Figura 6 muestra la actividad protectora contra el tumor de los epítomos mutados con las mejores puntuaciones de NetMHC para CMS5 y Meth A (Tabla 4). Los péptidos se disponen en orden decreciente de actividad y no en orden de su clasificación por NetMHC. Los gráficos circulares muestran el porcentaje de neoepítomos sometidos a ensayo que no provocaron (color negro) y sí provocaron (color gris) protección contra la provocación tumoral.

La Figura 7 muestra la actividad protectora contra el tumor de los epítomos mutados con las mejores puntuaciones de IAD para CMS5 y Meth A (Tabla 5). Los péptidos se disponen en orden decreciente de actividad y no en orden de su clasificación por IAD. Los gráficos circulares muestran el porcentaje de neo-epítomos sometidos a ensayo que no provocaron (color negro) y sí provocaron (color gris) protección contra la provocación tumoral.

La Figura 8 muestra ejemplos de curvas de crecimiento tumoral en ratones sin tratar (sin tratamiento previo) y ratones inmunizados con péptidos mutantes indicados de CMS5. Cada línea muestra la cinética del crecimiento del tumor en un solo ratón.

La Figura 9 muestra la inmunogenicidad protectora contra tumores del Tnp3 mutado en ratones que se inmunizaron con el péptido Tnp3 mutante y, después de una breve estimulación ex vivo sin (sin pep) o con péptidos Tnp3 WT o mutantes, se contaron los linfocitos T $IFN\gamma^+$ CD44⁺ CD8⁺.

La Figura 10 muestra la inmunogenicidad protectora contra tumores del Tnp3 mutado en ratones que se inmunizaron con células Meth A irradiadas. *Izquierda*, seis días después, las células de GL inguinales se estimularon durante la noche sin péptido, péptido Prpf31 irrelevante o péptido Tnp3. Se muestra el % de células CD8⁺ efectoras activadas. *Derecha*, se estimularon esplenocitos con 1 μ M de los péptidos indicados una vez a la semana. Se usó péptido irrelevante de Prpf31 como control. Diecinueve días después de la estimulación, las células se sometieron a ensayo para determinar la sensibilidad a los péptidos indicados.

La Figura 11 muestra la inmunogenicidad protectora contra tumores del Tnp3 mutado en ratones que no se inmunizaron (sin tratamiento previo) o se inyectaron con 50 μ g de CpG ODN1826 (CpG), 50 μ g de péptido Tnp3 (Tnp3) o ambos y se sometieron a prueba de provocación con MethA. (Panel superior) Se muestran las curvas de crecimiento de tumores en ratones individuales. Los números entre paréntesis muestran el número de ratones en los que los tumores remitieron completamente/número total de ratones en ese grupo. El panel inferior muestra el ABC como una medida del crecimiento del tumor para cada grupo.

La Figura 12 muestra la inmunogenicidad protectora contra tumores del Tnp3 mutado en ratones que no estaban inmunizados o estaban inmunizados, según se indica, y se sometieron a prueba de provocación. Se proporcionó anticuerpo anti-CD25 (clon PC61, 250 μ g, dos días antes de la prueba de provocación tumoral) o anticuerpo anti-CTLA-4 (clon 9D9, 100 μ g, siete días antes y cada tres días después de la prueba de provocación tumoral), según se indica. El panel inferior muestra el ABC como una medida del crecimiento del tumor para cada grupo.

Los expertos en la materia apreciarán y comprenderán las características descritas anteriormente y otras a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada

La fidelidad incompleta de la replicación del ADN es el motor que impulsa la creación constante de variación (mutaciones) y selección natural en todas las células, incluyendo las células cancerosas. Las mutaciones oncogénicas de los cánceres y otros cambios que confieren un beneficio de supervivencia a las células cancerosas, han atraído la mayor parte de la atención en el estudio de la genómica del cáncer hasta el momento. Estas mutaciones que están directamente relacionadas con la progresión del tumor o la oncogénesis se denominan mutaciones oncoiniciadoras. Las mutaciones secundarias, por el contrario, no contribuyen al desarrollo del cáncer, sino que son mutaciones biológicamente inertes que se transmiten al tumor final. Las mutaciones secundarias son mucho menos interesantes que las mutaciones oncoiniciadoras desde una perspectiva biológica celular, puesto que nos enseñan poco acerca del fenotipo transformado de las células. Sin embargo, la aleatoriedad de las mutaciones secundarias las hace únicas para cada tumor individual. Es importante tener en cuenta que el sistema inmunitario simplemente reconoce y reacciona a las diferencias, independientemente de sus consecuencias funcionales, es decir, las mutaciones oncoiniciadoras y secundarias son inmunitariamente igualmente significativas y son identificadores únicos de tumores particulares.

A pesar de su promesa inmunológica, las mutaciones secundarias no han recibido un escrutinio inmunológico significativo, al menos en parte porque son aleatorias y difíciles de identificar. Sin embargo, la experiencia con inmunoterapia de linfomas de células B, que albergan idiotipos distintos (que son "equivalentes de mutaciones secundarias") proporciona respaldo clínico y experimental a la idea de que las mutaciones secundarias pueden usarse en aplicaciones de inmunoterapia. La disponibilidad de técnicas tales como la secuenciación de ADN de alto rendimiento y la bioinformática permite la identificación de mutaciones oncoiniciadoras y secundarias, lo que hace que las mutaciones secundarias estén disponibles para el análisis inmunológico. En la presente divulgación, se identificaron las mutaciones secundarias de varios tumores, se diseccionó el vasto repertorio de epítomos creados por ellos y se observó una gama de sus actividades antitumorales inmunitarias. Como se demuestra adicionalmente en el presente documento, las mutaciones secundarias identificadas y otros neoepítomos no son idénticos en su capacidad

para mediar en la protección contra tumores. Por tanto, además de identificar un espectro de neoepítomos de un tumor, en el presente documento se describe un nuevo principio y un algoritmo novedoso, el Índice Agretópico Diferencial o el IAD, que predice las propiedades protectoras contra tumores de neoepítomos mutacionales. El IAD permite reducir la lista de epítomos a un pequeño número de epítomos protectores contra tumores. En el presente documento también se describe una nueva canalización de bioinformática (Epi-Seq) que hizo posible estos análisis. Los métodos y composiciones que se describen en el presente documento constituirán un gran salto en nuestra capacidad para implementar realmente la inmunoterapia personalizada basada en la genómica contra el cáncer humano.

Específicamente, como se muestra en el presente documento, a través de un análisis genómico, completo bioinformático e inmunológico, se han identificado cientos de neoepítomos de cánceres de ratón y humanos, no identificados anteriormente mediante análisis de linfocitos T. Solo una pequeña proporción de neoepítomos provoca protección contra el crecimiento tumoral. Inesperadamente, la afinidad prevista de los neoepítomos para CMH I no tiene relación con la inmunogenicidad antitumoral protectora; En su lugar, la diferencia numérica de dichas afinidades entre las secuencias mutadas y sin mutar, que se describe en el presente documento como el Índice Agretópico Diferencial (IAD), es un predictor significativo. Sorprendentemente, aproximadamente el 15 % de las secuencias normales provocan respuestas anti-CD8 propias. Estos hallazgos arrojan nueva luz sobre la inmunidad contra lo propio y lo no propio y proporcionan nuevas oportunidades en el desarrollo de terapias inmunológicas para el cáncer.

La invención reivindicada proporciona un método de identificación de epítomos tumorales en un paciente con cáncer, que comprende:

secuenciar al menos una porción del ARN o ADN del paciente con cáncer tanto en un tejido sano como en un tejido canceroso, para producir una secuencia de ARN o ADN de tejido sano y una secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso,

comparar la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ADN o ARN de tejido canceroso e identificar las diferencias entre la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso para producir un conjunto de marcadores de ADN de diferencia,

analizar el conjunto de marcadores de ADN de diferencia para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el conjunto de epítomos específicos de tumor comprende uno o más epítomos específicos de tumor, proporcionar un valor numérico denominado Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo en el conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el índice Agretópico Diferencial se calcula restando una puntuación numérica para un epítopo normal de una puntuación numérica para el epítopo específico de tumor, donde las puntuaciones numéricas se producen usando un algoritmo predictivo que determina la unión de los péptidos de epítopo a las moléculas del CMH, y

clasificar el conjunto de epítomos específicos de tumor mediante el Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo del conjunto.

Se describe un proceso adicional de producción de una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor o uno o más polipéptidos que contienen los epítomos específicos de tumor o polinucleótidos que codifican uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor, en el que los péptidos de epítomos específicos de tumor son del conjunto de epítomos específicos de tumor y un vehículo farmacéuticamente aceptable basado en el Índice Agretópico Diferencial.

Una opción adicional es inmunizar al paciente con cáncer con la composición farmacéutica.

Dichas composiciones farmacéuticas comprenden opcionalmente además un agente adyuvante o inmunomodulador.

En una realización, la secuenciación de al menos una porción del ARN o ADN del paciente con cáncer tanto en un tejido sano como en un tejido canceroso comprende la secuenciación del transcriptoma, la secuenciación del genoma o la secuenciación del exoma. La secuenciación del transcriptoma es la secuenciación del ARN mensajero o de las transcripciones a partir de una célula. El transcriptoma es el pequeño porcentaje del genoma (menos del 5 % en seres humanos) que se transcribe en ARN. La secuenciación del genoma es la secuenciación de la secuencia completa de ADN del genoma de un organismo. La secuenciación del exoma es la secuenciación de las partes que codifican proteínas del genoma. En una realización específica, la secuenciación es la secuenciación del transcriptoma, lo que permite la identificación de las mutaciones que se expresan en los tumores.

En otro aspecto, la profundidad de la secuenciación puede ser variada. En la secuenciación de última generación, se producen y secuencian fragmentos solapantes de la muestra de ADN de interés. Las secuencias solapantes después se alinean para producir el conjunto completo de lecturas de secuencia alineadas. La profundidad de la secuenciación, también denominada cobertura de la secuenciación, se refiere al número de nucleótidos que contribuyen a una porción de un ensamblaje. Basándose en el genoma, la profundidad de la secuencia se refiere al número de veces que se ha secuenciado cada base. Por ejemplo, un genoma secuenciado a 30X significa que cada base en la secuencia fue cubierta por 30 lecturas de secuenciación. Basándose en los nucleótidos, la profundidad de la secuenciación se refiere al número de secuencias que añadieron información acerca de un solo nucleótido.

En un aspecto, el ARN o ADN se aísla de tumor y de tejido sano mediante el aislamiento de ARN poliA+ de cada

tejido, la preparación de ADNc y la secuenciación del ADNc usando cebadores convencionales. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia. Asimismo, la secuenciación de todo o una porción del genoma de un paciente es bien conocida en la técnica. Los métodos de secuenciación de ADN de alto rendimiento son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el sistema HiSeq™ 2000 de Illumina® Sequencing Technology, que usa un enfoque de secuenciación por síntesis paralela grande para generar miles de millones de bases de secuencia de ADN de alta calidad por ejecución.

En determinadas realizaciones, se secuencian porciones particulares del genoma del paciente con cáncer, dependiendo del tumor, por ejemplo. En la mayoría de los casos, se prefiere la secuenciación de todo el genoma/transcriptoma; el genoma puede secuenciarse a una profundidad baja o profunda, permitiendo la cobertura de menos o más porciones del genoma/transcriptoma.

Opcionalmente, el conjunto de epítomos específicos de tumor se refina para proporcionar un conjunto de epítomos específicos de tumor restringidos por el CMH. Por ejemplo, pueden proporcionarse epítomos restringidos por el CMH I de los alelos K, D o L. Los conjuntos de epítomos restringidos por el CMH pueden producirse determinando la unión de un péptido que contiene el epítomo a un péptido específico de alelo de CMH. Un ejemplo de un algoritmo de este tipo es NetMHC-3.2, que predice la unión de los péptidos a varios alelos de HLA diferentes mediante el uso de redes neuronales artificiales (ANN, por sus siglas en inglés) y matrices de peso.

Específicamente, las diferencias de secuencia de ADN (o ARN) entre los tejidos sanos y cancerosos, en combinación con la composición del CMH de un mamífero, se analizan mediante un algoritmo predictor de epítomos tal como NetMHC. Este algoritmo produce una lista de epítomos específicos de tumor potenciales para este mamífero individual y proporciona a cada epítomo una puntuación numérica. En el estado actual de la técnica, una puntuación alta implica una buena probabilidad de que el epítomo sea capaz de inmunizar y una puntuación baja (incluyendo una negativa) implica una probabilidad baja de que el epítomo sea capaz de inmunizar.

El método comprende adicionalmente proporcionar una puntuación numérica para cada epítomo en el conjunto de epítomos específicos de tumor o el conjunto de epítomos específicos de tumor restringidos por el CMH, en el que la puntuación numérica se calcula restando una puntuación para el epítomo normal (sin mutar) de una puntuación para el epítomo específico de tumor (mutado). La puntuación numérica para el epítomo normal se resta de la puntuación numérica para el epítomo de cáncer mutante y se obtiene un valor numérico para la diferencia: el Índice Agretópico Diferencial (IAD) para el epítomo. Los posibles epítomos se clasifican basándose en el IAD. En esta presente clasificación, en términos generales, cuanto mayor sea la diferencia para un epítomo determinado, mayor será la probabilidad de que la inmunización con él sea protectora contra el tumor. Preferentemente, los epítomos mejor clasificados se usan para inmunizar a un individuo. Adicionalmente, el método comprende clasificar el conjunto de epítomos específicos de tumor o el conjunto de epítomos específicos de tumor restringidos por el CMH mediante el Índice Agretópico Diferencial para cada epítomo en el conjunto. En un aspecto, el método comprende adicionalmente el uso de la clasificación mediante el Índice Agretópico Diferencial para identificar un subconjunto de 10 a 50 epítomos específicos de tumor mejor clasificados. Mejor clasificados significa los epítomos con el IAD más favorable.

Como ejemplo, si el ADN mutado en el cáncer, en un sitio determinado, codifica una secuencia de aminoácidos de GYS-VLHLAII (SEQ ID NO. 128) y la secuencia sin mutar correspondiente en el tejido normal es GDSVLHLAII (SEQ ID N.º 129). El algoritmo predictivo (NetMHC en este caso) proporciona una puntuación numérica de +7,3 para la secuencia de cáncer y una puntuación de -4,3 para la secuencia normal. El IAD es de 11,6. Este IAD se usa para clasificar este epítomo.

En el estado actual de la técnica, la puntuación numérica de un epítomo mutado proporcionada por el algoritmo predictivo tal como NetMHC es la guía principal o única para la inmunización; cuanto mayor sea la puntuación proporcionada por dicho algoritmo tradicional, mejor se espera que sea un péptido. En el análisis de los presentes inventores, este no es un buen método de predicción para la protección contra tumores. Ventajosamente, mediante los métodos que se desvelan en el presente documento, (a) los algoritmos tradicionales (como NetMHC) para predecir la puntuación del homólogo sin mutar y (b) la diferencia entre el epítomo mutado y sin mutar, se usan como guía para predecir la inmunogenicidad antitumoral de un epítomo peptídico.

En una realización específica, analizar la diferencia entre el conjunto de marcadores de ADN para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor es independiente de si uno o más epítomos específicos de tumor están relacionados con vías causantes de cáncer. Los métodos anteriores para analizar el ADN de los pacientes con cáncer se centraron en los mecanismos genéticos que provocan el cáncer o los que los impulsan, mientras que el enfoque actual es agnóstico sobre ese tema. El enfoque que se describe en el presente documento tiene como objetivo atacar el cáncer en cualquier punto en el que sea diferente de lo normal, independientemente de si esa diferencia es responsable de provocar cáncer o no. Una consecuencia importante de esta diferencia es que los otros enfoques se basan principalmente en decidir qué medicamentos existentes (o futuros) usar para cada paciente y no en diseñar un medicamento para cada paciente. El presente método se centra en el diseño de un medicamento para tratar un tumor particular.

Una ventaja del método que se describe en el presente documento es el enfoque en las diferencias en las secuencias

de ADN que son específicas para el cáncer. Por el contrario, con un pequeño número de excepciones notables (ras, p53, traslocaciones bcr-abl, etc.), la mayoría de los mecanismos genéticos que provocan cáncer no son realmente específicos del cáncer; en su lugar, las células normales en algunas circunstancias normales también los usan. Por tanto, son selectivos para el cáncer, uniéndose preferentemente a las células cancerosas sobre las células normales, pero no son específicos del cáncer, uniéndose tanto a las células cancerosas como a las células normales. El enfoque que se describe en el presente documento se centra en los epítomos que son específicos del cáncer. Un beneficio distintivo del uso de marcadores específicos del cáncer en lugar de marcadores selectivos para el cáncer es la toxicidad reducida de las vacunas que se producen. Las ventajas adicionales incluyen el uso de la terapia inmunitaria en oposición a la terapia farmacológica que permite la creación de vacunas que tienen especificidad para el cáncer real en el paciente.

La identificación de las diferencias entre la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y una secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso para producir un conjunto de marcadores de ADN de diferencia puede realizarse usando tecnologías de bioinformática conocidas en la técnica. En una realización, la selección inicial incluye todos los cambios identificables en el genoma del paciente con cáncer. Los cambios incluyen tanto los cambios sinónimos (que no cambian el aminoácido codificado) como los cambios no sinónimos (que cambian el aminoácido codificado). Como se explica en los ejemplos, la inmunoección da como resultado una reducción en el número de mutaciones no sinónimas en comparación con el porcentaje previsto. En un aspecto, un cambio en un marcador de ADN es una variante de un solo nucleótido (SNV, por sus siglas en inglés).

Como se usa en el presente documento, un epítipo tumoral o antígeno tumoral es un antígeno peptídico que se produce en las células tumorales. Se han identificado muchos antígenos tumorales en seres humanos así como en ratones, por ejemplo, se encuentran diversos productos anormales de ras y p53 en una diversidad de tumores. Además de los antígenos tumorales que se encuentran habitualmente en diferentes tipos de tumores, los presentes inventores han reconocido que, dependiendo del tamaño del tumor y del grado de inestabilidad genética, los tumores humanos pueden tener de decenas a cientos de epítomos verdaderamente específicos de tumores. Como se usa en el presente documento, un epítipo específico de un tumor es un epítipo que es específico de un tumor particular y generalmente no se reconoce como un antígeno tumoral.

En el presente documento también se describen péptidos de epítomos específicos de tumor aislados identificados mediante los métodos que se desvelan en el presente documento. Un péptido "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otro polipéptido contaminante de la fuente celular o tisular de la que deriva la proteína o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptido en las que el polipéptido se separa de los componentes celulares de las células de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. Los péptidos de epítomos específicos de tumor generalmente tienen longitudes de 7 a 25 aminoácidos, específicamente de 8 a 15 aminoácidos.

Los péptidos individuales identificados en el conjunto de epítomos específicos de tumor pueden someterse a ensayo para determinar su inmunogenicidad usando métodos conocidos en la técnica.

Puede emplearse un péptido correspondiente a cada epítipo específico de tumor. Como alternativa, puede emplearse un polipéptido que contenga dos o más epítomos específicos de tumor. Puede emplearse un polipéptido que contenga múltiples epítomos específicos de tumor, opcionalmente separados por enlazadores no epítipo. Dichos polipéptidos pueden ser diseñados fácilmente por un experto en la materia.

En lugar de péptidos específicos de tumor, una composición farmacéutica puede comprender uno o más polinucleótidos que codifique los péptidos. Todos los péptidos pueden expresarse a partir de la misma molécula de polinucleótido o a partir de múltiples moléculas de polinucleótido.

"Polinucleótido" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 5 bases de longitud. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. Los polinucleótidos pueden insertarse en un vector o vectores de expresión recombinantes. La expresión "vector de expresión recombinante" se refiere a un plásmido, virus u otro medio conocido en la técnica que se ha manipulado mediante inserción o incorporación de la secuencia genética del péptido. El término "plásmidos" generalmente se designa en el presente documento mediante una "p" minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números, de acuerdo con las convenciones de denominación convencionales que son familiares para los expertos en la materia. Los plásmidos que se desvelan en el presente documento están disponibles en el mercado, están disponibles al público de manera no restringida o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles mediante la aplicación rutinaria de procedimientos publicados bien conocidos. Muchos plásmidos y otros vectores de clonación y expresión son bien conocidos y están fácilmente disponibles, o los expertos en la materia pueden construir fácilmente cualquier número de otros plásmidos adecuados para su uso. Estos vectores pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada para formar un sistema de vector de célula hospedadora para la producción de un polipéptido.

Los polinucleótidos que codifican péptidos pueden insertarse en un vector adaptado para la expresión en una célula bacteriana, de levadura, de insecto, de anfibio o de mamífero que comprende, adicionalmente, los elementos

reguladores necesarios para la expresión de la molécula de ácido nucleico en la célula bacteriana, de levadura, de insecto, de anfibios o de mamífero unida operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica los péptidos. "Unida operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de este modo están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control de la expresión unida operativamente a una secuencia codificante se une de manera que la expresión de la secuencia codificante se consiga en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias de control de la expresión" se refiere a secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la que se unen operativamente. Las secuencias de control de expresión se unen operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por tanto, las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores apropiados, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) frente a un gen que codifica proteína, señales de corte y empalme para intrones (si hay intrones presentes), y el mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada del ARNm y los codones de parada. La expresión "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, componentes cuya presencia pueda influir en la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias de compañeros de fusión. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor. Por "promotor" se entiende una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable por señales específicas de células, específicas de tejido o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar ubicados en las regiones 5' o 3' del gen. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles.

Una composición farmacéutica (por ejemplo, una vacuna) puede comprender al menos un péptido de epítipo específico de tumor aislado (o ARN o ADN que codifique dichos péptidos de epítipo) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes y adyuvantes. Como se usa en el presente documento, los "excipientes farmacéuticamente aceptables" son bien conocidos por los expertos en la materia. En una realización, una composición farmacéutica permite la entrega local del principio activo, por ejemplo, la entrega directamente a la ubicación de un tumor.

Una composición farmacéutica puede comprender de 1 a 100 péptidos de epítopos específicos de tumor del conjunto de epítopos específicos de tumor, específicamente de 3 a 20 péptidos de epítopos específicos de tumor del conjunto de epítopos específicos de tumor. Como alternativa, una composición farmacéutica puede comprender un polipéptido que contenga de 1 a 100 péptidos de epítopos específicos de tumor del conjunto de epítopos específicos de tumor, específicamente de 3 a 20 péptidos de epítopos específicos de tumor del conjunto de epítopos específicos de tumor. Como alternativa, una composición farmacéutica puede comprender un polinucleótido que codifique de 1 a 100 péptidos de epítopos específicos de tumor del conjunto de epítopos específicos de tumor, específicamente de 3 a 20 péptidos de epítopos específicos de tumor del conjunto de epítopos específicos de tumor.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, nasal, oral, rectal, vaginal o intraperitoneal pueden comprender convenientemente soluciones acuosas estériles del principio activo con soluciones que sean preferentemente isotónicas con la sangre del receptor. Dichas formulaciones pueden prepararse convenientemente disolviendo el péptido en agua que contenga sustancias fisiológicamente compatibles, tales como cloruro de sodio (por ejemplo, 0,1-2,0 M), glicina y similares, y que tenga un pH tamponado compatible con las condiciones fisiológicas para producir una solución acuosa, y convertir dicha solución en estéril. Éstas pueden estar presentes en recipientes unitarios o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas selladas o viales.

Pueden emplearse métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción. Pueden conseguirse preparaciones de liberación controlada mediante el uso de un polímero para formar complejo con o absorber los péptidos o ácidos nucleicos. La entrega controlada puede ejercerse seleccionando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliéster, poliamino ácidos, polivinilo, pirrolidona, etilvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina) y la concentración de macromoléculas, así como los métodos de incorporación con el fin de controlar la liberación. Otro posible método para controlar la duración de la acción mediante preparaciones de liberación controlada es incorporar una proteína, péptidos y análogos de los mismos en partículas de un material polimérico, tal como poliésteres, poliamino ácidos, hidrogeles, ácido poliláctico) o copolímeros de etileno y acetato de vinilo. Como alternativa, en lugar de incorporar estos agentes en partículas poliméricas, es posible atrapar estos materiales en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en sistemas de entrega de fármacos coloidales, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones.

La administración local al sitio afectado puede lograrse por medios conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, aplicación tópica, inyección e implantación de un dispositivo poroso que contenga células que expresen los péptidos de forma recombinante, implantación de un dispositivo poroso en el que estén contenidos los péptidos.

Los péptidos o polinucleótidos específicos de tumor pueden mezclarse con las células del paciente con cáncer, por ejemplo, mediante mezcla o pulso, y después administrar las células mezcladas o pulsadas al paciente con cáncer.

Una composición de vacuna puede comprender adicionalmente un agente inmunomodulador. Los agentes inmunomoduladores de ejemplo incluyen ligandos de TLR tales como, por ejemplo, ADN de oligonucleótido CpG (un ligando de TLR9), lipopéptidos y lipoproteínas (ligandos de TLR1 y TLR2), poli I:C y ARN bicatenario (ligandos de TLR3), lipopolisacárido (ligando de TLR4), diacil lipopéptido (ligandos de TLR6), imiquimod (un ligando de TLR7) y combinaciones de ligandos de TLR. Otro ejemplo de agente inmunomodulador es un anticuerpo tal como el anticuerpo de anti antígeno T4 de linfocito T citotóxico (anti-CTLA-4) o un anticuerpo que bloquea la muerte programada 1 (PD1) o un ligando de PD1.

También se contemplan combinaciones de agentes inmunomoduladores. Son ejemplos: una combinación de la vacuna con un ligando de TLR y un anticuerpo anti-CTLA4, o con CpG y un anticuerpo que bloquee la PD1.

Una composición farmacéutica puede comprender uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor de un conjunto de epítomos específicos de tumor y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el conjunto de epítomos específicos de tumor no incluye vías causantes de cáncer conocidas, en la que el conjunto de epítomos específicos de tumor es específico de un tumor de un paciente con cáncer. Como se usa en el presente documento, un conjunto de epítomos específicos de tumor es un grupo de epítomos identificados mediante la comparación del ADN tumoral con el ADN de tejido normal en el paciente con cáncer y el uso del algoritmo IAD.

Como se usa en el presente documento, un paciente es un mamífero, tal como un ratón o un ser humano, específicamente un paciente humano.

Las composiciones y métodos que se describen en el presente documento son aplicables a todos los cánceres, incluyendo cánceres de tumores sólidos, por ejemplo, los de mama, próstata, ovarios, pulmones y cerebro y cánceres hemolinfáticos, tales como las leucemias y los linfomas.

Los métodos que se describen en el presente documento pueden combinarse adicionalmente con terapias adicionales para el cáncer tales como radioterapia, quimioterapia, cirugía y combinaciones de las mismas.

En el presente documento se desvela un método de selección de un paciente con cáncer para inmunoterapia. Como se explica en el Ejemplo 2, se descubrió inesperadamente que los nuevos cánceres primarios tienen una baja proporción de variantes de un solo nucleótido que codifican cambios no sinónimos (aproximadamente un 78 % en estirpes tumorales de larga duración y un 23-46 % en los nuevos cánceres primarios). Sin quedar vinculado a teoría alguna, se cree que el número reducido de mutaciones no sinónimas en los nuevos cánceres primarios se debe a la respuesta agresiva del sistema inmunitario a los nuevos cánceres. Los pacientes con tumores nuevos son mejores candidatos para inmunoterapia debido al alto nivel de actividad del sistema inmunitario. Por tanto, la proporción de variantes de un solo nucleótido no sinónimas en un tumor puede usarse para identificar candidatos para ensayos clínicos para evaluar la inmunoterapia, así como el tratamiento usando inmunoterapia.

Por tanto, se describe un método de identificación de a un paciente con cáncer como candidato para inmunoterapia, que comprende secuenciar al menos una porción del ARN o ADN del paciente con cáncer tanto en un tejido sano como en un tejido canceroso, para producir una secuencia de ARN o ADN de tejido sano y una secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso, comparar la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ADN o ARN de tejido canceroso e identificar las diferencias entre la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso para producir un conjunto de marcadores de ADN de diferencia, analizar el conjunto de marcadores de ADN de diferencia para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el conjunto de epítomos específicos de tumor comprende uno o más epítomos específicos de tumor, cuantificar el porcentaje de variantes de un solo nucleótido no sinónimas en el conjunto de epítomos específicos de tumor, e identificar al paciente con cáncer como candidato para inmunoterapia cuando menos del 65 % de las variantes de un solo nucleótido en el conjunto de epítomos específicos de tumor son variantes de un solo nucleótido no sinónimas.

El paciente con cáncer puede identificarse como candidato para inmunoterapia cuando menos del 50 %, menos del 45 %, menos del 40 %, menos del 35 %, menos del 30 % o incluso menos del 25 % de las variantes de un solo nucleótido en el conjunto de epítomos específicos de tumor son variantes de un solo nucleótido no sinónimas.

Cuando se identifica al paciente como candidato para inmunoterapia, el método comprende adicionalmente proporcionar una puntuación numérica denominada Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo en el conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el Índice Agretópico Diferencial se calcula restando una puntuación para un epítopo normal de una puntuación para el epítopo específico de tumor como se describe en el presente documento. El método también comprende opcionalmente producir una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor o uno o más polinucleótidos que codifican el uno o más péptidos de epítomos específicos de tumor, en el que el uno o más péptidos de epítomos

específicos de tumor se seleccionan entre el conjunto de epítomos específicos de tumor y, opcionalmente, administrar la composición farmacéutica al paciente con cáncer.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

5

Ejemplos

Materiales y métodos

10 Ratones y tumores. Los ratones BALB/cJ (hembras de 6-8 semanas de edad) se adquirieron en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME). El Dr. Adam Adler proporcionó los ratones B 10.D2 TRAMP. Los ratones se mantuvieron en las instalaciones libres de virus en el Centro de Salud de la Universidad de Connecticut. Meth A y CMS5 son fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno en ratones BALB/c.

15 Preparación de la muestra. Las muestras se prepararon usando el protocolo Illumina® descrito en "*Preparing Samples for Sequencing of mRNA*" (Parte n.º 1004898 Rev. A Septiembre de 2008). El protocolo consiste en dos partes: síntesis de ADNc y preparación de bibliotecas de extremos apareados. En primer lugar, se purificó ARNm a partir de ARN total usando perlas magnéticas de oligo(dT), después se fragmentó usando cationes divalentes a temperatura elevada. El ADNc se sintetizó a partir del ARNm fragmentado usando Superscript® II (Invitrogen™), seguido de la síntesis de la
20 2ª cadena. Los extremos de los fragmentos de ADNc se repararon y se fosforilaron usando Klenow, ADN polimerasa T4 y polinucleótido cinasa T4. A continuación, se añadió una base 'A' al extremo 3' de los fragmentos romos, seguido de la ligadura de los adaptadores de extremos apareados Illumina® a través de la ligadura mediada por T-A. Los productos ligados se seleccionaron por tamaño mediante purificación en gel y después se amplificaron por PCR usando cebadores de extremos apareados Illumina®. El tamaño y la concentración de la biblioteca se determinaron
25 usando un bioanalizador Agilent.

Condiciones de ejecución GAI. La biblioteca de RNA-seq se sembró en la célula de flujo a 8 pM, produciendo aproximadamente de 282.000 a 384.000 agrupamientos por placa de cerámica. La biblioteca se secuenció usando 61
30 ciclos de química y formación de imágenes.

Análisis de datos de secuenciación. El procesamiento de datos inicial y la llamada de base, incluyendo la extracción de intensidades de agrupamiento, se realizó usando RTA (SCS versión 2.6 y SCS versión 2.61). El script de filtrado de calidad de secuencia se ejecutó en el software Illumina® CASAVA (versión 1.6.0, Illumina®, Hayward, CA).

35 Canalización de bioinformática Epi-Seq. En la Figura 1 se proporciona una representación de alto nivel de la canalización de bioinformática utilizada para identificar epítomos específicos de tumor a partir de datos de secuenciación de ARNm de alto rendimiento (RNA-Seq). La canalización comienza cartografiando las lecturas de RNA-Seq contra las secuencias de genoma específicas de la cepa descargadas del Proyecto de Genomas de Ratón de Sanger y una biblioteca de transcripciones haploides específicas de cepas derivadas de las anotaciones CCDS.
40 Los inventores usaron secuencias de genoma/transcriptoma de BALB/c para las estirpes celulares CMS5 y Meth A y secuencias C57BL para los tumores de próstata espontáneos generados a partir de ratones B10D2. Las lecturas se cartografiaron usando Bowtie con la longitud de molécula inicial predeterminada de 28, un máximo de 2 desapareamientos en la molécula inicial y la suma máxima de puntuaciones de calidad de phred en las posiciones de desapareamiento de 125. Después de una ronda inicial de cartografiado, los inventores calcularon las estadísticas de
45 desapareamiento para cada posición de lectura y cada muestra (datos no mostrados). Basándose en este análisis, se recortaron 2 bases del extremo 5' y 10 bases del extremo 3' de todas las lecturas alineadas. Las alineaciones de lectura resultantes se combinaron usando el algoritmo HardMerge. HardMerge descarta lecturas que se alinean con múltiples ubicaciones en el genoma y/o transcriptoma, así como lecturas que se alinean de forma única con ambas, pero en ubicaciones discordantes. Para reducir el efecto del sesgo introducido por la amplificación por PCR durante
50 la preparación de la biblioteca, los inventores reemplazaron las lecturas múltiples con alineamientos que comienzan en la misma ubicación genómica con su consenso. El algoritmo SNVQ se usó después para llamar variantes de un solo nucleótido (SNV) del conjunto filtrado de lecturas alineadas. SNVQ usa la regla de Bayes para llamar al genotipo con la mayor probabilidad teniendo en cuenta al mismo tiempo las puntuaciones de calidad de las bases. Se seleccionaron SNV de alta confianza requiriendo una puntuación mínima de calidad de phred de 50 para cada genotipo
55 llamado, un mínimo de 3 lecturas que respalden el alelo alternativo, con al menos un cartografiado de lectura en cada cadena. La inferencia de haplotipos sobre los genotipos de SNV llamados se realizó usando el algoritmo de haplotipado individual simple RefHap en el que se usan evidencias de lectura para bloques de fase de SNV proximales. Puesto que se predice que la heterocigosidad residual en los ratones consanguíneos utilizados en los experimentos será baja, se consideró que las SNV heterocigóticas únicas eran mutaciones somáticas novedosas. Se asumió que tanto las
60 SNV homocigóticas como las SNV heterocigóticas compartidas por más de un tumor con el mismo entorno genómico eran mutaciones de la estirpe germinal y no se usaron para la predicción del epítipo a menos que se encontraran cerca de una SNV heterocigótica única. Para cada SNV heterocigótica única, se generaron secuencias peptídicas de referencia y alternativas basadas en los dos haplotipos inferidos para cada transcripción de CCDS. Las secuencias de aminoácidos generadas se ejecutaron a través del programa de predicción de epítomos NetMHC 3.0 y se puntuaron
65 usando el algoritmo de Matriz de Peso de Perfil (PWM, por sus siglas en inglés) con umbrales de detección predeterminados.

Ensayos de unión. La unión de péptidos a H-2 K^d se determinó usando ensayos cuantitativos basados en la inhibición de la unión de un péptido patrón radiomarcado a moléculas de CMH purificadas, esencialmente como se conoce en la técnica. En resumen, se co-incubó de 0,1 a 1 nM de un péptido de unión a CMH conocido radiomarcado (péptido de motivo consenso H-2 1079,03; secuencia KFNPMFTYI (SEQ ID NO. 1) a temperatura ambiente con cantidades variables de péptidos de ensayo sin marcar, moléculas de H-2 K^d 1-10 nM purificadas mediante cromatografía de afinidad, un cóctel de inhibidores de proteasa y β 2-microglobulina humana 1 μ M (Scripps Laboratories, San Diego, CA). Después de una incubación de 2 días, los complejos de CMH-péptido se capturaron en microplacas LUMITRAC 600 (Greiner Bio-one, Longwood, FL) recubiertas con el anticuerpo monoclonal SF1-1.1.1. La radioactividad unida se midió usando un contador de microcentelleo TopCount® (Packard Instrument Co., Meriden, CT). Después se calculó la concentración de péptido que produce un 50 % de inhibición de la unión del péptido de sonda radiomarcada (CI₅₀). Los péptidos se sometieron a ensayo normalmente a seis concentraciones diferentes cubriendo un intervalo de dosis de 100.000 veces y en tres o más ensayos independientes. Con las condiciones utilizadas, donde [marcador]<[CMH] y CI₅₀ $\geq$ [CMH], los valores de CI₅₀ medidos son aproximaciones razonables de los valores de KD.

Inmunización de la almohadilla de la pata. Se emulsionaron péptidos (300 μ g de péptido en 75 μ l de PBS) mediante agitación con formación de vórtice con 75 μ l de TiterMax® (Sigma-Aldrich®, San Luis, MO) a 2.500 RPM durante 30 min. Los ratones se inmunizaron con 50 μ l de emulsión en la almohadilla de la pata. Una semana después, se recogieron Gld poplíteos para el ensayo de IFN- γ intracelular.

Ensayo de IFN- γ intracelular. Se incubaron esplenocitos o linfocitos con o sin péptido 1-10 μ g/ml. Se añadió GolgiPlug™ (BD™ Biosciences, San José, CA) 1 hora después. Después de la incubación de 12 a 16 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %, las células se tiñeron para CD44 (clon IM7), CD4 (clon GK1.5) y CD8 (clon 53-6.7) (BD™ Biosciences, San José, CA), se fijaron y permeabilizaron usando el kit Cytofix/Cytoperm™ (BD™ Biosciences, San José, CA) y se tiñeron para IFN- γ intracelular usando IFN- γ anti-ratón conjugado con ficoeritrina (clon XMG1.2, BD™ Biosciences, San José, CA). Las células se tiñeron con 1 μ l de anticuerpo/millón de células en 50 μ l de tampón de tinción (PBS con albúmina de suero bovino al 1 %) y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C en la oscuridad o de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se evaluaron en un citómetro de flujo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San José, CA) y los resultados se analizaron usando el software FlowJo (TreeStar, San Carlos, CA). Se cuantificaron CD44 de superficie e IFN- γ intracelular en células CD8⁺CD4⁺ activadas.

Prueba de provocación tumoral y representación del crecimiento tumoral. Se inmunizaron ratones BALB/cJ dos veces por semana con inyecciones intradérmicas de esplenocitos pulsados con péptido irradiado (2000 rad). Los ratones se afeitaron el día antes de la prueba de provocación tumoral. Siete días después de la última inmunización, se inyectaron 100.000 células vivas de ascitis Meth A o 200.000 células CMS5 cultivadas (viabilidad > 98 % mediante exclusión con azul de tripano) por vía intradérmica en el flanco inferior derecho de los ratones. En algunos experimentos, se combinaron terapias inmunomoduladoras con la inmunización. Algunos ratones se inyectaron por vía subcutánea dos veces por semana con 50 μ g de CpG ODN1826 (InvivoGen™, San Diego, CA). Para dirigirse a células CD25⁺, se inyectaron 250 μ g de mA b anti-CD25 (clon PC61, IgG1 de rata, Centro de Anticuerpos Monoclonales en MSKCC, Nueva York, NY) por vía intraperitoneal dos días antes de la prueba de provocación tumoral. Se inyectaron cien microgramos de anticuerpo anti-CTLA-4 (clon 9D9, IgG2b de ratón, BioXCell, West Lebanon, NH) por vía intraperitoneal siete días antes y cada tres días después de la prueba de provocación tumoral. Se midieron los diámetros de los tumores con calibradores dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores se ulceraron, alcanzaron un diámetro máximo de 20 mm o cuando los ratones mostraron algún signo de incomodidad. El ABC como herramienta para medir el crecimiento tumoral se ha descrito en la técnica. En resumen, se calculó el ABC seleccionando "Curvas y regresión" y después "Área bajo la curva" de la herramienta "analizar", usando Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Se usó el ensayo de Grubb para retirar hasta un valor atípico de cada grupo.

Análisis estadístico. Se calcularon valores de P para las comparaciones de grupo usando un ensayo de Mann-Whitney no paramétrico de dos colas, usando GraphPad Prism® 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla CA). Para los ensayos de rechazo tumoral, se usó el ensayo de Grubb para retirar hasta un valor atípico de cada grupo. Se usó el ensayo exacto de Fisher para evaluar la correlación entre dos parámetros.

Ejemplo 1: De transcriptomas a inmunomas.

Se secuenciaron transcriptomas de seis tumores de ratón del haplotipo d (fibrosarcomas CMS5 y Meth A de ratones BALB/c y cuatro adenocarcinomas de próstata primarios de ratones B10.D2 TRAMP) a diferentes profundidades. La secuenciación del transcriptoma se eligió sobre la secuenciación del genoma o el exoma con el fin de identificar mutaciones específicamente en los genes expresados en los tumores. En términos generales, las secuencias de ADNc obtenidas se compararon con las secuencias normales de ratón y se identificaron variantes de un solo nucleótido (SNV) en cada tumor individual (Tabla 1).

Tabla 1: Variantes de un solo nucleótido y epítomos predichos de estirpes tumorales y tumores primarios deducidos a partir de secuenciación del transcriptoma y análisis bioinformáticos.

Cepa de ratón	BALB/c		B10.D2 TRAMP			
Tipo de tumor	Meth A	CMS5	ProCa1	ProCa2	ProCa3	ProCa4

Lecturas de RNA-Seq (millones)	105,8	23,4	74,2	38,3	30,5	15,1
Genoma cartografiado	75 %	54 %	61 %	56 %	71 %	75 %
Transcriptoma cartografiado	83 %	59 %	44 %	29 %	55 %	69 %
HardMerge cartografiado	65 %	48 %	39 %	27 %	47 %	57 %
Después de Filtro de Amplificación por PCR	18 %	22 %	10 %	6 %	24 %	30 %
HardMerge y bases cartografiadas filtradas (Gb)	1,15	0,24	0,35	0,11	0,35	0,22
SNV heterocigóticas de alta calidad en exones CCDS*	1.528	208	134	18	141	79
Específica de tumor	1.504	191	30	-	51	15
No sinónima	77,1 %	78,5 %	43,3 %	-	23,5 %	46,7 %
Sentido erróneo	1.096	146	13	-	12	7
Sin sentido	63	4	-	-	-	-
Sin parada	1	-	-	-	-	-
Epítomos predichos por NetMHC**	823	112	10	-	1	18
Restringido por H2 K ^d	203	15	-	-	-	1
Restringido por H2 D ^d	328	58	8	-	-	10
Restringido por H2 L ^d	292	39	2	-	1	7

*El número de mutaciones identificadas depende de la profundidad de secuenciación. Véase la Tabla 2 para obtener un análisis del efecto de la profundidad de secuenciación sobre las mutaciones de llamada en la muestra de Meth A.

La Figura 1 y la Tabla 2 muestran la canalización de bioinformática y las etapas de control de calidad creadas para este análisis. Esta canalización, denominada la canalización Epi-Seq, es de acceso público. Las SNV se analizaron para determinar su potencial para generar epítomos restringidos por el CMH I de los alelos K, D o L usando el algoritmo NetMHC (no se muestra el resultado total de esta canalización). Usando umbrales definidos, este gran número de epítomos posibles se redujo a un número más pequeño (Tabla 1). Mediante este análisis, las estirpes tumorales inducidas químicamente Meth A y CMS5 albergan 823 y 112 epítomos potenciales respectivamente (Tabla 1); la diferencia en el número de epítomos identificados entre estas dos estirpes es un reflejo de la profundidad a la que se secuenciaron sus transcriptomas. Los neoepítomos posibles (que se muestran solo para Meth A) se distribuyen aleatoriamente en todo el genoma (Figura 2), con la excepción del cromosoma X, que tiene significativamente menos mutaciones no sinónimas y menos epítomos, probablemente debido a la menor densidad de genes de este cromosoma en mamíferos. Es interesante señalar que los dos tumores Meth A y CMS5 han sido caballos de batalla de larga data para la identificación de epítomos específicos de tumor usando linfocitos T y anticuerpos como sondas. Los análisis exhaustivos realizados durante más de 25 años en el uso de sondas inmunitarias han arrojado solo cuatro epítomos en Meth A y un único epítomo en el tumor CMS5.

Tabla 2: Cartografiado de SNV y estadísticas de epítomos predichas por NetMHC 1, 2, respectivamente 3 calles de lecturas de RNA-Seq de Meth A (relacionadas con la Tabla 1)

Número de calles de RNA-Seq	1	2	3
Lecturas de RNA-Seq (millones)	35,9	62,9	105,8
Genoma cartografiado	75 %	86 %	75 %
Transcriptoma cartografiado	83 %	95 %	83 %
HardMerge cartografiado	66 %	75 %	65 %
Después de Filtro de Amplificación por PCR	27 %	24,89 %	18 %

(continuación)

Número de calles de RNA-Seq	1	2	3
HardMerge y bases cartografiadas filtradas (Gb)	0,59	0,94	1,15
SNV heterocigóticas de alta calidad en exones de CCDS	958	1.342	1.504
No sinónima	75,9 %	76,5 %	77,1 %
Sentido erróneo	691	971	1.096
Sin sentido	35	55	63
Sin parada	1	1	1
Epítomos predichos por NetMHC	537	729	823
Restringido por H2 K ^d	116	182	203
Restringido por H2 D ^d	222	280	328
Restringido por H2 L ^d	199	267	292

Al contrario que las estirpes tumorales Meth A y CMS5 de larga data, el número de neo-epítomos presentados por K^d detectados en los cuatro cánceres de próstata espontáneos es muy bajo (entre 0 y 18). Los cánceres de próstata espontáneos son muy recientes, siendo la edad real de los tumores inferior a 6 meses y el pequeño número de epítomos en estos tumores es compatible con la tesis de que los neoepítomos se generan como resultado de la tasa de mutación espontánea por división celular.

Los inventores han usado la presente canalización bioinformática para analizar la lista recién publicada de mutaciones derivadas de datos de secuenciación del transcriptoma de 14 cánceres de próstata humanos y tejidos normales, y han identificado varios epítomos posibles para los alelos de HLA más comunes (Tabla 3). Curiosamente, se observa que los cánceres de próstata humanos albergan un número relativamente pequeño de neoepítomos, comparables a los números observados en los tumores espontáneos de ratones TRAMP, a pesar de que los tumores humanos son posiblemente mucho más viejos que los tumores de ratón. Un análisis de las secuencias de exoma de varios melanomas humanos y su comparación con las secuencias normales correspondientes a través de la canalización bioinformática revela cientos de neoepítomos posibles por melanoma humano. Se pueden imaginar y someter a ensayo varias bases de dichas diferencias grandes en el número de neoepítomos entre tumores humanos.

Tabla 3. Resumen de los datos de secuenciación de transcriptoma de alto rendimiento y predicción de polimorfismos y epítomos específicos de tumor para 14 muestras de cáncer de próstata humano*

Muestra de tumor	Mutaciones somáticas publicadas en Ren et al. (11)				Epítomos predichos por NetMHC			
	Anotación de UCSC sinónimo/no sinónimo		Subconjunto de mutaciones no sinónimas dentro de regiones codificantes de CCDS		Total	A1101	A2402	A0201
	Sinónimo	No sinónimo	Total	Heterocigótica				
1T	7	10	10	10	9	4	0	5
2T	4	3	2	2	2	4	0	0
3T	7	4	3	3	3	5	1	4
4T	5	3	3	3	3	2	0	0
5T	4	7	7	7	7	12	2	4
6T	3	5	5	5	4	1	0	2
7T	2	3	2	2	2	1	1	0
8T	20	44	40	40	38	42	7	33
9T	13	22	18	18	16	13	0	17
10T	20	32	29	29	28	20	3	13
11T	6	13	9	9	9	8	2	7
12T	3	11	10	10	10	13	5	10
13T	2	5	5	5	5	2	3	4
14T	19	32	29	29	24	25	8	20

*Calculado a partir de datos de mutación publicados y usando la etapa de predicción de epítomos de la canalización Epi-Seq resumida en la Figura 1 para llamar los epítomos basándose en los datos de mutación.

Ejemplo 2: Proporción de mutaciones no sinónimas, un indicador probable de inmuno-edición.

Una segunda distinción importante entre las estirpes tumorales de larga data y los nuevos cánceres primarios es la proporción de las SNV que codifican mutaciones no sinónimas (que conducen a cambios en el aminoácido codificado) en lugar de mutaciones sinónimas (aproximadamente el 78 % en las estirpes tumorales y el 23-46 % en los cánceres primarios). Basándose en la degeneración del código genético y la frecuencia de uso de los codones individuales, la proporción de mutaciones no sinónimas en una población sin seleccionar de mutaciones debe ser de aproximadamente el 75 %, como se observa de hecho en las estirpes tumorales CMS5 y Meth A, así como en ocho estirpes de cáncer humano que se cultivan *in vitro* y, por tanto, no están bajo presión de selección inmunitaria. La proporción drásticamente reducida (23-46 %) de mutaciones no sinónimas en los cánceres primarios se explica mejor por la hipótesis de que una proporción significativa de células tumorales con mutaciones no sinónimas fueron eliminadas por el sistema inmunitario. Existe una fuerte evidencia independiente de inmuno-edición en la fase temprana de la carcinogénesis. Los datos de los presentes inventores son los primeros en sugerir que el número de mutaciones secundarias no sinónimas como proporción del número total de mutaciones secundarias en un tumor es predictivo del estado de inmuno-edición en ese tumor. El análisis de las secuencias de transcriptoma de 14 muestras de cáncer de próstata humano muestra que aproximadamente el 60 % de las mutaciones no son sinónimas, en comparación con una expectativa de aproximadamente el 75 % en el caso de tumores no editados. Este número significa que, si bien los tumores de próstata jóvenes de ratones TRAMP se someten a una selección inmunitaria agresiva (siendo un 23-47 % de las mutaciones no sinónimas), los tumores humanos avanzados tal vez ya están en la fase de escape (siendo un 60 % de las mutaciones no sinónimas). Un análisis similar en melanomas humanos muestra un intervalo de proporciones de mutaciones no sinónimas, del 58 % al 72 %, lo que sugiere tumores en un intervalo de etapas de inmuno-edición.

Ejemplo 3: Inmunogenicidad de los neo-epítopos identificados por ordenador.

Con el fin de centrarse, la atención se dirigió hacia los epítopos restringidos por 218 K^d (para Meth A y CMS5 combinados) de una lista total de 935 para los tres alelos (Tabla 1); Se seleccionaron 119/218 epítopos predichos de tumores CMS5 y Meth A, y se usaron para inmunizar ratones BALB/c. Los ganglios linfáticos de drenaje (Gld) de ratones inmunizados se recogieron una semana después de la inmunización simple y las células se estimularon *in vitro* durante 16 h sin ningún péptido añadido o el péptido mutante utilizado para la inmunización o el péptido de tipo silvestre correspondiente. Las células CD8⁺ se analizaron para determinar la activación (CD44⁺) y la función efectora (Interferón γ ⁺). Se observaron todos los patrones posibles de inmuno-reactividad (Figura 3, 5): sin respuesta inmunitaria (83/119), un mutante específico de péptido, es decir, una respuesta inmunitaria específica de tumor (21/119), una respuesta de reacción cruzada entre los péptidos mutantes y de tipo silvestre correspondientes (8/119) y una respuesta no específica (7/119). Los cuatro tipos de respuestas fueron provocadas por ambos tumores (Figura 5). Sorprendentemente, una gran proporción de epítopos posibles (83/119 o el 70 %) no provocó ninguna respuesta inmunitaria. La afinidad de todos los péptidos por K^d se determinó experimentalmente como se describe en Métodos y se observó una correlación significativa entre la CI50 medida de interacción K^d-péptido y la respuesta inmunitaria ($P = 0,003$ mediante el ensayo Exacto de Fisher).

Como controles, se usaron los de tipo silvestre (péptidos sin mutar) correspondientes a los péptidos mutantes para inmunizar ratones y se sometieron a ensayo para determinar la respuesta inmunitaria (Figura 4, 5). Un pequeño pero sorprendentemente significativo 15 % de los péptidos sometidos a ensayo ($n = 66$) provocó respuestas específicas. Podría decirse, que los linfocitos T CD8⁺ contra estos auto-epítopos no sufrieron supresión central; hasta donde saben los inventores, estos son los primeros ensayos experimentales de un gran número de secuencias normales que se han sometido a ensayo para determinar su inmunogenicidad, y la proporción de epítopos auto-inmunogénicos, aunque pequeña, es significativamente superior a lo que podía esperarse (aunque no existen estimaciones precisas). Como alternativa, muchas de las secuencias normales seleccionadas pueden representar epítopos crípticos que nunca se presentan realmente debido a barreras para el procesamiento de antígenos.

Con el fin de determinar el grado de heterogeneidad antigénica con respecto a los neoepítopos identificados, se clonaron células Meth A y se sometieron a ensayo 30 clones distintos para cada una de las cuatro SNV seleccionadas al azar. Inesperadamente, todas menos una sola SNV se expresó en todos los clones; se expresó una sola SNV en 29/30 clones sometidos a ensayo (datos no mostrados). Sin quedar vinculado a teoría alguna, esta falta de heterogeneidad antigénica se atribuye a la profundidad relativamente baja de secuenciación. Dándole vueltas a la presente idea, es posible usar una secuenciación relativamente superficial como metodología para identificar solo la huella digital antigénica más amplia de cualquier tumor. Ejemplo 4: Protección tumoral de posibles neoepítopos.

La capacidad de los epítopos predichos para provocar la inmunidad tumoral protectora se evaluó experimentalmente. Se sometieron a ensayo los siete epítopos de CMS5 y 11 epítopos de Meth A con las puntuaciones más altas de NetMHC (Tabla 4). Se inmunizaron ratones BALB/c dos veces con los péptidos individuales (como se describe en Métodos) y se sometieron a prueba de provocación con el tumor apropiado una semana después de la última inmunización. La Figura 6 muestra que ninguno de los neo-epítopos (0/18 o 0 %) provocó protección frente al crecimiento tumoral, aunque algunos de ellos produjeron respuestas de CD8 efectoras.

Tabla 4. Epítomos de CMS5 y Meth A con las puntuaciones más altas de PWM de NetMHC

Epítomos de CMS5 con las puntuaciones más altas de NetMHC					
Gen	Secuencia de Mut/WT	Puntuación de Mut/WT	CI50 medida para K ^d Mut/WT	Inmunogenicidad	Protección contra tumores
Ssx2ip	CYAK(v/I)KEQL SEQ ID NO. 2/3	14,5/14,1	26/3,2	+	-
Mapk1.1	(q/K)YIHSANVL SEQ ID NO. 4/5	13,2/12,4	57/0,2	-	-
Farsb	HY(v/I)HIIESKPL SEQ ID NO. 6/7	13/13,6	423/52	+	-
Ncoa3	(h/Q)YLQYKQEDL SEQ ID NO. 8/9	11,5/11,7	2162/54074	-	-
Mapk1.2	(q/K)YIHSANV SEQ ID NO. 10/11	11,4/10,7	2135/295	-	-
Mapk1.3	LYQILRGL(q/K)YI SEQ ID NO. 12/13	11,3/11	110/333	-	-
Serinc1	NYLLSLVAV(m/V)L SEQ ID NO. 14/15	11/10,2	2679/20861	-	-
Epítomos de Meth A con las puntuaciones más altas de NetMHC					
Gen	Secuencia de Mut/WT	Puntuación de Mut/WT	CI50 medida para K ^d Mut/WT	Inmunogenicidad	Protección contra tumores
Usp12	SY(I/R)VVFPL SEQ ID NO. 16/17	14,2/12,3	6835/1155	-	-
Tfdp 1	QYSGS(w/R)VETPV SEQ ID NO. 18/19	14,2/15,3	*/603	-	-
Ufsp2	HYINM(i/S)LPI SEQ ID NO. 20/21	14,2/14,5	0,23/+++**	+	-
Apc	AYCETCWE(I/W) SEQ ID NO. 22/23	14/8,1	23/60	+	-
Hspg2	SY(I/Q)LGSGEARL SEQ ID NO. 24/25	14/14,4	2623/79	-	-
Ccdc85c	TYIRP(f/I)ETKV SEQ ID NO. 26/27	13,5/13,1	6155/118	-	-
Pacs2	HYLS(s/A)ILRL SEQ ID NO. 28/29	13,4/12,7	41/1269	-	-
Alms1.1	(I/S)YLDKSDTTV SEQ ID NO. 30/31	13,3/15,2	79/16	+	-
Alms 1.2	YYVPLLKRVP(I/S) SEQ ID NO. 32/33	13,3/7,3	421/1485	-	-
Ckap5	K(y/D)MSMLEERI SEQ ID NO. 34/35	13,2/1,7	17/7686	-	-
Abr	GYFVSKAKT(s/R)V SEQ ID NO. 36/37	13,1/12,8	958/570	+	-
* - indica CI50 > 70.000 nM. **+++" indica CI50 < 0,1 nM.					

Con el fin de comprender este resultado inesperado y sin quedar vinculado a teoría alguna, los presentes inventores razonaron que la puntuación de NetMHC en sí no puede ser un predictor de inmunogenicidad protectora contra tumores porque es posible que los homólogos sin mutar de estos epítomos puedan tener buenas puntuaciones de NetMHC: como resultado, el repertorio de linfocitos T frente a las puntuaciones altas (y sus homólogos mutados) puede haberse suprimido centralmente o tolerado periféricamente. Por tanto, los presentes inventores crearon un algoritmo novedoso en el que las puntuaciones de NetMHC de los homólogos sin mutar de los epítomos mutados predichos se tomaron en consideración restándolas de las puntuaciones de NetMHC correspondientes de los epítomos mutados. Los presentes inventores se refieren a esta nueva propiedad de un epítomo como su Índice Agretópico Diferencial (IAD). Los epítomos posibles ahora se clasificaron basándose en el IAD (Tabla 5). Una revisión de esta lista clasificada por IAD para ambos tumores muestra algunos aspectos curiosos: (a) *todos* los neoepítomos en esta lista muestran una mutación que da como resultado un cambio de aminoácido en uno de los dos restos de anclaje. (b) *Todos* estos cambios son de tirosina a ácido aspártico en la posición 2 o de leucina a prolina o arginina en el extremo carboxi. (c) La gran mayoría de los neoepítomos con la mejor clasificación de IAD tienen una puntuación de NetMHC por debajo de 8,72, el umbral de puntuación de unión del péptido PWM para ligantes débiles para Kd (NetMHC3.0).

Tabla 5. Epítomos de CMS5 y MethA con las puntuaciones IAD más altas

Epítomos de CMS5						
Gen	Secuencia de Mut/WT	Puntuación de Mut/WT	IAD	CI50 medida para K ^d Mut/WT	Inmunogenicidad	Protección contra tumores
Dhx8.1	P(y/D)LTQYAIIML SEQ ID NO. 38/39	9,3/-2,3	11,6	2192/1653	+	-
Alkbh6.1	D(y/D)VPMEQP SEQ ID NO. 40/41	4,3/-7,3	11,6	60858/-	-	-
Dhx8.2	P(y/D)LTQYAI SEQ ID NO. 42/43	9,9/-1,6	11,5	-*/-	-	-
Dhx8.3	P(y/D)LTQYAI SEQ ID NO. 44/45	9,3/-2,2	11,5	244/1418	-	-
Alkbhβ.2	D(y/D)VPMEQPR SEQ ID NO. 4β/47	6,8/-4,7	11,5	-/51229	-	+
Dhx8.4	P(y/D)LTQYAIIM SEQ ID NO. 48/49	6,6/-4,9	11,5	6571/6256	-	-
Alkbhβ.3	D(y/D)VPMEQPRP SEQ ID NO. 50/51	4,8/-6,7	11,5	-23570	-	-
Alkbh6.4	D(y/D)VPMEQPRPP SEQ ID NO. 52/53	4,7/-6,8	11,5	47053/2957	-	-
Rangapl	SEDKIKAI(I/P) SEQ ID NO. 54/55	1,4/-5,4	6,8	-/5108	-	-
Stau1.1	LKSEKT(I/P) SEQ ID NO. 5β/57	0,6/-6,2	6,8	-/-	-	-
Staul.2	KPALKSEKT(I/P) SEQ ID NO. 58/59	0,1/-6,7	6,8	-/-	-	-
Staul.3	PALKSEKT(I/P) SEQ ID NO. 60/61	1,3/-5,4	6,7	69546/-	-	-
Stau1.4	ALKSEKT(I/P) SEQ ID NO. 62/63	1,2/-5,5	6,7	-/-	-	+
9430016 H08Rik	SWSSRRSLLG(I/R) SEQ ID NO. 64/65	5,9/-0,6	6,5	-/-	-	-
Slit3	GFHGCIHEV(I/R) SEQ ID NO. 66/67	4,7/-1,8	6,5	51640/-	-	+
Atxn10.1	QVFPGLME(I/R) SEQ ID NO. 68/69	3,4/-3,1	6,5	-/7054	+	+
Sipa113	TTTPGGRPPY(I/R) SEQ ID NO. 70/71	2,7/-3,8	6,5	-/-	-	-
Atxn10.2	VFPGLME(I/R) SEQ ID NO. 72/73	2,5/-4	6,5	-/1107	-	+
Ccdc136	ELQGLLEDE(I/R) SEQ ID NO. 74/75	2,4/-4,1	6,5	-/4537	-	+
Mast2	KLQRQYRSPR(I/R) SEQ ID NO. 76/77	2,2/-4,3	6,5	10107/8511	-	-
Epítomos de Meth A						
Gen	Secuencia de Mut/WT	Puntuación de Mut/WT	IAD	CI50 medida para K ^d Mut/WT	Inmunogenicidad	Protección contra tumores
Tnp03	(sy/ID)MLQALCI SEQ ID NO. 78/79	8,2/-5,2	13,4	82/146	+	+
Trim26.1	A(y/D)ILAALTKL SEQ ID NO. 80/81	12,8/1,2	11,6	622/1,1	-	-
Nus1	P(y/D)LVLKFGPV SEQ ID NO. 82/83	10,5/-1,1	11,6	2359/1,9	-	-
Tpst2.1	L(y/D)EAGVTDEV SEQ ID NO. 84/85	10,3/-1,3	11,6	60/-	-	-
Fiz1	H(y/D)LQGSNA SEQ ID NO. 86/87	10,3/-1,3	11,6	2473/-	-	-
Kdm4b	L(y/D)HTRPTAL SEQ ID NO. 88/89	10/-1,6	11,6	264/-	-	-
Dis312.1	I(y/D)GVVARNRAL SEQ ID NO. 90/91	9,3/-2,3	11,6	143/-	+	-

(continuación)

Epítomos de Meth A						
Gen	Secuencia de Mut/WT	Puntuación de Mut/WT	IAD	CI50 medida para K ^d Mut/WT	Inmunogenicidad	Protección contra tumores
Ube4a.1	A(y/D)AKQFAAI SEQ ID NO. 92/93	9,3/-2,3	11,6	12/-	+	-
Ncdn	S(y/D)CEPALNQA SEQ ID NO. 94/95	8,9/-2,7	11,6	664/-	+	-
Gapdh	V(y/D)LTCRLEKPA SEQ ID NO. 96/97	8,9/-2,7	11,6	1150/-	-	-
Ckap5	K(y/D)MSMLEER SEQ ID NO. 98/99	8,1/-3,5	11,6	58/-	-	-
Prrc2a	P(y/D)KRLKAEP SEQ ID NO. 100/101	7,9/-3,7	11,6	1450/261	-	-
Tmx3	D(y/D)IIEFAHRV SEQ ID NO. 102/103	7,3/-4,3	11,6	7941/351	-	-
Nfkb1	G(y/D)SVLHLAI SEQ ID NO. 104/105	6,9/-4,6	11,5	0,26/1615	+	+
Dis312.2	I(y/D)GVVARNRA SEQ ID NO. 106/107	6,9/-4,7	11,6	1342/262	-	-
Ugdh	L(y/D)YERIHKKML SEQ ID NO. 108/109	6,4/-5,2	11,6	600/12	-	-
M112	S(y/D)RLPSSRKK SEQ ID NO. 110/111	5,9/-5,7	11,6	6673/17	-	-
Galnt1	L(y/D)VSKLNGP SEQ ID NO. 112/113	5,6/-6	11,6	27086/-	-	-
Tpst2.2	L(y/D)EAGVTDE SEQ ID NO. 114/115	5,5/-6,1	11,6	-/-	-	-
Cpsf2	L(y/D)DVDAAF SEQ ID NO. 116/117	5,3/-6,3	11,6	1410/-	+	+
Zfp236.1	E(y/D)LDLQTQ SEQ ID NO. 118/119	5,3/-6,3	11,6	1641/-	-	+
Trim26.2	A(y/D)ILAAALTKLQ SEQ ID NO. 120/121	4,9/-6,7	11,6	17599/-	-	-
Zfp236.2	E(y/D)LDLQTQG SEQ ID NO. 122/123	4,9/-6,7	11,6	10028/-	-	-
Ube4a.2	A(y/D)AKQFAA SEQ ID NO. 124/125	4,7/-6,9	11,6	28583/-	-	-
Dcaf6	A(y/D)RLEGDRS SEQ ID NO. 126/127	3,7/-7,9	11,6	-/-	-	-

* - indica CI50 > 70.000 nM.

- Los 20 epítomos con las mejores clasificaciones de IAD de CMS5 y 25 epítomos de Meth A se sometieron a ensayo en ensayos de rechazo tumoral. Los resultados (Figura 7) muestran que 6/20 o el 30 % de epítomos de CMS5 y 4/25 o el 16 % de epítomos de Meth A mostraron una inmunogenicidad protectora contra tumores estadísticamente significativa (valor p de 0,023). La significación estadística se evaluó usando el ensayo exacto de Fisher de una sola cola comparando el número de epítomos protectores contra tumores entre el conjunto de epítomos seleccionados mediante IAD y los seleccionados mediante puntuación de NetMHC, 10/45 y 0/18, respectivamente. La Figura 8 muestra algunas curvas representativas de rechazo tumoral de dos epítomos CMS5 protectores y uno no protector. (Se muestran las curvas correspondientes en un epítomo de Meth A en la Figura 11, junto con un análisis más detallado de la actividad de ese epítomo). Aunque este algoritmo produjo una recolección mucho más rica en epítomos protectores contra tumores que la dependencia de las puntuaciones más altas de NetMHC o de unión a CMH (como en la Fig. 6), la mayoría de los epítomos identificados mediante el algoritmo de los presentes algoritmos no consiguen provocar protección contra tumores. De manera clara, otras propiedades de los epítomos posibles, incluyendo quizás el grado de presentación directa de los epítomos y la estabilidad de los complejos CMH-péptido, contribuyen a la actividad de rechazo tumoral. Sin embargo, se observó que la unión a K^d medida de los epítomos, así como su capacidad para provocar respuestas de linfocitos T, no tenían correlación con la actividad protectora contra tumores (P = 0,45 para la correlación del rechazo tumoral con la unión a K^d y 0,27 para la correlación del rechazo tumoral con la inmunogenicidad). Existen varios ejemplos de una falta de correlación entre la inmunogenicidad de un epítomo y la falta de su actividad protectora contra tumores en estudios clínicos. Independientemente de su imperfección, el IAD es un predictor estadísticamente significativo y novedoso de la inmunogenicidad protectora contra tumores.

La inmunogenicidad protectora contra tumores del epítomo sy-MLQALCI (SEQ ID NO. 78) (LDMLQALCI de tipo silvestre (SEQ ID NO. 79)), el epítomo derivado de Transportina 3 (Tnp3) mutada, el epítomo de clasificación más alta

(mediante IAD) de Meth A (Tabla 5), se investigó con más detalle. Tnpo3 es un receptor de importación nuclear para la proteína rica en serina/arginina codificada por un gen en el cromosoma 6 de ratón y no es una proteína oncoiniciadora para ningún tipo de tumor reportado hasta el momento. Se demostró que el epítipo de Tnpo3 mutante provocaba estrictamente una respuesta inmunitaria CD8+ específica de tumor, como se ve por la capacidad de los ratones inmunizados con Tnpo3 mutante para mostrar una fuerte reactividad específica de tumor al mutante pero no al péptido de tipo silvestre ex vivo (Figura 9). Por el contrario, las células CD8+ CD44+ IFN γ + aisladas de ratones inmunizados con células tumorales Meth A, reconocen las células pulsadas por Tnpo3 mutante pero no las células pulsadas con un péptido Prpf31 de unión a K d irrelevante (Figura 10). Estas observaciones confirman que el péptido Tnpo3 mutante se presenta de forma natural por las células Meth A y también que la respuesta inmunitaria al mismo se desencadena tras la inmunización por células tumorales completas. Curiosamente, los intentos de identificar este péptido mutante mediante análisis espectroscópico de masas de péptidos eluidos por CMH I de Meth A no tuvieron éxito, probablemente debido a la mayor sensibilidad de los ensayos de linfocitos T en comparación con la espectroscopia de masas.

Ejemplo 5: Potenciación de la protección contra tumores de los neo-epítopos mediante moduladores inmunitarios.

La combinación de inmunización con neoepítopos mutantes se sometió a ensayo usando el neoepítipo de Meth A Tnpo3. Este neoepítipo solo protege contra tumores de forma moderada en monoterapia, lo que permite un intervalo más dinámico para someter a ensayo un efecto potenciado mediante terapia de combinación. Como se ve en la Figura 11, CpG solo provocó una protección significativa contra el crecimiento tumoral ($P = 0,007$); el Tnpo3 mutado solo provocó el rechazo tumoral en 2/9 ratones (en comparación con 0/10 en ratones sin tratamiento previo), aunque la protección no consiguió una significación estadística mediante el ABC en el experimento que se muestra ($P = 0,24$). Sin embargo, una combinación de los dos provocó una potente protección contra tumores altamente significativa ($P = 0,005$ en comparación con ratones sin inmunizar y $0,045$ en comparación con el grupo inmunizado con Tnpo3 mutante). La protección de la combinación medida mediante el ABC no fue estadísticamente significativa sobre CpG solo ($P = 0,9$), pero el número de ratones que rechazaron el tumor fue mucho mayor (8/10 en la combinación en comparación con 5/10 en CpG solo). La combinación de inmunización con Tnpo3 mutante con anticuerpos antagonistas para CD25, que se ha demostrado que se dirige a linfocitos T reguladores, también mostró sinergia; el anti-CD25 solo mostró una regresión completa en todos los ratones ($P = 0,007$) y Tnpo3 solo también provocó una protección significativa ($P = 0,03$). La combinación mostró una protección más significativa que cualquiera de los agentes solos (Figura 12). Se obtuvo un resultado similar con el anticuerpo anti-CTLA4, que libera linfocitos T del bloqueo del punto de control. Cada agente solo provocó una protección estadísticamente significativa y la combinación fue significativamente más eficaz que Tnpo3 solo (Figura 12). Según lo medido mediante el ABC, la combinación no fue estadísticamente más eficaz que el anticuerpo anti-CTLA4 solo ($P = 0,09$); sin embargo, la combinación provocó una regresión completa del tumor en 2/5 ratones (en comparación con 1/5 mediante el anticuerpo solo) y la estabilización prolongada del tumor en 2/5 ratones (en comparación con 0/5 ratones con el anticuerpo solo).

Resumen: La presente divulgación muestra un tesoro oculto de epítopos antigénicos realmente específicos de tumores; una proporción significativa de los epítopos son realmente protectores contra tumores en modelos de ratón y su existencia abundante en tumores humanos se corrobora a partir de datos genómicos acerca de cánceres de próstata humanos (Tabla 6) y melanomas (datos no mostrados) como se anticipó y se modeló anteriormente. Es preocupante reconocer que aunque los linfocitos T desempeñan claramente un papel fundamental en la respuesta inmunitaria al cáncer, los linfocitos T parecen haber sido particularmente deficientes para la identificación de epítopos inmunoprotectores. Los análisis exhaustivos de antígenos específicos de tumores de los sarcomas Meth A y CMS5 a lo largo de los años lograron producir un total de cinco epítopos; por el contrario, este único estudio ha descubierto un mínimo de casi una docena de epítopos protectores contra tumores de estos dos tumores. Es instructivo reflexionar sobre la razón de la presente discrepancia; el uso de linfocitos T como sondas requiere inherentemente la generación de estirpes o clones de linfocitos T, lo que a su vez es un proceso altamente selectivo. Parecería que la diversidad de linfocitos T efectores *in vivo* no se captura fácilmente por las estirpes de linfocitos T o los clones generados, lo que conduce a una visión distorsionada, y dispersa, de los inmunomas de linfocitos T de tumores. El análisis genómico corta el sesgo en la selección de linfocitos T y, por tanto, ilumina todo el campo de los neoepítopos.

Tabla 6. Resumen de los datos de secuenciación de transcriptoma de alto rendimiento y predicción de polimorfismos y epítomos específicos de tumor para 14 muestras de cáncer de próstata humano*

Muestra de tumor	Mutaciones somáticas publicadas en Ren et al. (11)				Epítomos predichos por NetMHC			
	Anotación de UCSC sinónimo/no sinónimo		Subconjunto de mutaciones no sinónimas dentro de regiones codificantes de CCDS		Total	A1101	A2402	A0201
	Sinónimo	No sinónimo	Total	Heterocigótica				
1T	7	10	10	10	9	4	0	5
2T	4	3	2	2	2	4	0	0
3T	7	4	3	3	3	5	1	4
4T	5	3	3	3	3	2	0	0
5T	4	7	7	7	7	12	2	4
6T	3	5	5	5	4	1	0	2
7T	2	3	2	2	2	1	1	0
8T	20	44	40	40	38	42	7	33
9T	13	22	18	18	16	13	0	17
10T	20	32	29	29	28	20	3	13
11T	6	13	9	9	9	8	2	7
12T	3	11	10	10	10	13	5	10
13T	2	5	5	5	5	2	3	4
14T	19	32	29	29	24	25	8	20

*Calculado a partir de datos de mutación publicados y usando la etapa predicción de epítomos de la canalización Epi-Seq resumida en la Figura 1 para llamar los epítomos basándose en los datos de mutación.

Dichos neoepítomos para cánceres humanos ahora pueden identificarse de manera rentable y sensible al tiempo y pueden usarse para inmunoterapia. Si bien los epítomos protectores contra tumores pueden identificarse, no podemos predecir con precisión si un epítomo particular será protector contra tumores. Sin embargo, la demostración de que el IAD, la diferencia en las puntuaciones de NetMHC del epítomo mutado y su homólogo sin mutar es un buen predictor, es la primera etapa clave en la dirección correcta y plantea algunas posibilidades nuevas y estimulantes. En primer lugar, la utilidad demostrada de la puntuación IAD subraya la validez de su premisa: que una respuesta inmunitaria protectora contra tumores requiere que los epítomos sean más diferentes de lo normal, que sean epítomos fuertes en sí. En segundo lugar, es lógico pensar, en retrospectiva, que las sustituciones de aminoácidos en los restos de anclaje producen las mayores diferencias, como se ve en la Tabla 5. Sin embargo, la observación de que algunas sustituciones (tales como la tirosina por el ácido aspártico en la posición 2 o la leucina por prolina o arginina en el extremo carboxi) son muy preferidas, es novedosa y sugiere nuevas vías de investigación estructural. Por último, es notable en la opinión de los presentes inventores que los 10/10 neoepítomos que provocan inmunidad protectora se clasifican como ligantes débiles según los criterios para dicha designación mediante NetMHC3.0. Esta observación puede proporcionar más pistas sobre la base de la inmunogenicidad protectora contra tumores.

Adicionalmente, el número de neoepítomos albergados por cada tipo tumoral es actualmente desconocido, pero quedará claro a medida que se realicen más estudios. Los datos sobre los cánceres de próstata humanos (Tabla 6) sugieren que estos números pueden ser pequeños y comparables a los números observados en los cánceres de próstata espontáneos de ratones (Tabla 1). Por otro lado, los datos sobre melanomas humanos (datos no mostrados) sugieren un repertorio de epítomos mucho más grande. Se pueden imaginar y someter a ensayo varias bases de dichas grandes diferencias en los números de neo-epítomos entre tumores humanos.

Aún más, la heterogeneidad antigénica de los cánceres ha sido objeto de mucho análisis, pero en ausencia de antígenos específicos de tumores auténticos en números significativos, el debate ha sido en gran parte teórico. El descubrimiento de un amplio repertorio de neopéptidos específicos de tumores verdaderos ahora permite que las preguntas con respecto a la heterogeneidad antigénica (y el escape de antígenos) se hagan de forma sin precedentes y robusta. Una mejor resolución de este problema permitirá aumentar el ajuste fino de los epítomos de linfocitos T para la inmunoterapia de cánceres humanos.

El papel de la inmuno-edición de los cánceres en crecimiento está inherentemente vinculado al tema de la heterogeneidad antigénica. Siguiendo los estudios clásicos sobre la vigilancia inmunitaria contra los tumores, se ha sugerido que los tumores pasan por fases de eliminación, equilibrio y escape de la inmuno-edición y han mostrado pruebas que respaldan la idea. La disponibilidad de un gran repertorio de neo-epítomos específicos de tumor de cualquier tumor dado permite abordar la inmuno-edición con mucha más granularidad. Sin quedar vinculado a teoría alguna, se cree que la cantidad de mutaciones no sinónimas en un tumor dado como proporción del número total de mutaciones es un buen indicador del lugar de un tumor en el continuo eliminación-equilibrio-escape es una predicción que se puede someter a ensayo, que si es verdadera, puede ayudar a guiar el tratamiento clínico del cáncer.

Adicionalmente se ha demostrado que la inmunización con neoepítomos puede combinarse eficazmente con una diversidad de agentes inmunomoduladores que incluyen un estimulante innato (CpG), un agente de linfocitos T anti-regulador (anticuerpo anti-CD25) y un antagonista de bloqueo de punto de control (anti-anticuerpo CTLA4).

Se han usado ligandos peptídicos alterados en la inmunidad contra el cáncer como medio para potenciar la respuesta inmunitaria a los epítomos propios que se sobreexpresan en los tumores. Los neoepítomos identificados en los análisis de los presentes inventores son en realidad ligandos peptídicos alterados generados naturalmente para los epítomos propios y, como tales, puede imaginarse que provocan una respuesta anti linfocitos T propios. Cualquier estudio en ratones o seres humanos debe estar alerta a esta posibilidad.

Además de su influencia sobre la inmunidad contra el cáncer, la disponibilidad de un gran número de neoepítomos específicos de tumor potencia drásticamente el alcance del análisis de la presentación de antígenos. La mayor parte del conocimiento de los presente inventores sobre la presentación de antígenos proviene del estudio de un puñado de epítomos víricos o modelo y aunque estos estudios elegantes y exhaustivos les han proporcionado una gran cantidad de información, las decenas o cientos de nuevos epítomos proporcionan oportunidades adicionales, debido a sus propiedades variables. De entre los epítomos identificados en el presente documento, los presentes inventores han identificado varios, cuyas proteínas parentales parecen expresarse bien, que tienen excelentes motivos para la unión al CMH I, que producen buenos linfocitos T CD8+ tras la inmunización y aun así, no son presentados directamente por las células tumorales. El análisis de su procesamiento promete identificar nuevas etapas y la importancia relativa de las vías existentes, en la presentación de antígenos.

Finalmente, es intrigante que casi el 15 % de los epítomos sin mutar sean capaces de provocar linfocitos T CD8+ efectores tras la inmunización. Hasta donde saben los inventores, este estudio representa el primer intento, aunque no intencionado, de someter a ensayo la inmunogenicidad de un número tan grande ($n = 119$) de secuencias normales. Aparentemente, los linfocitos T CD8+ contra estos epítomos no sufrieron supresión central; como alternativa, muchas de las secuencias normales seleccionadas pueden representar epítomos crípticos que nunca se presentan realmente debido a barreras para el procesamiento de antígenos. Las dos posibilidades son susceptibles de ensayos experimentales y pueden arrojar luz sobre el significado relativo de la tolerancia central y periférica a los antígenos

propios.

Se ha de considerar que el uso de los términos "un" y "una", y "el/la" y referentes similares (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) abarcan tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente en el contexto. Los términos primero, segundo, etc. como se usan en el presente documento, no pretenden denotar ningún orden particular, sino que simplemente denotan por conveniencia una pluralidad de, por ejemplo, capas. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" han de interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero sin limitación"), a menos que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores está destinada simplemente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Los valores extremos de todos los intervalos están incluidos dentro del intervalo y son combinables de forma independiente. Todos los métodos que se describen en el presente documento se pueden realizar en un orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o del lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como"), pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión de la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención como se usa en el presente documento.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a una realización preferida, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios y que los equivalentes pueden sustituirse por elementos de los mismos sin apartarse del alcance de la invención. Además, pueden hacerse muchas modificaciones para adaptar una situación particular o material al contenido de la invención sin apartarse del alcance esencial de la misma. Por tanto, se pretende que la invención no se limite a la realización particular desvelada como el mejor modo contemplado para realizar la presente invención, sino que la invención incluya todas las realizaciones que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE CONNECTICUT Srivastava, Pramod K. Duan, Fei Mandoiu, Ion

<120> IDENTIFICACIÓN DE EPITOPOS PROTECTORES CONTRA TUMORES PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCERES

<130> UCT0198PCT

<150> 61/707.295

<151> 28-09-2012

<160> 129

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 1

Lys Phe Asn Pro Met Phe Thr Tyr Ile
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

Cys Tyr Ala Lys Val Lys Glu Gln Leu
1 5

ES 2 737 757 T3

5	<210> 3 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 3	Cys Tyr Ala Lys Leu Lys Glu Gln Leu 1 5
10	<210> 4 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 4	
20	<210> 5 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn Val Leu 1 5
25	<400> 5	
30	<210> 6 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn Val Leu 1 5
35	<400> 6	
40	<210> 7 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 7	His Tyr Val His Ile Ile Glu Ser Lys Pro Leu 1 5 10
45	<210> 8 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	His Tyr Val His Ile Ile Glu Ser Lys Pro Leu 1 5 10
50	<210> 8 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	

ES 2 737 757 T3

<400> 8

His Tyr Leu Gln Tyr Lys Gln Glu Asp Leu
1 5 10

5 <210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 9

Gln Tyr Leu Gln Tyr Lys Gln Glu Asp Leu
1 5 10

15 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 10

Gln Tyr Ile His Ser Ala Asn Val

1 5

25 <210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn Val
1 5

30

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
35 <213> *Mus musculus*

<400> 12

Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Gln Tyr Ile
1 5 10

40

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
45 <213> *Mus musculus*

ES 2 737 757 T3

<400> 13

Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile
1 5 10

5 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 14

Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Val Ala Val Met Leu
1 5 10

15 <210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 15

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

25 <210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16

Ser Tyr Leu Val Val Phe Pro Leu
1 5

30 <210> 17
<211> 8
<212> PRT
35 <213> *Mus musculus*

<400> 17

Ser Tyr Arg Val Val Phe Pro Leu
1 5

40 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
45 <213> *Mus musculus*

<400> 18

ES 2 737 757 T3

		Gln	Tyr	Ser	Gly	Ser	Trp	Val	Glu	Thr	Pro	Val
		1				5					10	
5	<210> 19											
	<211> 11											
	<212> PRT											
	<213> <i>Mus musculus</i>											
	<400> 19											
10		Gln	Tyr	Ser	Gly	Ser	Arg	Val	Glu	Thr	Pro	Val
		1				5					10	
	<210> 20											
	<211> 9											
15	<212> PRT											
	<213> <i>Mus musculus</i>											
	<400> 20											
20		His	Tyr	Ile	Asn	Met	Ile	Leu	Pro	Ile		
		1				5						
	<210> 21											
	<211> 9											
	<212> PRT											
25	<213> <i>Mus musculus</i>											
	<400> 21											
30		His	Tyr	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Pro	Ile		
		1				5						
	<210> 22											
	<211> 9											
	<212> PRT											
	<213> <i>Mus musculus</i>											
35	<400> 22											
40		Ala	Tyr	Cys	Glu	Thr	Cys	Trp	Glu	Leu		
		1				5						
	<210> 23											
	<211> 9											
	<212> PRT											
	<213> <i>Mus musculus</i>											
45	<400> 23											

ES 2 737 757 T3

Ala Tyr Cys Glu Thr Cys Trp Glu Trp
1 5

5
<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 24

10 Ser Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu
1 5 10

15
<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 25

20 Ser Tyr Gln Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu
1 5 10

25
<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 26

Thr Tyr Ile Arg Pro Phe Glu Thr Lys Val
1 5 10

30
<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 27

Thr Tyr Ile Arg Pro Leu Glu Thr Lys Val
1 5 10

40
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45 <400> 28

His Tyr Leu Ser Ser Ile Leu Arg Leu
1 5

ES 2 737 757 T3

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*
 <400> 29

 His Tyr Leu Ser Ala Ile Leu Arg Leu
 1 5
 10
 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 30

 Leu Tyr Leu Asp Ser Lys Ser Asp Thr Thr Val
 1 5 10
 20
 <210> 31
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 31

 Ser Tyr Leu Asp Ser Lys Ser Asp Thr Thr Val
 1 5 10
 30
 <210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 32

 Tyr Tyr Val Pro Leu Leu Lys Arg Val Pro Leu
 1 5 10
 40
 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 33

 Tyr Tyr Val Pro Leu Leu Lys Arg Val Pro Ser
 1 5 10
 45
 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*

ES 2 737 757 T3

<400> 34

Lys Tyr Met Ser Met Leu Glu Glu Arg Ile
1 5 10

5 <210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 35

Lys Asp Met Ser Met Leu Glu Glu Arg Ile
1 5 10

15 <210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 36

Gly Tyr Phe Val Ser Lys Ala Lys Thr Ser Val
1 5 10

25 <210> 37
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 37

Gly Tyr Phe Val Ser Lys Ala Lys Thr Arg Val
1 5 10

30

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 38

Pro Tyr Leu Thr Gln Tyr Ala Ile Ile Met Leu
1 5 10

40

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45 <400> 39

Pro Asp Leu Thr Gln Tyr Ala Ile Ile Met Leu
1 5 10

ES 2 737 757 T3

5 <210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 40

Asp Tyr Val Pro Met Glu Gln Pro
 1 5

10 <210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 41

Asp Asp Val Pro Met Glu Gln Pro
 1 5

20 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 42

Pro Tyr Leu Thr Gln Tyr Ala Ile
 1 5

30 <210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 43

Pro Asp Leu Thr Gln Tyr Ala Ile
 1 5

40 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 44

Pro Tyr Leu Thr Gln Tyr Ala Ile Ile
 1 5

45 <210> 45

ES 2 737 757 T3

	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
5	<400> 45	
		Pro Asp Leu Thr Gln Tyr Ala Ile Ile
		1 5
10	<210> 46	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 46	
		Asp Tyr Val Pro Met Glu Gln Pro Arg
		1 5
20	<210> 47	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 47	
		Asp Asp Val Pro Met Glu Gln Pro Arg
		1 5
25	<210> 48	
	<211> 10	
	<212> PRT	
30	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 48	
		Pro Tyr Leu Thr Gln Tyr Ala Ile Ile Met
		1 5 10
35	<210> 49	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
40	<400> 49	
		Pro Asp Leu Thr Gln Tyr Ala Ile Ile Met
		1 5 10
45	<210> 50	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	

ES 2 737 757 T3

<400> 50

Asp Tyr Val Pro Met Glu Gln Pro Arg Pro
1 5 10

5 <210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 51

Asp Asp Val Pro Met Glu Gln Pro Arg Pro
1 5 10

15 <210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 52

Asp Tyr Val Pro Met Glu Gln Pro Arg Pro Pro
1 5 10

25 <210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 53

Asp Asp Val Pro Met Glu Gln Pro Arg Pro Pro
1 5 10

30

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 54

Ser Glu Asp Lys Ile Lys Ala Ile Leu
1 5

40

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45

<400> 55

ES 2 737 757 T3

		Ser Glu Asp Lys Ile Lys Ala Ile Pro
		1 5
5	<210> 56	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 56	
10		Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Leu
		1 5
	<210> 57	
	<211> 8	
	<212> PRT	
15	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 57	
		Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Pro
		1 5
20	<210> 58	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
25	<400> 58	
		Lys Pro Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Leu
		1 5 10
30	<210> 59	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
35	<400> 59	
		Lys Pro Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Pro
		1 5 10
40	<210> 60	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 60	
45		

ES 2 737 757 T3

Pro Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Leu
1 5 10

5 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 61

Pro Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Pro
1 5 10

10
15

<210> 62
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 62

Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Leu
1 5

20	<210> 63
	<211> 9
	<212> PRT
	<213> <i>Mus musculus</i>
25	<400> 63

Ala Leu Lys Ser Glu Glu Lys Thr Pro
1 5

30 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 64

Ser Trp Ser Ser Arg Arg Ser Leu Leu Gly Leu
1 5 10

40

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 65

Ser Trp Ser Ser Arg Arg Ser Leu Leu Gly Arg
1 5 10

ES 2 737 757 T3

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 66

 Gly Phe His Gly Cys Ile His Glu Val Leu
 1 5 10

 10
 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 15
 <400> 67

 Gly Phe His Gly Cys Ile His Glu Val Arg
 1 5 10

 20
 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 25
 <400> 68

 Gln Val Phe Pro Gly Leu Met Glu Leu
 1 5

 30
 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 69

 Gln Val Phe Pro Gly Leu Met Glu Arg
 1 5

 35

 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40
 <400> 70

 Thr Thr Thr Pro Gly Gly Arg Pro Pro Tyr Leu
 1 5 10

 45
 <210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50
 <400> 71

ES 2 737 757 T3

[illegible]

ES 2 737 757 T3

		Lys	Leu	Gln	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Pro	Arg	Leu
		1				5					10	
5		<210> 77 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 77										
10		Lys	Leu	Gln	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg
		1				5					10	
15		<210> 78 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 78										
20		Ser	Tyr	Met	Leu	Gln	Ala	Leu	Cys	Ile		
		1				5						
25		<210> 79 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 79										
30		Leu	Asp	Met	Leu	Gln	Ala	Leu	Cys	Ile		
		1				5						
35		<210> 80 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 80										
40		Ala	Tyr	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Lys	Leu	
		1				5					10	
45		<210> 81 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 81										
		Ala	Asp	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Lys	Leu	
		1				5					10	

ES 2 737 757 T3

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 82

Pro Tyr Leu Val Leu Lys Phe Gly Pro Val
1 5 10

10

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15

<400> 83

Pro Asp Leu Val Leu Lys Phe Gly Pro Val
1 5 10

20

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25

<400> 84

Leu Tyr Glu Ala Gly Val Thr Asp Glu Val
1 5 10

30

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 85

Leu Asp Glu Ala Gly Val Thr Asp Glu Val
1 5 10

35

<210> 86
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 86

His Tyr Leu Gln Gly Ser Asn Ala
1 5

45

<210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 737 757 T3

<400> 87

His Asp Leu Gln Gly Ser Asn Ala
1 5

5

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 88

Leu Tyr His Thr Arg Pro Thr Ala Leu
1 5

15

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20

<400> 89

Leu Asp His Thr Arg Pro Thr Ala Leu
1 5

25

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30

<400> 90

Ile Tyr Gly Val Val Ala Arg Asn Arg Ala Leu
1 5 10

35

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 91

Ile Asp Gly Val Val Ala Arg Asn Arg Ala Leu
1 5 10

40

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45

<400> 92

ES 2 737 757 T3

Ala Tyr Ala Lys Gln Phe Ala Ala Ile
1 5

5
<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 93

Ala Asp Ala Lys Gln Phe Ala Ala Ile
1 5

10

15
<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 94

Ser Tyr Cys Glu Pro Ala Leu Asn Gln Ala
1 5 10

20

25
<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 95

Ser Asp Cys Glu Pro Ala Leu Asn Gln Ala
1 5 10

30

35
<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 96

Val Tyr Leu Thr Cys Arg Leu Glu Lys Pro Ala
1 5 10

40

45
<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 97

Val Asp Leu Thr Cys Arg Leu Glu Lys Pro Ala
1 5 10

<210> 98

ES 2 737 757 T3

	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
5	<400> 98	
		Lys Tyr Met Ser Met Leu Glu Glu Arg
		1 5
10	<210> 99	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 99	
		Lys Asp Met Ser Met Leu Glu Glu Arg
		1 5
20	<210> 100	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 100	
25		Pro Tyr Lys Arg Leu Lys Ala Glu Pro Ala
		1 5 10
30	<210> 101	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 101	
35		Pro Asp Lys Arg Leu Lys Ala Glu Pro Ala
		1 5 10
40	<210> 102	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 102	
45		Asp Tyr Ile Ile Glu Phe Ala His Arg Val
		1 5 10
50	<210> 103	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 103	

ES 2 737 757 T3

Asp Asp Ile Ile Glu Phe Ala His Arg Val
1 5 10

5
<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 104

Gly Tyr Ser Val Leu His Leu Ala Ile
1 5

10

15
<210> 105
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 105

Gly Asp Ser Val Leu His Leu Ala Ile
1 5

20
25
<210> 106
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 106

Ile Tyr Gly Val Val Ala Arg Asn Arg Ala
1 5 10

30
35
<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 107

Ile Asp Gly Val Val Ala Arg Asn Arg Ala
1 5 10

40
45
<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 108

Leu Tyr Tyr Glu Arg Ile His Lys Lys Met Leu
1 5 10

<210> 109

ES 2 737 757 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 109

 Leu Asp Tyr Glu Arg Ile His Lys Lys Met Leu
 1 5 10

 <210> 110
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 110
 15

 Ser Tyr Arg Leu Pro Ser Ser Arg Lys Lys
 1 5 10

 <210> 111
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 111

 Ser Asp Arg Leu Pro Ser Ser Arg Lys Lys
 1 5 10
 25

 <210> 112
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 <400> 112

 Leu Tyr Val Ser Lys Leu Asn Gly Pro
 1 5
 35

 <210> 113
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> *Mus musculus*

 <400> 113

 Leu Asp Val Ser Lys Leu Asn Gly Pro
 1 5
 45

 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50 <400> 114

ES 2 737 757 T3

Leu Tyr Glu Ala Gly Val Thr Asp Glu
1 5

5
<210> 115
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 115

Leu Asp Glu Ala Gly Val Thr Asp Glu
1 5

10

15
<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 116

Leu Tyr Asp Val Asp Ala Ala Phe
1 5

20
25
<210> 117
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 117

Leu Asp Asp Val Asp Ala Ala Phe
1 5

30
35
<210> 118
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 118

Glu Tyr Leu Asp Leu Gln Thr Gln
1 5

40
45
<210> 119
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 119

Glu Asp Leu Asp Leu Gln Thr Gln
1 5

ES 2 737 757 T3

<210> 120
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*
 <400> 120

 Ala Tyr Ile Leu Ala Ala Leu Thr Lys Leu Gln
 1 5 10
 10
 <210> 121
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 121

 Ala Asp Ile Leu Ala Ala Leu Thr Lys Leu Gln
 1 5 10
 20
 <210> 122
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 122

 Ala Tyr Ile Leu Ala Ala Leu Thr Lys Leu Gln
 1 5 10
 30
 <210> 123
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 123

 Ala Asp Ile Leu Ala Ala Leu Thr Lys Leu Gln
 1 5 10
 40
 <210> 124
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 124

 Ala Tyr Ala Lys Gln Phe Ala Ala
 1 5
 45
 <210> 125
 <211> 8
 <212> PRT
 50 <213> *Mus musculus*

ES 2 737 757 T3

<400> 125

Ala Asp Ala Lys Gln Phe Ala Ala
1 5

5 <210> 126
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 126

Ala Tyr Arg Leu Glu Gly Asp Arg Ser
1 5

15 <210> 127
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 127

Ala Asp Arg Leu Glu Gly Asp Arg Ser
1 5

25 <210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia mutada de ejemplo

<400> 128

Gly Tyr Ser Val Leu His Leu Ala Ile Ile
1 5 10

35 <210> 129
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia sin mutar de ejemplo

<400> 129

Gly Asp Ser Val Leu His Leu Ala Ile Ile
1 5 10

45

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de epítomos tumorales en un paciente con cáncer, que comprende secuenciar al menos una porción del ARN o ADN del paciente con cáncer tanto en un tejido sano como en un tejido canceroso, para producir una secuencia de ARN o ADN de tejido sano y una secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso, comparar la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ADN o ARN de tejido canceroso e identificar las diferencias entre la secuencia de ARN o ADN de tejido sano y la secuencia de ARN o ADN de tejido canceroso para producir un conjunto de marcadores de ADN de diferencia, analizar el conjunto de marcadores de ADN de diferencia para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el conjunto de epítomos específicos de tumor comprende uno o más epítomos específicos de tumor, proporcionar un valor numérico denominado Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo en el conjunto de epítomos específicos de tumor, en el que el índice Agretópico Diferencial se calcula restando una puntuación numérica para un epítopo normal de una puntuación numérica para el epítopo específico de tumor, donde las puntuaciones numéricas se producen usando un algoritmo predictivo que determina la unión de los péptidos de epítopo a las moléculas del CMH, y clasificar el conjunto de epítomos específicos de tumor mediante el Índice Agretópico Diferencial para cada epítopo del conjunto.
2. El método de la reivindicación 1, en el que:
 - (a). la secuenciación es una secuenciación del transcriptoma; o
 - (b). la secuenciación de ARN o ADN es una secuenciación de alto rendimiento.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el análisis de la diferencia entre el conjunto de marcadores de ADN para producir un conjunto de epítomos específicos de tumor es independiente de si el uno o más epítomos específicos de tumor están relacionados con las vías causantes de cáncer.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente determinar la unión de péptidos que contienen los epítomos específicos de tumor en el conjunto de epítomos específicos de tumor a un péptido específico de alelo de CMH para producir un conjunto de epítomos restringidos por el CMH.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el algoritmo predictivo es NetMHC.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el método comprende adicionalmente usar la clasificación por Índice Agretópico Diferencial para identificar un subconjunto de 10 a 50 epítomos específicos de tumor con la clasificación más alta.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el paciente con cáncer padece un cáncer sólido o hemolinfático.

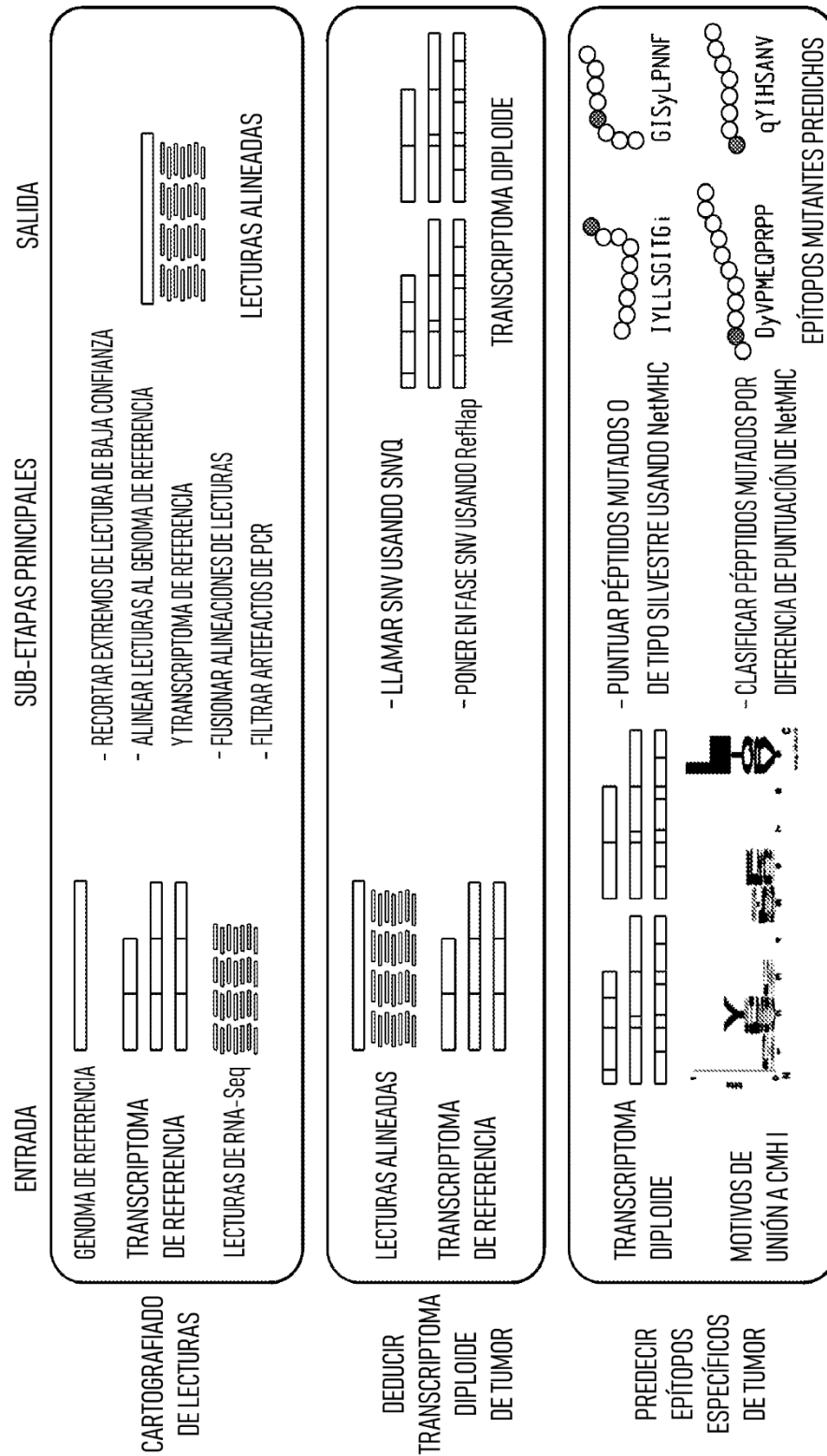
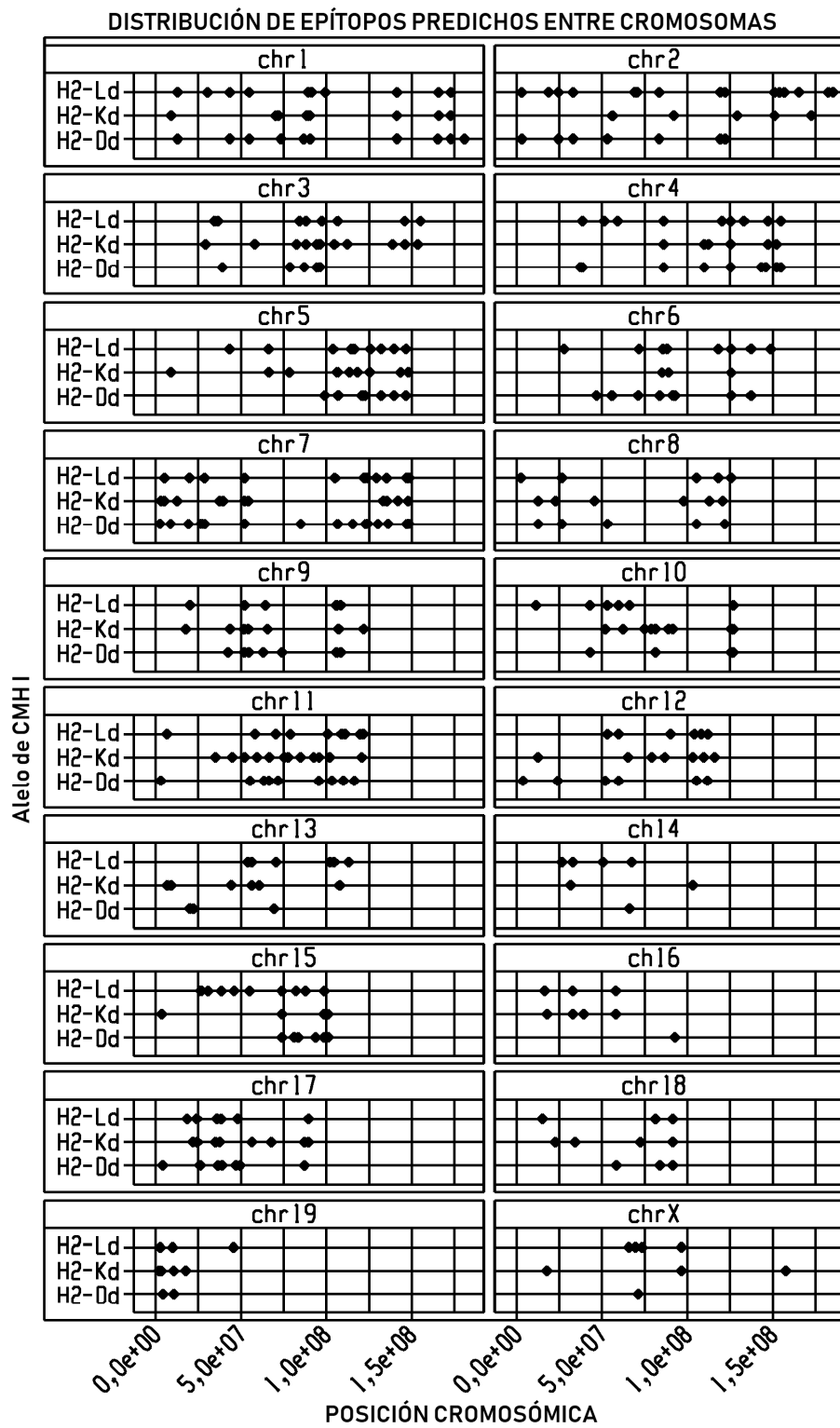


Fig. 1



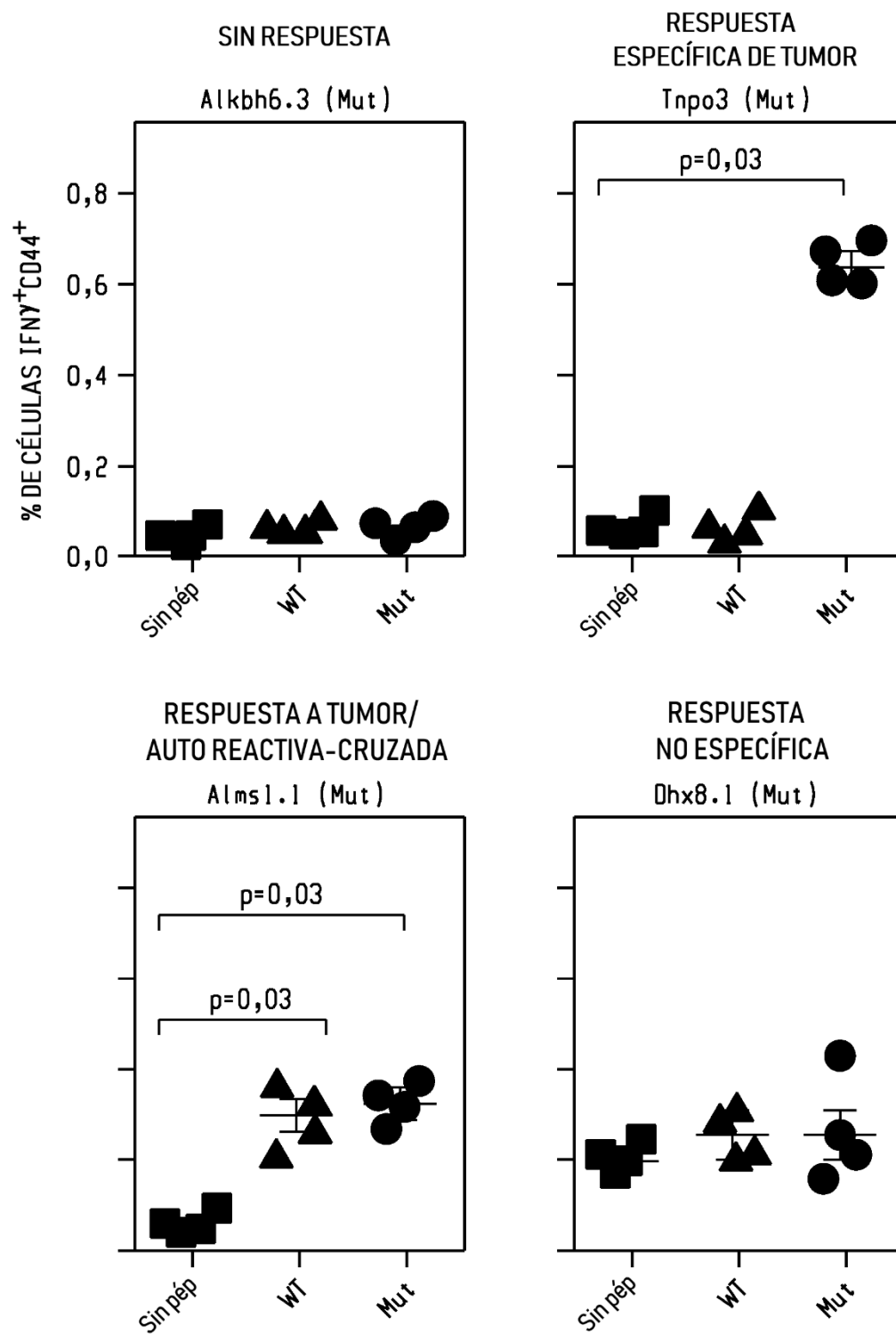


Fig. 3

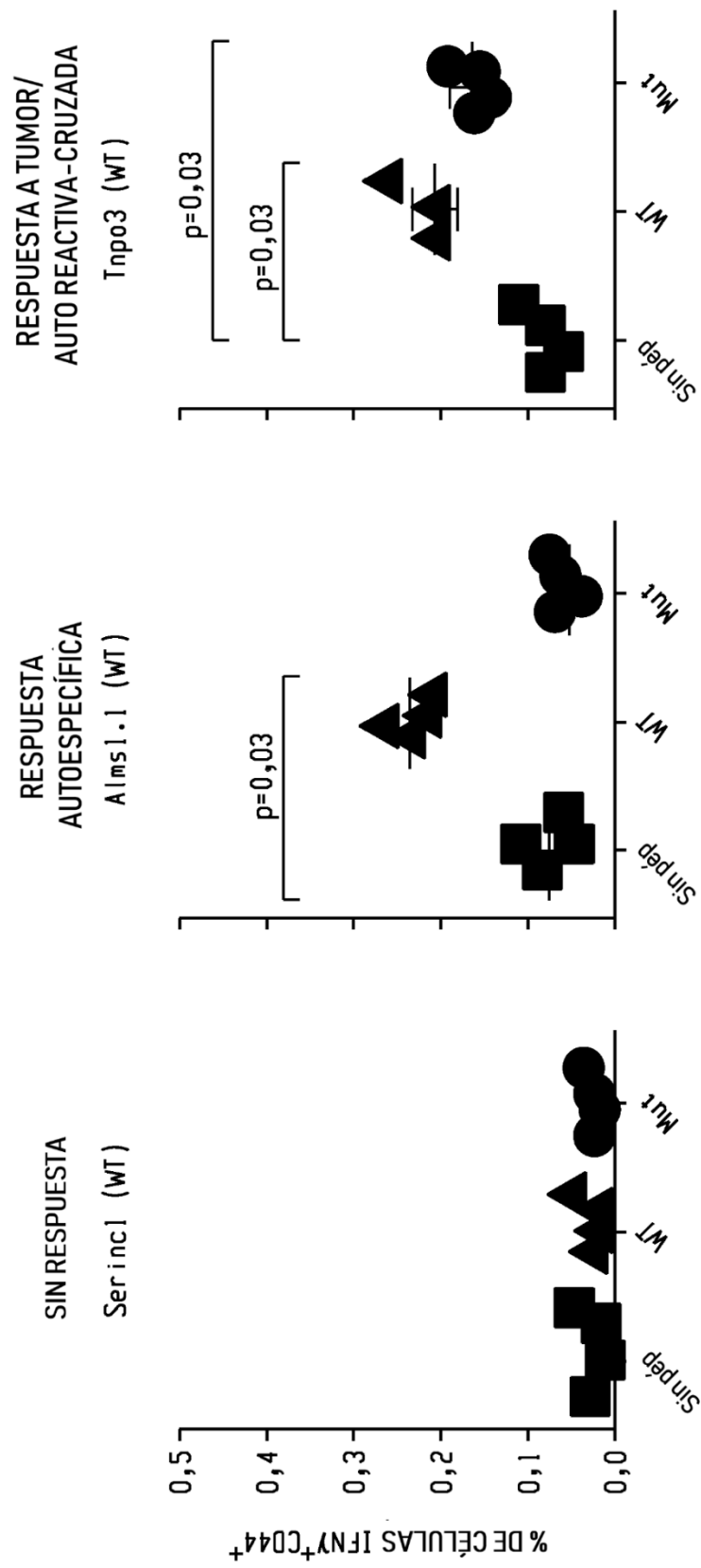


Fig. 4

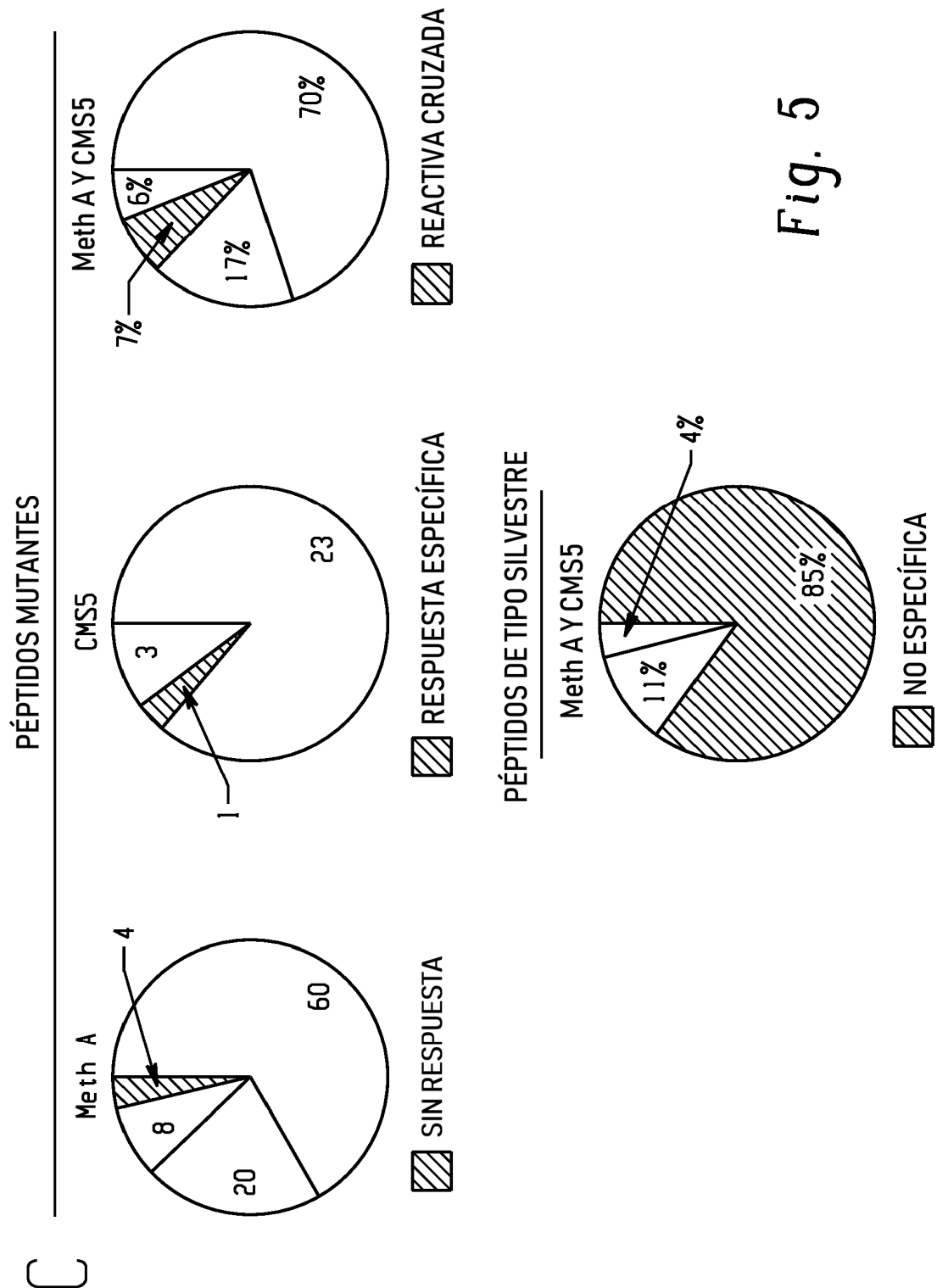


Fig. 5

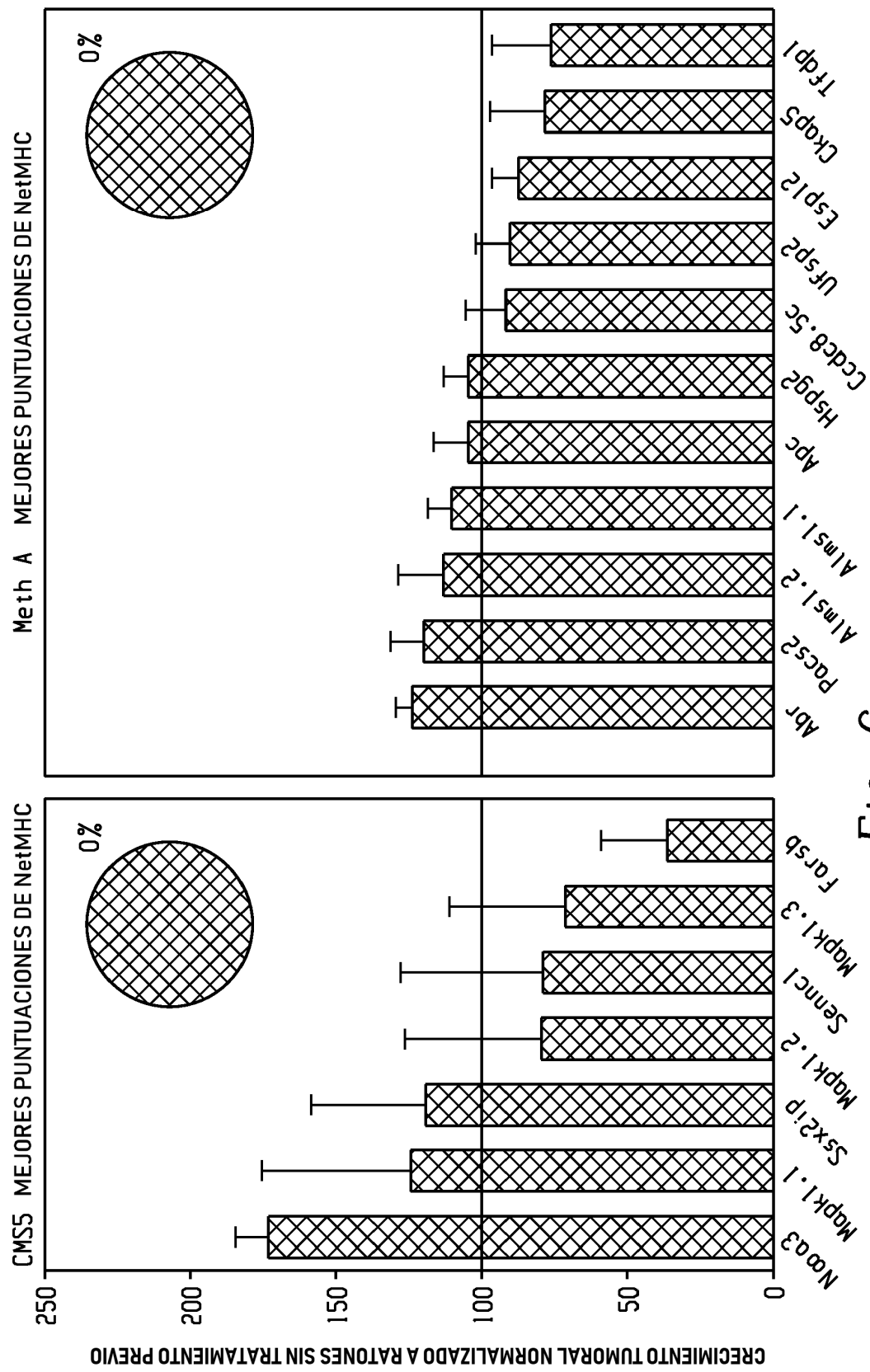


Fig. 6

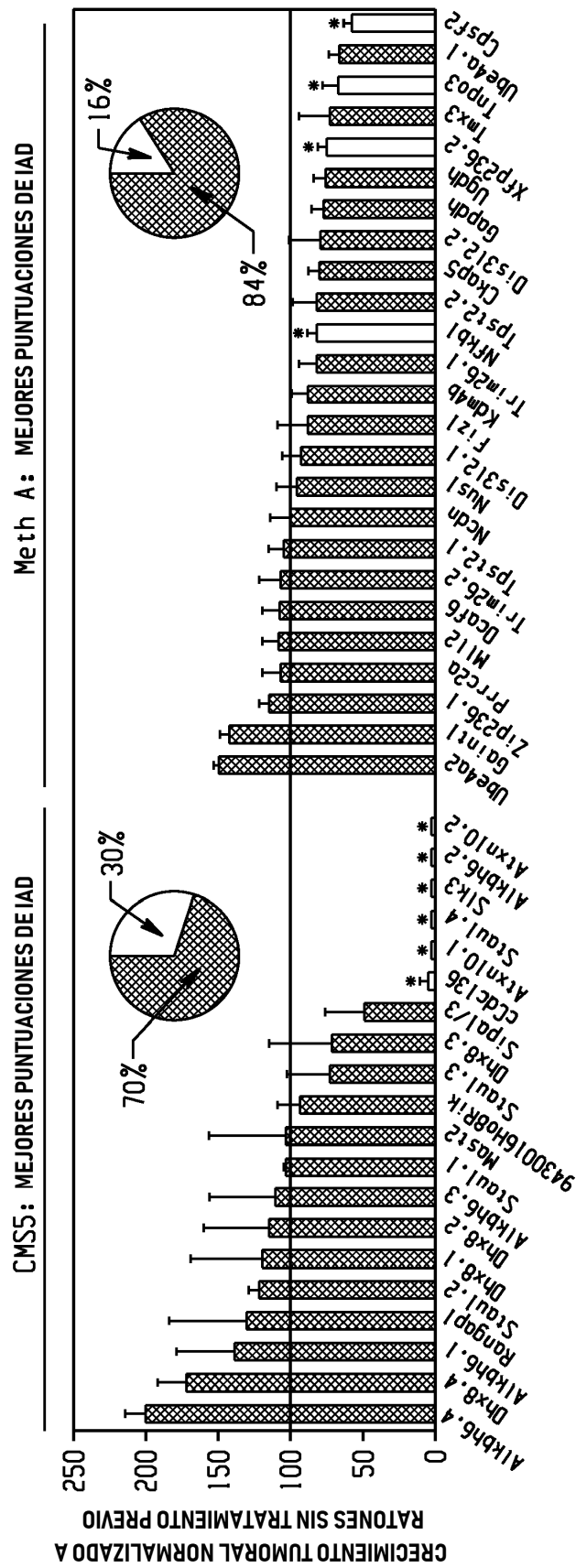


Fig. 7

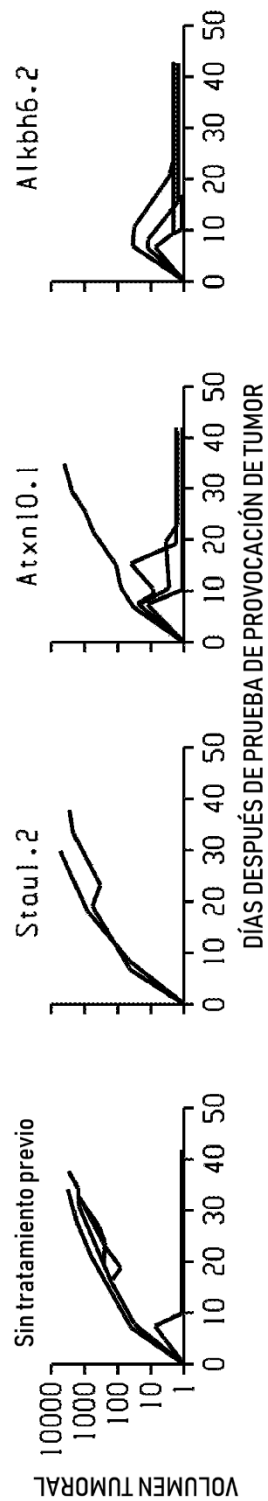


Fig. 8

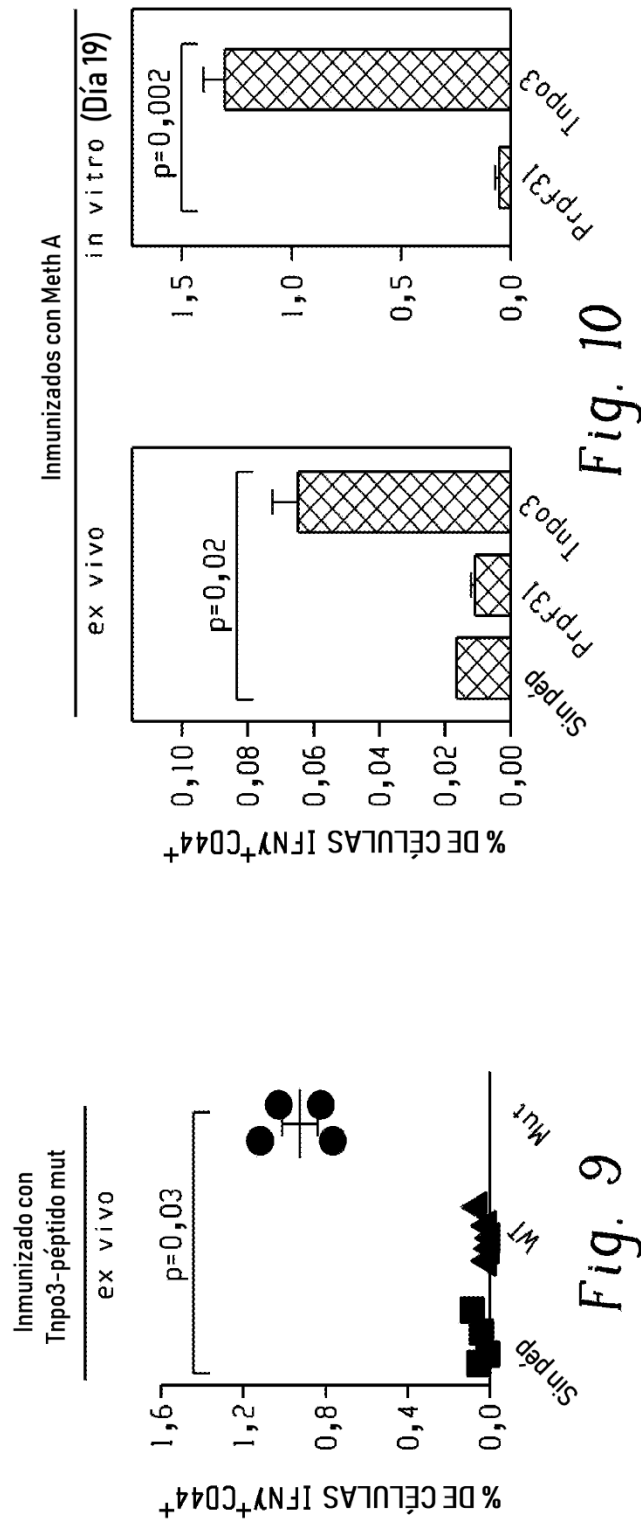


Fig. 9

Fig. 10

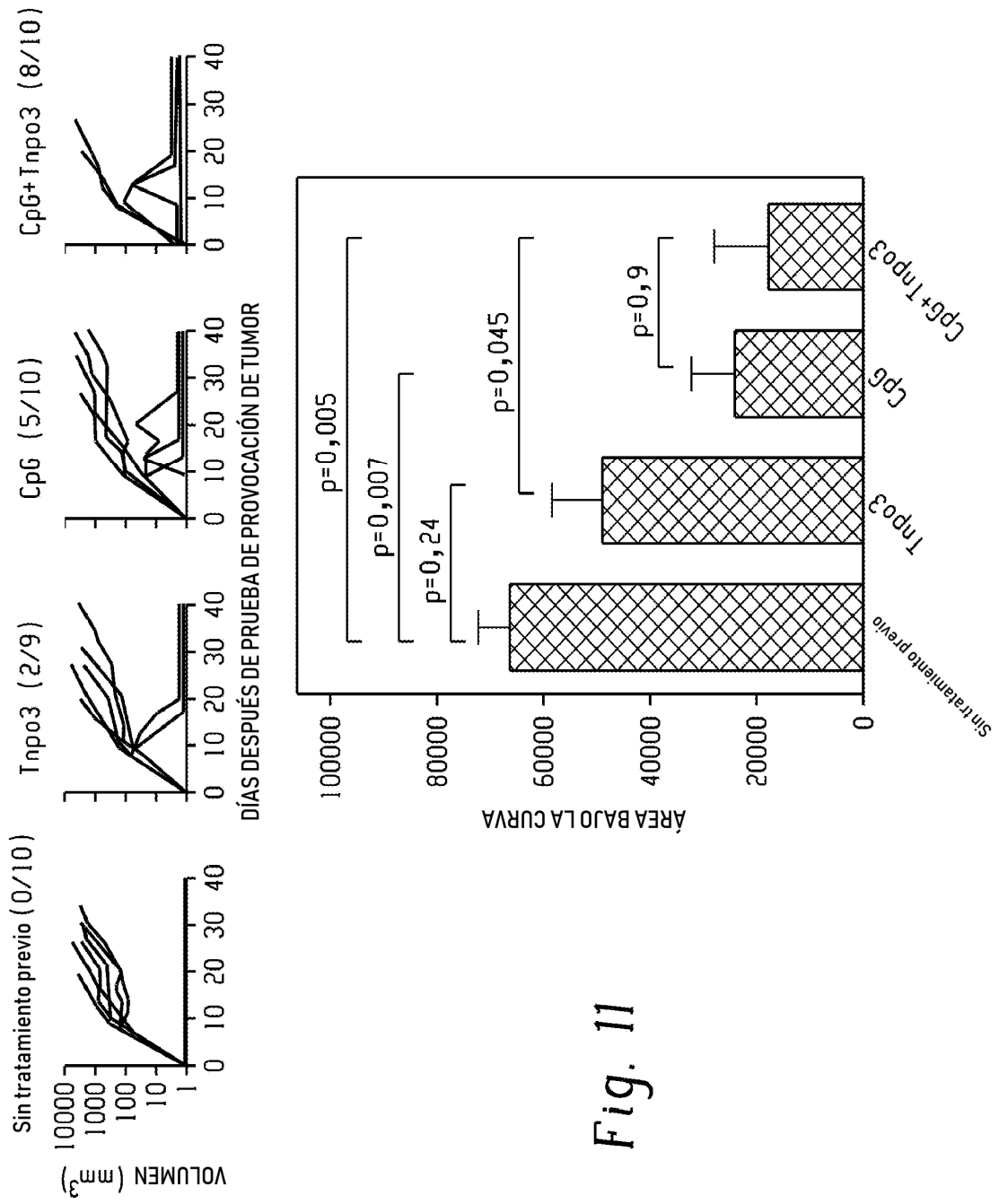


Fig. 11

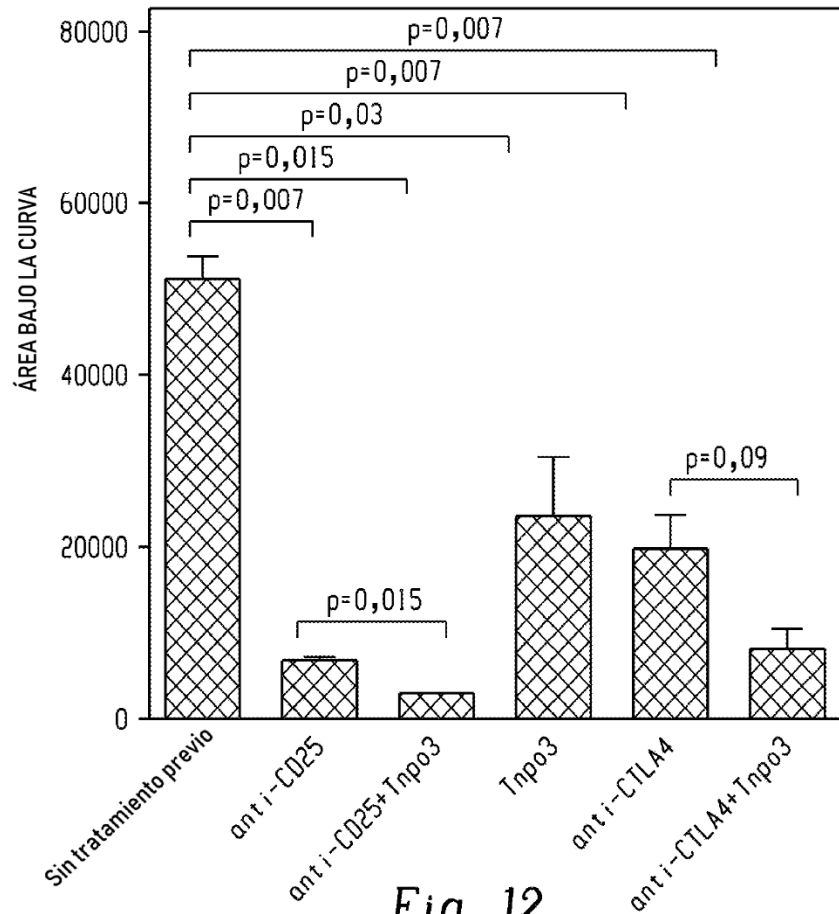
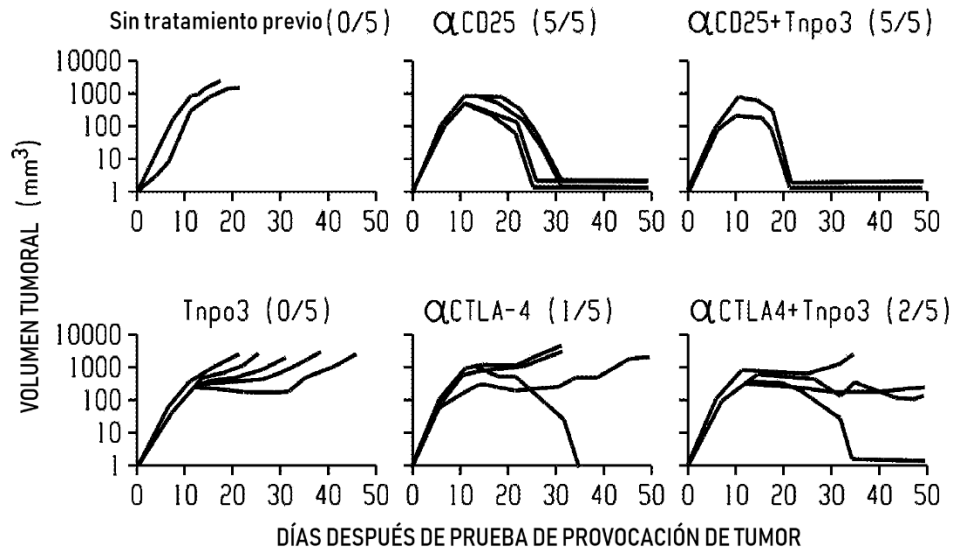


Fig. 12