(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 788 863**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011 E 15198284 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3023788**

(54) Título: **Composiciones de neoantígenos específicos de un tumor para uso en el tratamiento de tumores**

(30) Prioridad:

14.05.2010 US 334866 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

HACOHEN, NIR y
WU, CATHERINE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de neoantígenos específicos de un tumor para uso en el tratamiento de tumores

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Aquellos aspectos/ejemplos de la presente descripción que constituyen la invención vienen definidos por las reivindicaciones.

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

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

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

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

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

En un aspecto adicional la descripción proporciona métodos para inducir una respuesta inmune específica de tumor en un sujeto a través de la administración de uno o más péptidos o polipéptidos identificados según los métodos de la descripción y un adyuvante. El adyuvante, por ejemplo, es un adyuvante basado en TLR o un adyuvante basado en aceite mineral. En algunos aspectos, el péptido o polipéptido y el adyuvante basado en TLR se emulsionan con un adyuvante basado en aceite mineral. Opcionalmente, el método incluye además la administración de un agente anti-inmunosupresor tal como un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PDI, un anticuerpo anti-PD-LI, un anticuerpo anti-CD25 o un inhibidor de IDO.

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

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

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

El método de la reivindicación 22, en el que dicho sujeto recibió un trasplante de células madre hematopoyéticas.

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

También se incluyen en la descripción composiciones farmacéuticas que contienen el péptido o el polipéptido identificados según los métodos de la descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

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

Una composición que comprende al menos dos péptidos Abl distintos, donde cada péptido tiene una longitud igual o inferior a 50 aminoácidos y contiene una valina en la posición de aminoácido 244; una valina en la posición de aminoácido 248; un ácido glutámico en la posición de aminoácido 250; una alanina en la posición de aminoácido 250; una histidina en la posición de aminoácido 252; una arginina en la posición de aminoácido 252; una fenilalanina

en la posición de aminoácido 253; una histidina en la posición de aminoácido 253; una lisina en la posición de aminoácido 255; una valina en la posición de aminoácido 255; una glicina en la posición de aminoácido 276; una isoleucina en la posición de aminoácido 315; una asparagina en la posición de aminoácido 315; una leucina en la posición de aminoácido 317; una treonina en la posición de aminoácido 343; una treonina en la posición de aminoácido 351; una glicina en la posición de aminoácido 355; una valina en la posición de aminoácido 359; una alanina en la posición de aminoácido 359; una isoleucina en la posición de aminoácido 379; una leucina en la posición de aminoácido 382; una metionina en la posición de aminoácido 387; una prolina en la posición de aminoácido 396; una arginina en la posición de aminoácido 396; una tirosina en la posición de aminoácido 417; o una serina en la posición de aminoácido 486, cuando se numeran según el ABL natural.

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

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

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

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

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

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado utilizado habitualmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta descripción. En caso de conflicto prevalecerá la presente memoria, incluyendo sus definiciones.

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

Breve descripción de las figuras

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

Figura 2: es un esquema de una estrategia de vacunación con neoantígenos personalizada que puede aplicarse al tratamiento de cualquier cáncer. También destacamos la posibilidad de aplicar esta estrategia en dos escenarios únicos. En el primer caso, un paciente es vacunado en un periodo temprano tras el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) (p.ej., como ocurre en la CLL, la CML y otras leucemias). El periodo post-HSCT temprano es un momento terapéutico único ya que el sistema inmune es competente debido a la reconstitución con HSCT, superando de este modo los defectos inmunes del hospedante inducidos por el tumor o el tratamiento. Además, la abundancia de citocinas homeostáticas en un entorno de linfopenia, tal como el periodo temprano post-HSCT, puede contribuir a la expansión rápida de células T. En el segundo caso, un paciente es vacunado de forma temprana en el curso de la enfermedad cuando la competencia inmune puede estar más intacta en las etapas tempranas de la enfermedad, antes de sufrir daños por exposición a quimioterapia (p.ej., para tumores sólidos o hematopoyéticos). Puesto que el sistema inmune probablemente es más activo en estas dos situaciones específicas, sugerimos que éstas son las situaciones ideales para aplicar estrategias de vacunación de tumores.

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 11: muestra que las mutaciones BCR-ABL generan muchos péptidos que se ha predicho que se unen a alelos HLA-A y HLA-B. Aplicando el algoritmo de predicción NetMHC (Nielsen et al. PLoS One. 2007, 2(8):e796), se predijeron los péptidos generados a partir de las mutaciones BCR-ABL con potencial para unirse a 8 alelos HLA-A y –B comunes. Las mutaciones BCR-ABL más comunes se ordenan en frecuencia decreciente (de izquierda a

derecha), y se muestran los valores de IC50 predichos para varios péptidos de unión a MHC de clase I. En total, se predijo la unión de 84 péptidos con buena afinidad, definida como una IC50 inferior a 1000, de entre una amplia variedad de alelos de HLA. De todos los péptidos predichos, se predijo que 24 de 84 (29%) son ligandos *fuertes* con una IC50 < 50. 42 péptidos (50%) resultaron ser ligandos intermedios, definidos por una IC50 de entre 50 y 500. 18 péptidos (21%) fueron ligandos débiles, definidos por una IC50 de entre 500 y 1000.

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

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

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

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

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

Descripción detallada de la invención

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

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

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

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

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

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

Las moléculas que transportan y presentan péptidos sobre la superficie celular son denominadas proteínas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC, del inglés “major histocompatibility complex”). Las proteínas MHC se clasifican en proteínas MHC de clase I y de clase II. Las estructuras de las proteínas de las dos clases de MHC son muy similares; sin embargo, difieren de forma bastante considerable en su función. Las proteínas MHC de clase I están presentes sobre la superficie de casi todas las células del cuerpo, incluyendo la mayoría de las células tumorales. Las proteínas MHC de clase I se cargan de antígenos que habitualmente proceden de proteínas endógenas o de patógenos presentes dentro de las células, y a continuación son presentadas a linfocitos-T citotóxicos (CTLs, del inglés “cytotoxic T-lymphocytes”). Las proteínas MHC de clase II solo están presentes sobre células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y otras células presentadoras de antígeno. Principalmente presentan péptidos, que son procesados a partir de fuentes de antígenos externas, es decir, del exterior de las células, en células T colaboradoras (Th, del inglés “T-helper”). La mayoría de los péptidos ligados por las proteínas MHC de clase I proceden de proteínas citoplásmicas producidas en el propio organismo hospedante sano y normalmente no estimulan una reacción inmune. Por consiguiente, los linfocitos T citotóxicos que reconocen dichas moléculas MHC de auto-presentación de péptido de clase I son eliminados en el timo o, tras su liberación del timo, son eliminados o desactivados, es decir, entrenados (“tolerized”). Las moléculas MHC solo son capaces de estimular una reacción inmune cuando presentan péptidos a linfocitos T citotóxicos no entrenados. Los linfocitos T citotóxicos tienen, en su superficie, tanto receptores de células T (TCR) como moléculas CD8. Los receptores de células T son capaces de reconocer y unirse a péptidos que forman complejos con las moléculas de MHC de clase I. Cada linfocito T citotóxico expresa un único receptor de células T que es capaz de unirse a complejos MHC/péptido específicos.

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

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

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

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

Definiciones

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

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

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

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

Las “proteínas o moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC)”, las “moléculas MHC”, las “proteínas de MHC” o las “proteínas de HLA” deben entenderse con el significado, en particular, de proteínas capaces de unirse a péptidos que resultan de la ruptura proteolítica de antígenos proteínicos y que constituyen epítopos de células T potenciales, de transportarlos a la superficie celular y de presentarlos allí a células específicas, en particular a células de linfocitos T citotóxicos o a células T colaboradoras. El complejo de histocompatibilidad principal en el genoma comprende la región genética cuyos productos génicos expresados sobre la superficie celular son importantes para la unión y la presentación de antígenos endógenos y/o extraños, y por tanto para regular los

procesos inmonológicos. El complejo de histocompatibilidad principal se clasifica en dos grupos de genes que codifican para proteínas diferentes, a saber moléculas de MHC de clase I y moléculas de MHC de clase II. Las moléculas de las dos clases de MHC están especializadas para diferentes fuentes de antígenos. Las moléculas de MHC de clase I presentan antígenos sintetizados endógenamente, por ejemplo proteínas víricas y antígenos tumorales. Las moléculas de MHC de clase II presentan antígenos proteínicos que proceden de fuentes exógenas, por ejemplo de productos bacterianos. La biología celular y los modelos de expresión de las dos clases de MHC están adaptados a estos diferentes roles.

Las moléculas de MHC de clase I constan de una cadena pesada y una cadena ligera y son capaces de unirse a un péptido de aproximadamente 8 a 11 aminoácidos, pero normalmente de 9 ó 10 aminoácidos, si dicho péptido tiene las estructuras de unión adecuadas, y de presentarlo a linfocitos T citotóxicos. El péptido unido a las moléculas de MHC de clase I procede de un antígeno proteínico endógeno. La cadena pesada de las moléculas de MHC de clase I preferiblemente es un monómero de HLA-A, HLA-B o HLA-C, y la cadena ligera es β-2-microglobulina.

Las moléculas de MHC de clase II constan de una cadena α y de una cadena β y son capaces de unirse a un péptido de aproximadamente 15 a 24 aminoácidos si dicho péptido presenta las estructuras de unión adecuadas, y de presentarlo a células T colaboradoras. El péptido unido a las moléculas de MHC de clase II normalmente procede de un antígeno proteínico exógeno extracelular. La cadena α y la cadena β son en particular monómeros HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

Una “vacuna” debe entenderse que significa una composición para generar inmunidad para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades. Por consiguiente, las vacunas son medicamentos que comprenden antígenos y que están destinadas a uso en humanos o animales para generar una defensa específica y una sustancia protectora mediante vacunación.

“Aislado” significa que el polinucleótido o polipéptido o fragmento, variante o derivado del mismo han sido purificados esencialmente de otros materiales biológicos con los que se encuentra asociado de forma natural, o que está esencialmente libre de otros materiales biológicos derivados, p.ej., de una célula hospedante recombinante que ha sido modificada genéticamente para expresar el polipéptido de la descripción.

“Neoantígeno” significa una clase de antígenos tumorales que se activan por mutaciones específicas de tumor en proteínas expresadas.

“Purificado” significa que el polinucleótido o polipéptido o fragmento, variante o derivado del mismo, está sustancialmente libre de otro material biológico con el cual se encuentra asociado de forma natural, o que está libre de otros materiales biológicos derivados, p.ej., de una célula hospedante recombinante que ha sido modificada genéticamente para expresar el polipéptido de la descripción. Es decir, p.ej., un polipéptido purificado de la presente descripción es un polipéptido que es al menos aproximadamente un 70-100% puro, es decir, el polipéptido está presente en una composición en la que el polipéptido constituye aproximadamente el 70-100% en peso de la composición total. En algunos ejemplos, el polipéptido purificado de la presente descripción es aproximadamente puro al 75%-99% en peso, aproximadamente puro al 80%-99% en peso, aproximadamente puro al 90%-99% en peso, o aproximadamente puro al 95%-99% en peso.

Identificación de mutaciones específicas de tumor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Recientemente se han descrito varios procedimientos de incorporación de nucleótidos guiada por cebadores para evaluar sitios polimórficos en ADN (Komher, J. S. et al, Nucl. Acids. Res. 17: 7779-7784 (1989); Sokolov, B. P., Nucl. Acids Res. 18: 3671 (1990); Syvanen, A.-C., et al., Genomics 8: 684-692 (1990); Kuppuswamy, M. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 1143-1147 (1991); Prezant, T. R. et al., Hum. Mutat. 1: 159-164 (1992); Ugozzoli, L. et al., GATA 9: 107-112 (1992); Nyren, P. et al., Anal. Biochem. 208: 171-175 (1993)). Estos métodos difieren del GBA® en que se basan todos en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para discriminar entre bases en un sitio polimórfico. En dicho formato, puesto que la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en experimentos del mismo nucleótido pueden dar como resultado señales que son proporcionales a la longitud del experimento (Syvanen, A.-C., et al., Amer. H. Hum. Genet. 52: 46-59 (1993)).

Actualmente está en marcha una serie de iniciativas para obtener información de secuencia directamente de millones de moléculas individuales de ADN o de ARN en paralelo. Las tecnologías de secuenciamiento-por-síntesis de molécula individual en tiempo real se basan en la detección de nucleótidos fluorescentes según se van incorporando a una cadena de ADN incipiente que es complementaria a la plantilla que se esté secuenciando. En un método, se anclan covalentemente oligonucleótidos de 30-50 bases de longitud en el extremo 5' de portaobjetos de vidrio. Dichas cadenas ancladas realizan dos funciones. En primer lugar, actúan como sitios de captura para las

cadenas de plantilla de diana si las plantillas se configuran con colas de captura complementarias a los oligonucleótidos ligados a superficie. También actúan como cebadores para la extensión del cebador dirigido por plantilla que conforma la base de la lectura de secuencia. Los cebadores de captura actúan como un sitio de posición fija para la determinación de la secuencia usando múltiples ciclos de síntesis, detección y ruptura química del colorante-ligando para eliminar el colorante. Cada ciclo consiste en añadir la mezcla de nucleótidos marcados/polimerasa, lavar, obtener imágenes y provocar la separación por ruptura del colorante. En un método alternativo, la polimerasa se modifica con una molécula donante fluorescente y se inmoviliza sobre un porta de vidrio, mientras que cada nucleótido es codificado mediante colores con un resto fluorescente aceptor unido a un gamma-fosfato. El sistema detecta la interacción entre una polimerasa marcada fluorescentemente y un nucleótido modificado fluorescentemente según el nucleótido se va incorporando en la cadena en crecimiento. También existen otras tecnologías de secuenciamiento-por-síntesis.

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

Como alternativa a una secuencia de captura, se puede ligar un miembro de un par de acoplamiento (tal como, p.ej., anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, o el par avidina-biotina tal como se describe, p.ej., en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 2006/0252077) a todos los fragmentos que van a ser capturados sobre una superficie recubierta con un segundo miembro respectivo de dicho par de acoplamiento.

Después de la captura, la secuencia se puede analizar, por ejemplo, mediante secuenciamiento/detección de moléculas individuales, p.ej., como se describe en los Ejemplos y la Patente de EE.UU. nº 7.283.337, incluyendo el secuenciamiento-por-síntesis dependiente de plantilla. En el secuenciamiento-por-síntesis, la molécula ligada a la superficie es expuesta a una pluralidad de trifosfatos de nucleótido marcados en presencia de polimerasa. La secuencia de la plantilla se determina por el orden de nucleótidos marcados incorporados en el extremo 3' de la cadena en crecimiento. Esto se puede realizar en tiempo real o se puede realizar en un modo de paso-y-repetición. Para el análisis en tiempo real, se pueden incorporar diferentes etiquetas ópticas a cada nucleótido y se pueden utilizar múltiples láseres para la estimulación de los nucleótidos incorporados.

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

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

Péptidos neoantigénicos

La descripción incluye además péptidos aislados que comprenden las mutaciones específicas de tumor identificadas por los métodos de la descripción, péptidos que comprenden mutaciones específicas de tumor conocidas, y polipéptidos mutantes o fragmentos de los mismos identificados mediante el método de la descripción. Estos péptidos y polipéptidos se denominan en la presente memoria "péptidos neoantigénicos" o "polipéptidos neoantigénicos". El término "péptido" se usa de forma intercambiable con el de "péptido mutante" y el de "péptido neoantigénico" en la presente especificación para designar una serie de residuos, típicamente aminoácidos L, conectados unos a otros, típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α-amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. De forma similar, el término "polipéptido" se usa de forma intercambiable con el de "polipéptido mutante" y el de "polipéptido neoantigénico" en la presente especificación para designar una serie de residuos, típicamente aminoácidos L, conectados unos a otros, típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos a-amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. Los polipéptidos o péptidos pueden tener una variedad de longitudes, tanto en sus formas neutras (sin carga) como en sus formas de sal, y tanto libres de modificaciones tales como glicosilación, oxidación de cadena lateral o fosforilación, como conteniendo dichas modificaciones, sujetos a la condición de que la modificación no destruya la actividad biológica de los polipéptidos tal como se describe en la presente memoria.

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

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

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

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

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

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

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

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

makiakthedieaqireiqgkkaaldeaqgvgldstgyydqeiyggsdsr
fagyvtsiaateledddddyssstsllgqkkpgyhapvallndipqsteq
ydpfaehrppkiadredeykkhrrtmiisperldpfadggktpdpkmnar
tymdvmreqhltkeereirqqlaekakagelkvvngaaasqppskrkrrw
dqtadqtpgatpkklsswdqaetpghtpslrwdetpgrakgsetpgatpg
skiwdptpshtpagaatpgrgdtpghatpghggatssarknrwdetpkte
rdtpghgsgwaetprtdrggdsigetptpgaskrksrwdetpasqmggst
pvltpgktpigtpamnmatptpghimsmtpeqlqawrwereidernrpls
deeldamfpegykvlpppagyvpirtparkltatptplggmtgfhmqted
rtmksvndqpsgnlpflkpddiqyfdkllvdvdestlspeeqkerkimkl
llkikngtppmrkaalrqitdkarefgagplfnqilpllmsptledqerh
llvkvidrilyklddlvrpyvhkilvviepllidedyyarvegreiisnl
akaaglatmistmrpdidnmdeyvrnttarafavvasalgipsllpflka
vckskkswqarhtgikivqqiailmgcailphlrslveiiehglvdeqqk
vrtisalaiaalaeaatpygiesfdsvlkplwkgirqhrgkglaaflkai
gyliplmdaeyanyytrevmlilirefqspdeemkkivlkvvkqccgtdg
veanyikteilppffkhfwqhrmaldrrnyrqlvdttvelankvgaaeii
srivddlkdeaeqyrkmvmetiekimgnlgaadidhkleeqlidgilyaf
qeqttedsvmlngfgtvvnalgkrvkpylpqicgtvlwrlnnksakvrqq
aadlisrtavvmktcqeeklmghlgvvlyeylgeeypevlgsilgalkai
vnvigmhkmtppikdllprltpilknrhekvqencidlvgriadrgaeyv
sarewmricfellellkahkkairratvntfgyiakaigphdvlatllnn
lkvqerqnrvcttvaiaivaetcspftvlpalmneyrvpelnvqngvlks
lsflfeyigemgkdyiyavtplledalmdrdlvhrqtasavvqhmslgvy
gfgcedslnhllnyvwpnvfetsphviqavmgaleglrvaigpcrmlqyc
lqglfhparkvrdvywkiynsiyigsqdaliahypriynddkntyiryel
dyil

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

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

mrpdraeapgppamaaggpgagsaapvsstsslplaalnmrvrrrlslfl
nvrtqvaadwtalaeemdfeyleirqletqadptgrlldawqgrpgasvg
rllellтklgrddvllelgpsieedcqkyilkqqqeeaekplqvaavdss
vprtaelagittlddplghmperfdaficycpsdiqfvqemirqleqtny
rlklcvsdrdvlpgtcvwsiaseliekrcrrmvvvvsddylqskecdfqt
kfalslspgahqkrlipikykamkkefpsilrfitvcdytnpctkswfwt
rlakalslp

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

Tabla C: TP53 natural (SEQ ID NO: 3)
meepqsdpsvepplsqetfsdlwkllpennvlsplpsqamddlmlspddi eqwftedpgpdeaprmpeaappvapapaaptpaapapapswplsssvpsq ktyqgsygfrlgflhsgtaksvtctyspalnkmfcqlaktcpvqlwvdst pppgtrvramaiykqsqhmtevvrrcphhercsdsdglappqhlirvegn lrveylddrntfrhsvvvpyeppevgsdcttihynymcnsscmggmnrrp iltiitledssgnllgrnsfevrvcacpgrdrrteeenlrkkgephhelp pgstkralpnntssspqpkkkpldgeyftlqirgrerfemfrelnealel kdaqagkepggsrahsshlkskkgqstsrhkklmfktegpdsd

Con un péptido ATM se pretende indicar que el péptido contiene una porción de un polipéptido SF3B1. Preferiblemente, un péptido ATM incluye una fenilalanina en la posición de aminoácido 1252; una arginina en la posición de aminoácido 2038; una histidina en la posición de aminoácido 2522; o una cisteína en la posición de aminoácido 2954, cuando se numeran según el ATM natural. En la Tabla D se muestra un ATM natural (SEQ ID NO: 4).

Tabla D: ATM natural (SEQ ID NO: 4)
mslvlndlliccrqlehdraterkkevekfkrlirdpetikhldrhsdsk qgkylnwdavfrflqkyiqketeclriakpnvsastqasrqkkmqeissl vkyfikcanrraprlkcqellnyimdtvkdssngaiygadcsnillkdil svrkywceisqqqwlelfsvyfrlylkpsqdvhrvlvariihavtkgccs qtdglnskfldffskaiqcarqekssslnhilaaltiflktlavnfrir vcelgdeilptllyiwtqhrlndslkeviielfqlqiyihhpkgaktqek gayestkwrsilynlydllvneishigsrgkyssgfrniavkenlielma

dichqvfnedtrsleisqsytttqressdysvpckrkkielgwevikdhl
qksqndfdlvpwlqiatqliskypaslpncelspllmilsqllpqqrhge
rtpyvlrcltevalcqdkrsnlessqksdllklwnkiwcitfrgisseqi
qaenfgllgaiiqgslvevdrefwklftgsacrpscpavccltlalttsi
vpgtvkmgieqnmcevnrsfslkesimkwllfyqlegdlenstevppilh
snfphlvlekilvsltmknckaamnffqsvpecehhqkdkeelsfsevee
lflqttfdkmdfltivrecgiekhqssigfsvhqnlkesldrcllglseq
llnnysseitnsetlvrcsrllvgvlgcycymgviaeeeaykselfqkak
slmqcagesitlfknktneefrigslrnmmqlctrclsnctkkspnkias
gfflrlltsklmndiadickslasfikkpfdrgevesmeddtngnlmeve
dqssmnlfndypdssvsdanepgesqstigainplaeeylskqdllfldm
lkflclcvttaqtntvsfraadirrkllmlidsstleptkslhlhmylml
lkelpgeeyplpmedvlellkplsnvcslyrrdqdvcktilnhvlhvvkn
lgqsnmdsentrdaqgqfltvigafwhltkerkyifsvrmalvnclktll
eadpyskwailnvmgkdfpvnevftqfladnhhqvrmlaaesinrlfqdt
kgdssrllkalplklqqtafenaylkaqegmremshsaenpetldeiynr
ksvlltliavvlscspicekqalfalcksvkenglephlvkkvlekvset
fgyrrledfmashldylvlewlnlqdteynlssfpfillnytniedfyrs
cykvliphlvirshfdevksianqiqedwkslltdcfpkilvnilpyfay
egtrdsgmaqqretatkvydmlksenllgkqidhlfisnlpeivvellmt
lhepanssasqstdlcdfsgdldpapnpphfpshvikatfayisnchktk
lksileilskspdsyqkillaiceqaaetnnvykkhrilkiyhlfvslll
kdiksglggawafvlrdviytlihyinqrpscimdvslrsfslccdllsq
vcqtavtyckdalenhlhvivgtliplvyeqvevqkqvldllkylvidnk
dnenlyitiklldpfpdhvvfkdlritqqkikysrgpfslleeinhflsv
svydalpltrleglkdlrrqlelhkdqmvdimrasqdnpqdgimvklvvn
llqlskmainhtgekevleavgsclgevgpidfstiaiqhskdasytkal
klfedkelqwtfimltylnntlvedcvkvrsaavtclknilatktghsfw
eiykmttdpmlaylqpfrtsrkkflevprfdkenpfeglddinlwiplse
nhdiwiktltcafldsggtkceilqllkpmcevktdfcqtvlpylihdil
lqdtneswrnllsthvqgfftsclrhfsqtsrsttpanldsesehffrcc
ldkksqrtmlavvdymrrqkrpssgtifndafwldlnylevakvaqscaa
hftallyaeiyadkksmddqekrslafeegsqsttisslsekskeetgis
lqdllleiyrsigepdslygcgggkmlqpitrlrtyeheamwgkalvtyd
letaipsstrqagiiqalqnlglchilsvylkgldyenkdwcpeleelhy
qaawrnmqwdhctsvskevegtsyheslynalqslrdrefstfyeslkya
rvkeveemckrslesvyslyptlsrlqaigelesigelfsrsvthrqlse
vyikwqkhsqllkdsdfsfqepimalrtvileilmekemdnsqrecikdi
ltkhlvelsilartfkntqlperaifqikqynsvscgvsewqleeaqvfw
akkeqslalsilkqmikkldascaannpslkltyteclrvcgnwlaetcl
enpavimqtylekavevagnydgessdelrngkmkaflslarfsdtqyqr
ienymkssefenkqallkrakeevgllrehkiqtnrytvkvqrelеldel
alralkedrkrflckavenyincllsgeehdmwvfrlcslwlensgvsev
ngmmkrdgmkiptykflplmyqlaarmgtkmmgglgfhevlnnlisrism
dhphhtlfiilalananrdefltkpevarrsritknvpkqssqldedrte
aanriictirsrrpqmvrsvealcdayiilanldatqwktqrkginipad
qpitklknledvvvptmeikvdhtgeygnlvtiqsfkaefrlaggvnlpk
iidcvqsdqkerrqlvkqrddlrqdavmqqvfqmcntllqrntetrkrkl

tictykvvplsqrsgvlewctgtvpigeflvnnedgahkryrpndfsafq
cqkkmmevqkksfeekyevfmdvcqnfqpvfryfcmekfldpaiwfekrl
aytrsvatssivgyilglgdrhvqnilineqsaelvhidlgvafeqgkil
ptpetvpfrltrdivdgmgitgvegvfrrccektmevmrnsqetlltive
vllydplfdwtmnplkalylqqrpedetelhptlnaddqeckrnlsdidq
sfnkvaervlmrlqeklkgveegtvlsvggqvnlliqqaidpknlsrlfp
qwkawv

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

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

MLEICLKLVGCKSKKGLSSSSSCYLEEALQRPVASDFEPQGLSEAARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALY
DFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEWCEAQTKNGQGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYL
LSSGINGSFLVRESESSPGQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSESRFNTLAELVHHHSTVADGLI
TTLHYPAPKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEV
EEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVVLLYMATQISSA
MEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKS
DVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPSDRPSFAEIH
QAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVRGAVSTLLQAPELPTKTRTSRRAAEHRDTTDVPEMPHSKGQGESD
PLDHEPAVSPLLPRKERGPPEGGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKKTAPTPPKRSSSFREMDGQPER
RGAGEEEGRDISNGALAFTPLDTADPAKSPKPSNGAGVPNGALRESGGSGFRSPHLWKKSSTLTSSRLAT
GEEEGGGSSSKRFLRSCSASCVPHGAKDTEWRSVTLPRDLQSTGRQFDSSTFGGHKSEKPALPRKRAGEN
RSDQVTRGTVTPPPRLVKKNEEAADEVFKDIMESSPGSSPPNLTPKPLRRQVTVAPASGLPHKEEAGKGS
ALGTPAAAEPVTPTSKAGSGAPGGTSKGPAEESRVRRHKHSSESPGRDKGKLSRLKPAPPPPPAASAGKA
GGKPSQSPSQEAAGEAVLGAKTKATSLVDAVNSDAAKPSQPGEGLKKPVLPATPKPQSAKPSGTPISPAP
VPSTLPSASSALAGDQPSSTAFIPLISTRVSLRKTRQPPERIASGAITKGVVLDSTEALCLAISRNSEQM
ASHSAVLEAGKNLYTFCVSYVDSIQQMRNKFAFREAINKLENNLRELQICPATAGSGPAATQDFSKLLSS
VKEISDIVQR

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

Tabla F: FBXW7 natural (SEQ ID NO: 6)
mnqellsvgskrrrtggslrgnpsssqvdeeqmnrvveeeqqqqlrqqee ehtarngevvgveprpggqndsqqgqleennnrfisvdedssgnqeeqee deehageqdeedeeeeemdqesddfdqsddssredehthtnsvtnsssiv dlpvhqlsspfytkttkmkrkldhgsevrsfslgkkpckvseytsttglv pcsatpttfgdlraangqgqqrrritsvqpptglqewlkmfqswsgpekl laldelidsceptqvkhmmqviepqfqrdfisllpkelalyvlsflepkd llqaaqtcrywrilaednllwrekckeegideplhikrrkvikpgfihsp wksayirqhridtnwrrgelkspkvlkghddhvitclqfcgnrivsgsdd ntlkvwsavtgkclrtlvghtggvwssqmrdniiisgstdrtlkvwnaet gecihtlyghtstvrcmhlhekrvvsgsrdatlrvwdietgqclhvlmgh vaavrcvqydgrrvvsgaydfmvkvwdpetetclhtlqghtnrvyslqfd gihvvsgsldtsirvwdvetgncihtltghqsltsgmelkdnilvsgnad stvkiwdiktgqclqtlqgpnkhqsavtclqfnknfvitssddgtvklwd lktgefirnlvtlesggsggvvwrirasntklvcavgsrngteetkllvl dfdvdmk

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

Tabla F: DDX3X natural (SEQ ID NO: 7)
mshvavenalgldqqfagldlnssdnqsggstaskgryipphlrnreatk gfydkdssgwssskdkdayssfgsrsdsrgkssffsdrgsgsrgrfddrg rsdydgigsrgdrsgfgkferggnsrwcdksdeddwskplppserleqel fsggntginfekyddipveatgnncpphiesfsdvemgeiimgnieltry trptpvqkhaipiikekrdlmacaqtgsgktaafllpilsqiysdgpgea lramkengrygrrkqypislvlaptrelavqiyeearkfsyrsrvrpcvv yggadigqqirdlergchllvatpgrlvdmmergkigldfckylvldead rmldmgfepqirriveqdtmppkgvrhtmmfsatfpkeiqmlardfldey iflavgrvgstsenitqkvvwveesdkrsflldllnatgkdsltlvfvet kkgadsledflyhegyactsihgdrsqrdreealhqfrsgkspilvatav aargldisnvkhvinfdlpsdieeyvhrigrtgrvgnlglatsffnerni nitkdlldllveakqevpswlenmayehhykgssrgrskssrfsggfgar dyrqssgassssfsssrasssrsgggghgssrgfggggyggfynsdgygg nynsqgvdwwgn

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

Tabla F: MAPK1 natural (SEQ ID NO: 8)
maaaaaagagpemvrgqvfdvgprytnlsyigegaygmvcsaydnvnkvr vaikkispfehqtycqrtlreikillrfrheniigindiiraptieqmkd vyivqdlmetdlykllktqhlsndhicyflyqilrglkyihsanvlhrdl kpsnlllnttcdlkicdfglarvadpdhdhtgflteyvatrwyrapeiml nskgytksidiwsvgcilaemlsnrpifpgkhyldqlnhilgilgspsqe dlnciinlkarnyllslphknkvpwnrlfpnadskaldlldkmltfnphk rieveqalahpyleqyydpsdepiaeapfkfdmelddlpkeklkelifee tarfqpgyrs

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

Tabla I: GNB1 natural (SEQ ID NO: 9)
mseldqlrqeaeqlknqirdarkacadatlsqitnnidpvgriqmrtrrt lrghlakiyamhwgtdsrllvsasqdgkliiwdsyttnkvhaiplrsswv mtcayapsgnyvacggldnicsiynlktregnvrvsrelaghtgylsccr flddnqivtssgdttcalwdietgqqtttftghtgdvmslslapdtrlfv sgacdasaklwdvregmcrqtftghesdinaicffpngnafatgsddatc rlfdlradqelmtyshdniicgitsvsfsksgrlllagyddfncnvwdal kadragvlaghdnrvsclgvtddgmavatgswdsflkiwn

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

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

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

entre puntos de contacto esenciales y los determinados atributos funcionales que se buscan (p.ej., hidrofobicidad frente a hidrofilicidad). Un aumento de afinidad de unión por una molécula de MHC o receptor de célula T también se puede lograr mediante dichas sustituciones, con respecto a la afinidad del péptido progenitor. En cualquier evento, dichas sustituciones deberían emplear residuos de aminoácido u otros fragmentos moleculares elegidos para evitar, por ejemplo, interferencias estéricas o de carga que podrían afectar negativamente a la unión.

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

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

Los cambios sustanciales en la función (p.ej., afinidad por moléculas de MHC o receptores de células T) se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservativas que las presentadas en la anterior Tabla, es decir, seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del péptido en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el tamaño de la cadena lateral. Las sustituciones que en general es de esperar que produzcan los mayores cambios en las propiedades de los péptidos serán aquellas en las que (a) un residuo hidrofílico, p.ej., serilo, sustituye a (o es sustituido por) un residuo hidrofóbico, p.ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) un residuo que tenga una cadena lateral electropositiva, p.ej., lisilo, arginilo o histidilo, sustituye a (o es sustituido por) un residuo electronegativo, p.ej., glutamilo o aspartilo; o (c) un residuo que tenga una cadena lateral voluminosa, p.ej., fenilalanina, sustituye a (o es sustituido por) uno que no tenga una cadena lateral, p.ej., glicina.

Los péptidos y polipéptidos también pueden comprender isosteros de dos o más residuos en el péptido o polipéptido neoantigénico. Un isostero, tal como se define en la presente memoria, es una secuencia de dos o más residuos que

puede ser sustituida por una segunda secuencia debido a que la conformación estérica de la primera secuencia encaja con un sitio de unión específico para la segunda secuencia. El término incluye específicamente modificaciones de la cadena principal del péptido bien conocidas por los especialistas en la técnica. Dichas modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno de la amida, del carbono α, del carbonilo de la amida, el reemplazamiento completo del enlace de amida, extensiones, eliminaciones o reticulaciones de la cadena principal. Véase, de forma general, Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. VII (Weinstein ed., 1983).

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

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

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

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

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

Composiciones de vacuna

La presente descripción se refiere a una composición inmunogénica, p.ej., una composición de vacuna capaz de activar una respuesta de células T específica. La composición de vacuna comprende péptidos mutantes y polipéptidos mutantes correspondientes a los neoantígenos específicos de tumor identificados mediante los métodos descritos en la presente memoria.

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

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

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

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

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

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

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

Los adyuvantes adecuados incluyen, aunque sin limitación, 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, Juvlmmune, LipoVac, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA 51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema vector PepTel.RTM., micropartículas PLG, resiquimod, SRL172, Virosomas y otras partículas de tipo virus, YF-17D, trampa VEGF, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, Mass., EE.UU.) que deriva de saponina, extractos micobacterianos y mímicos de pared celular bacteriana sintéticos, y otros adyuvantes registrados tales como Ribi's Detox. Quil o Superfos. Los adyuvantes tales como Freund incompleto o GM-CSF son los preferidos. En el pasado se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p.ej., MF59) específicos de células dendríticas y su preparación (Dupuis M, et al., Cell Immunol. 1998; 186 (1): 18-27; Allison A C; Dev Biol Stand. 1998; 92: 3-11). También se pueden usar citocinas. Varias citocinas han sido relacionadas directamente con una influencia en la migración de células dendríticas a tejidos linfoideos (p.ej., TNF-alfa), acelerando la maduración de células dendríticas en células presentadoras de antígeno eficientes para linfocitos T. (p.ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. nº 5.849.589), y actuando como inmunoadyuvantes (p.ej., IL-12) (Gabrilovich D I, et al., J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6): 414-418).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Como alternativa, la célula presentadora de antígenos comprende una construcción de expresión que codifica un péptido de la presente descripción. El polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido adecuado y es preferible que sea capaz de transducir la célula dendrítica, dando como resultado de este modo la presentación de un péptido y la inducción de inmunidad.

Métodos terapéuticos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Para atacar a las células inmunes, un ligando que vaya a ser incorporado al liposoma puede incluir, p.ej., anticuerpos, o fragmentos de los mismos, específicos para determinantes de la superficie celular de las células del sistema inmune deseadas. Una suspensión de liposomas que contenga un péptido puede administrarse intravenosamente, localmente, tópicamente, etc., en una dosis que varía según, entre otros, el modo de administración, el péptido que se esté administrando, y el estadio de la enfermedad que esté siendo tratada.

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

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

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

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

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

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

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

En el vector se incluyen secuencias reguladoras estándar bien conocidas por los especialistas en la técnica para asegurar la expresión en las células diana. Se requieren varios elementos de vector: un promotor con un sitio de clonación aguas abajo para la inserción de minigén; una señal de poliadenilación para la terminación eficiente de la transcripción; un origen de replicación de *E. coli*; y un marcador seleccionable de *E. coli* (p.ej., resistencia a ampicilina o a canamicina). Se pueden usar numerosos promotores para este fin, p.ej., el promotor de citomegalovirus humano (hCMV). Véanse las Patentes de EE.UU. nº 5.580.859 y 5.589.466 para otras secuencias de promotor adecuadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Una molécula de MHC de clase I es un complejo trimérico formado por los siguientes elementos: 1) un péptido normalmente de 8-10 residuos, 2) una cadena proteínica polimórfica pesada transmembrana que porta el sitio de unión a péptido en sus dominios α1 y α2, y 3) una cadena ligera no polimórfica asociada de forma no covalente, β2 microglobulina. La eliminación de los péptidos ligados y/o la disociación de la β2 microglobulina del complejo hacen que las moléculas de MHC de clase I sean no funcionales e inestables, dando como resultado una rápida degradación. Todas las moléculas de MHC de clase I aisladas de PBMCs tienen péptidos endógenos unidos a ellas. Por lo tanto, la primera etapa es eliminar todos los péptidos endógenos ligados a moléculas de MHC de clase I sobre las APC sin provocar su degradación antes de que se les puedan añadir los péptidos exógenos.

Dos posibles vías para liberar moléculas de MHC de clase I de los péptidos ligados incluyen disminuir la temperatura del cultivo desde 37ºC a 26ºC a lo largo de la noche, para desestabilizar la β2 microglobulina y limpiar los péptidos endógenos de la célula usando un tratamiento ácido suave. Los métodos liberan los péptidos ligados previamente en el entorno extracelular permitiendo que nuevos péptidos exógenos se unan a las moléculas de clase I vacías. El método de incubación a baja temperatura permite que los péptidos exógenos se unan de manera eficaz al complejo de MHC, pero requiere una incubación de una noche a 26ºC que puede frenar la tasa metabólica de la célula. También es probable que las células que no sintetizan de forma activa moléculas de MHC (p.ej., PBMC en reposo) no produzcan grandes cantidades de moléculas de MHC con superficie libre mediante el procedimiento de baja temperatura.

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

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

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

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

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

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

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

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: UNA ESTRATEGIA PARA IDENTIFICAR NEOEPÍTOPOS PARA VACUNACIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se centró la atención en un péptido mutante generado a partir de la mutación E255K (E255K-$B_{255-263}$) (KVYEGVWKK) (SEQ ID NO: 10) que se había predicho que se unía con una elevada afinidad a HLA-A3. (IC_{50} = 33,1). Usando un ensayo de unión a MHC competitivo (Figura 8A), se confirmó experimentalmente la elevada afinidad de unión del E255K-B con HLA-A3 (IC_{50} = 17 nM) con una unión a HLA ~ 10 veces más fuerte del péptido mutante que del péptido progenitor (natural) (Figura 15A). También se verificó experimentalmente que el E255K-B se une a otros miembros de la familia de supertipo A3, HLA-A*1101 y HLA-A*68. A continuación se generaron líneas de células T contra E255K-B procedente de un donante HLA-A3+ normal y 2 pacientes de CML E255K+/HLA-A3+ que mostraron ambos una mayor especificidad contra el péptido mutado que contra el péptido progenitor (Figura 15B, C). Parece ser que el E255K-B se procesa y se presenta endógenamente ya que las células T reactivas frente a E255K-B también respondieron a APCs HLA-A3+ transfectadas con el minigén que engloba los 227 pares base que rodean a la mutación E255K. Finalmente, la reactividad del E255K en un paciente se desarrolló solo tras alo-HSCT curativa (Figura 15D). Estos estudios demuestran que las alteraciones genéticas producidas por la leucemia pueden proporcionar nuevas dianas de antígenos específicos de tumor inmunogénicos que están asociadas a una respuesta clínica *in vivo*. Nuestra estrategia para identificar epítopos de células T inmunogénicos de BCR-ABL mutado ilustra por tanto una estrategia efectiva para aplicar herramientas bioinformáticas al descubrimiento de epítopos de células T a partir de genes mutados.

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

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

EJEMPLO 7: CONDUCTORES TUMORALES MUTADOS COMO ANTÍGENOS TUMORALES POTENCIALES

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

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

REFERENCIAS

Albert, T. J., Molla, M. N., Muzny, D. M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., Richmond, T. A., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Packard, C. J., et al. (2007). Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. Nat Methods 4, 903-905.

Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Canning, C., Neuberg, D., Schlossman, R., Pickett, C., Collins, H., Wang, Y., Anderson, K. C., y Ritz, J. (1998). Toxicity and efficacy of defined doses of CD4(+) donor lymphocytes for treatment of relapse after allogeneic bone marrow transplant. Blood 91, 3671-3680.

Annunziata, C. M., Davis, R. E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., et al. (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. Cancer Cell 12, 115-130.

Attia, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., et al. (2005). Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. J Clin Oncol 23, 6043-6053.

Austen, B., Powell, J. E., Alvi, A., Edwards, I., Hooper, L., Starczynski, J., Taylor, A. M., Fegan, C., Moss, P., y Stankovic, T. (2005). Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. Blood 106, 3175-3182.

Balakrishnan, A., Bleeker, F. E., Lamba, S., Rodolfo, M., Daniotti, M., Scarpa, A., van Tilborg, A. A., Leenstra, S., Zanon, C., y Bardelli, A. (2007). Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. Cancer Res 67, 3545-3550.

Baskar, S., Kobrin, C. B., y Kwak, L. W. (2004). Autologous lymphoma vaccines induce human T cell responses against multiple, unique epitopes. J Clin Invest 113, 1498-1510.

Baurain, J. F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., y Coulie, P. G. (2000). High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. J Immunol 164, 6057-6066.

Beck, K. E., Blansfield, J. A., Tran, K. Q., Feldman, A. L., Hughes, M. S., Royal, R. E., Kammula, U. S., Topalian, S. L., Sherry, R. M., Kleiner, D., et al. (2006). Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. J Clin Oncol 24, 2283-2289.

Bellucci, R., Wu, C. J., Chiaretti, S., Weller, E., Davies, F. E., Alyea, E. P., Dranoff, G., Anderson, K. C., Munshi, N. C., y Ritz, J. (2004). Complete response to donor lymphocyte infusion in multiple myeloma is associated with antibody responses to highly expressed antigens. Blood 103, 656-663.

Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., y van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. Annu Rev Immunol 24, 175-208.

Brandle, D., Brasseur, F., Weynants, P., Boon, T., y Van den Eynde, B. (1996). A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. J Exp Med 183, 2501-2508.

Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., et al. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. Nature 448, 439-444.

Chiari, R., Foury, F., De Plaen, E., Baurain, J. F., Thonnard, J., y Coulie, P. G. (1999). Two antigens recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene. Cancer Res 59, 5785-5792.

De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariame, B., Szikora, J. P., Wolfel, T., Sibille, C., Chomez, P., y Boon, T. (1988). Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. Proc Natl Acad Sci U S A 85, 2274-2278.

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hubicki, A. M., et al. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 298, 850-854.

Estep, A. L., Palmer, C., McCormick, F., y Rauen, K. A. (2007). Mutation Analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 Ovarian Cancer Cell Lines: Implications for Therapy. PLoS ONE 2, e1279.

Garcia-Marco, J. A., Caldas, C., Price, C. M., Wiedemann, L. M., Ashworth, A., y Catovsky, D. (1996). Frequent somatic deletion of the 13q12.3 locus encompassing BRCA2 in chronic lymphocytic leukemia. Blood 88, 1568-1575.

Gilboa, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. Immunity 11, 263-270.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. Nature 446, 153- 158.

Gueguen, M., Patard, J. J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renauld, J. C., Van Cangh, P. J., Boon, T., y Van den Eynde, B. J. (1998). An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. J Immunol 160, 6188-6194.

Herman, J., Jongeneel, V., Kuznetsov, D., y Coulie, P. G. (1999). Differences in the recognition by CTL of peptides presented by the HLA-B*4402 and the HLA-B*4403 molecules which differ by a single amino acid. Tissue Antigens 53, 111-121.

Hocker, T., y Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. Hum Mutat 28, 578-588.

Hodi, F. S., Butler, M., Oble, D. A., Seiden, M. V., Haluska, F. G., Kruse, A., Macrae, S., Nelson, M., Canning, C., Lowy, I., et al. (2008). Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 3005- 3010.

Hodi, F. S., Mihm, M. C., Soiffer, R. J., Haluska, F. G., Butler, M., Seiden, M. V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., et al. (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. Proc Natl Acad Sci USA 100, 4712-4717.

Huang, J., El-Gamil, M., Dudley, M. E., Li, Y. F., Rosenberg, S. A., y Robbins, P. F. (2004). T cells associated with tumor regression recognize frameshifted products of the CDKN2A tumor suppressor gene locus and a mutated HLA class I gene product. J Immunol 172, 6057-6064.

Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J., y Doehn, C. (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. Lancet 363, 594-599.

Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., y Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. Nat Med 13, 552-559.

Keats, J. J., Fonseca, R., Chesi, M., Schop, R., Baker, A., Chng, W. J., Van Wier, S., Tiedemann, R., Shi, C. X., Sebag, M., et al. (2007). Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. Cancer Cell 12, 131-144.

Ladetto, M., Omede, P., Sametti, S., Donovan, J. W., Astolfi, M., Drandi, D., Volpato, F., Giaccone, L., Giaretta, F., Palumbo, A., et al. (2002). Real-time polymerase chain reaction in multiple myeloma: quantitative analysis of tumor contamination of stem cell harvests. Exp Hematol 30, 529-536.

Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R. A., Lifke, A., Ferel, D., Wolfel, C., Huber, C., y Wolfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 16013-16018.

Lin, H. H., Ray, S., Tongchusak, S., Reinherz, E., y Brusic, V. (2008). Evaulation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. BMC Bioinformatics (in press).

Maker, A. V., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., Hughes, M., Yellin, M. J., Haworth, L. R., Levy, C., et al. (2006). Intrapatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. J Immunother (1997) 29, 455-463.

Mandelboim, O., Vadai, E., Fridkin, M., Katz-Hillel, A., Feldman, M., Berke, G., y Eisenbach, L. (1995). Regression of established murine carcinoma metastases following vaccination with tumour-associated antigen peptides. Nat Med 1, 1179-1183.

Mandruzzato, S., Brasseur, F., Andry, G., Boon, T., y van der Bruggen, P. (1997). A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. J Exp Med 186, 785-793.

Marijt, W. A., Heemskerk, M. H., Kloosterboer, F. M., Goulmy, E., Kester, M. G., van der Hoom, M. A., van Luxemburg-Heys, S. A., Hoogeboom, M., Mutis, T., Drijfhout, J. W., et al. (2003). Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 100, 2742-2747.

Marina O, Hainz U, Biernacki MA, et al. (2010) Serologic markers of effective tumor immunity against chronic lymphocytic leukemia include nonmutated B-cell antigens. Cancer Res. 70, 1344-1355.

Mullally, A., y Ritz, J. (2007). Beyond HLA: the significance of genomic variation for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood 109, 1355-1362.

Ofran, Y., Brusic, V., Soiffer, R., Antin, J. H., y Ritz, J. (2008). Identification of human minor histocompatibility antigens (mHa) by combining bioinformatic prediction of peptide epitopes with validation of T cell reactivity in patient blood samples after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Bone Marrow Transplant 14, 1.

Parmiani, G., De Filippo, A., Novellino, L., y Castelli, C. (2007). Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. J Immunol 178, 1975-1979.

Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., y Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family;identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. Cancer Res 67, 3963-3969.

Peters, B., Sidney, J., Bourne, P., Bui, H. H., Buus, S., Doh, G., Fleli, W., Kronenberg, M., Kubo, R., Lund, O., et al. (2005). The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. PLoS Biol 3, e91.

Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., et al. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 8372-8377.

Provan, D., Bartlett-Pandite, L., Zwicky, C., Neuberg, D., Maddocks, A., Corradini, P., Soiffer, R., Ritz, J., Nadler, L. M., y Gribben, J. G. (1996). Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. Blood 88, 2228-2235.

Reifenberger, J., Knobbe, C. B., Sterzinger, A. A., Blaschke, B., Schulte, K. W., Ruzicka, T., y Reifenberger, G. (2004). Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. Int J Cancer 109, 377-384.

Ribas, A., Camacho, L. H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanhagui, C. A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J. M., Seja, E., Parker, C. A., et al. (2005). Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. J Clin Oncol 23, 8968-8977.

Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., y Rosenberg, S. A. (1996). A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med 183, 1185-1192.

Rondon, G., Giralt, S., Huh, Y., Khouri, I., Andersson, B., Andreeff, M., y Champlin, R. (1996). Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. Bone Marrow Transplant 18, 669-672.

Rosenberg, S. A., Yang, J. C., y Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nat Med 10, 909-915.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, L, Porfiri, E., y Polakis, P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. Science 275, 1790-1792.

Sanderson, K., Scotland, R., Lee, P., Liu, D., Groshen, S., Snively, J., Sian, S., Nichol, G., Davis, T., Keler, T., et al. (2005). Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. J Clin Oncol 23, 741-750.

Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., et al. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18538- 18543.

Schaffner, C., Stilgenbauer, S., Rappold, G. A., Dohner, H., y Lichter, P. (1999). Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 94, 748-753.

Segal, N. H., Parsons, D. W., Peggs, K. S., Velculescu, V., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., y Allison, J. P. (2008). Epitope landscape in breast and colorectal cancer. Cancer Res 68, 889-892.

Sensi, M., y Anichini, A. (2006). Unique tumor antigens: evidence for immune control of genome integrity and immunogenic targets for T cell-mediated patient-specific immunotherapy. Clin Cancer Res 12, 5023-5032.

Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science 314, 268-274.

Soiffer, R., Hodi, F. S., Haluska, F., Jung, K., Gillessen, S., Singer, S., Tanabe, K., Duda, R., Mentzer, S., Jaklitsch, M., et al. (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol 21, 3343-3350.

Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J. C., Hodi, F. S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., et al. (1998). Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA 95, 13141-13146.

Srivastava, P. K. (2006). Therapeutic cancer vaccines. Curt Opin Immunol 18, 201-205.

Stankovic, T., Hubank, M., Cronin, D., Stewart, G. S., Fletcher, D., Bignell, C. R., Alvi, A. J., Austen, B., Weston, V. J., Fegan, C., et al. (2004). Microarray analysis reveals that TP53- and ATM-mutant B-CLLs share a defect in activating proapoptotic responses after DNA damage but are distinguished by major differences in activating prosurvival responses. Blood 103, 291-300.

Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., y Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. Cancer Res 63, 2127-2133.

Thomas, R. K., Baker, A. C., Debiasi, R. M., Winckler, W., Laframboise, T., Lin, W. M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L., et al. (2007). High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. Nat Genet 39, 347-351.

Thompson, A. A., Talley, J. A., Do, H. N., Kagan, H. L., Kunkel, L., Berenson, J., Cooper, M. D., Saxon, A., y Wall, R. (1997). Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia. Blood 90, 1387-1394.

Thornton, P. D., Gruszka-Westwood, A. M., Hamoudi, R. A., Atkinson, S., Kaczmarek, P., Morilla, R. M., Hilditch, B. L., A'Hern, R., Matutes, E., y Catovsky, D. (2004). Characterisation of TP53 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. Hematol J 5, 47-54. Timmerman, J. M., Czerwinski, D. K., Davis, T. A., Hsu, F. J., Benike, C., Hao, Z. M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C. B., Okada, C. Y., et al. (2002). Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. Blood 99, 1517-1526.

Toze, C. L., Galal, A., Barnett, M. J., Shepherd, J. D., Conneally, E. A., Hogge, D. E., Nantel, S. H., Nevill, T. J., Sutherland, H. J., Connors, J. M., et al. (2005). Myeloablative allografting for chronic lymphocytic leukemia: evidence for a potent graft-versus-leukemia effect associated with graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant 36, 825-830.

Ueda, M., Toji, E., y Noda, S. (2007). Germ line and somatic mutations of BRAF V599E in ovarian carcinoma. Int J Gynecol Cancer 17, 794-797.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., y Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254, 1643-1647.

Van Pel, A., Georlette, M., y Boon, T. (1979). Tumor cell variants obtained by mutagenesis of a Lewis lung carcinoma cell line: immune rejection by syngeneic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 5282-5285.

Van Trappen, P. O., Cullup, T., Troke, R., Swann, D., Shepherd, J. H., Jacobs, I. J., Gayther, S. A., y Mein, C. A. (2007). Somatic mitochondrial DNA mutations in primary and metastatic ovarian cancer. Gynecol Oncol 104, 129-133.

Willmore-Payne, C., Holden, J. A., Tripp, S., y Layfield, L. J. (2005). Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. Hum Pathol 36, 486-493.

Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K. H., y Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science 269, 1281-1284.

Wu, C. J., Biernacki, M., Kutok, J. L., Rogers, S., Chen, L., Yang, X. F., Soiffer, R. J., y Ritz, J. (2005). Graft-versus-leukemia target antigens in chronic myelogenous leukemia are expressed on myeloid progenitor cells. Clin Cancer Res 11, 4504-4511.

Wu, C. J., Chillemi, A., Alyea, E. P., Orsini, E., Neuberg, D., Soiffer, R. J., y Ritz, J. (2000a). Reconstitution of T-cell receptor repertoire diversity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation is related to hematopoietic chimerism. Blood 95, 352-359.

Wu, C. J., y Ritz, J. (2006). Induction of tumor immunity following allogeneic stem cell transplantation. Adv Immunol 90, 133-173.

Wu, C. J., Yang, X. F., McLaughlin, S., Neuberg, D., Canning, C., Stein, B., Alyea, E. P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., y Ritz, J. (2000b). Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. J Clin Invest 106, 705-714.

Wu, R., Hendrix-Lucas, N., Kuick, R., Zhai, Y., Schwartz, D. R., Akyol, A., Hanash, S., Misek, D. E., Katabuchi, H., Williams, B. O., et al. (2007). Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. Cancer Cell 11, 321-333.

Yang, X. F., Wu, C. J., McLaughlin, S., Chillemi, A., Wang, K. S., Canning, C., Alyea, E. P., Kantoff, P., Soiffer, R. J., Dranoff, G., y Ritz, J. (2001). CML66, a broadly immunogenic tumor antigen, elicits a humoral immune response associated with remission of chronic myelogenous leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 7492-7497.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., et al. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 348, 203-213.

Zhang W, Choi J, Zeng W, et al. (2010) Graft-versus-Leukemia Antigen CML66 Elicits Coordinated B-Cell and T-Cell Immunity after Donor Lymphocyte Infusion. Clin Cancer Res. 16, 2729-2739.

Zhou, J., Dudley, M. E., Rosenberg, S. A., y Robbins, P. F. (2005a). Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. J Immunother (1997) 28, 53-62.

Zhou, X., Jun, D. Y., Thomas, A. M., Huang, X., Huang, L. Q., Mautner, J., Mo, W., Robbins, P. F., Pardoll, D. M., y Jaffee, E. M. (2005b). Diverse CD8+ T-cell responses to renal cell carcinoma antigens in patients treated with an autologous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transduced renal tumor cell vaccine. Cancer Res 65, 1079-1088.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The General Hospital Corporation Dana-Farber Cancer Institute, Inc.

<120> Composiciones y métodos para identificar neoantígenos específicos de un tumor

<130> 39564-502N01EP

<140> 11781409.5
<141> 16-05-2011

<150> 61/334866
<151> 14-05-2010

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ala Lys Ile Ala Lys Thr His Glu Asp Ile Glu Ala Gln Ile Arg
1               5                  10                  15

Glu Ile Gln Gly Lys Lys Ala Ala Leu Asp Glu Ala Gln Gly Val Gly
            20                  25                  30

Leu Asp Ser Thr Gly Tyr Tyr Asp Gln Glu Ile Tyr Gly Gly Ser Asp
        35                  40                  45

Ser Arg Phe Ala Gly Tyr Val Thr Ser Ile Ala Ala Thr Glu Leu Glu
    50                  55                  60

Asp Asp Asp Asp Asp Tyr Ser Ser Ser Thr Ser Leu Leu Gly Gln Lys
65                  70                  75                  80

Lys Pro Gly Tyr His Ala Pro Val Ala Leu Leu Asn Asp Ile Pro Gln
                85                  90                  95

Ser Thr Glu Gln Tyr Asp Pro Phe Ala Glu His Arg Pro Pro Lys Ile
            100                 105                 110

Ala Asp Arg Glu Asp Glu Tyr Lys Lys His Arg Arg Thr Met Ile Ile
        115                 120                 125

Ser Pro Glu Arg Leu Asp Pro Phe Ala Asp Gly Gly Lys Thr Pro Asp
    130                 135                 140
```

```
Pro Lys Met Asn Ala Arg Thr Tyr Met Asp Val Met Arg Glu Gln His
145                 150                 155                 160

Leu Thr Lys Glu Glu Arg Glu Ile Arg Gln Gln Leu Ala Glu Lys Ala
                165                 170                 175

Lys Ala Gly Glu Leu Lys Val Val Asn Gly Ala Ala Ala Ser Gln Pro
            180                 185                 190

Pro Ser Lys Arg Lys Arg Arg Trp Asp Gln Thr Ala Asp Gln Thr Pro
        195                 200                 205

Gly Ala Thr Pro Lys Lys Leu Ser Ser Trp Asp Gln Ala Glu Thr Pro
    210                 215                 220

Gly His Thr Pro Ser Leu Arg Trp Asp Glu Thr Pro Gly Arg Ala Lys
225                 230                 235                 240

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ala Thr Pro Gly Ser Lys Ile Trp Asp Pro
                245                 250                 255

Thr Pro Ser His Thr Pro Ala Gly Ala Ala Thr Pro Gly Arg Gly Asp
            260                 265                 270

Thr Pro Gly His Ala Thr Pro Gly His Gly Gly Ala Thr Ser Ser Ala
        275                 280                 285

Arg Lys Asn Arg Trp Asp Glu Thr Pro Lys Thr Glu Arg Asp Thr Pro
    290                 295                 300

Gly His Gly Ser Gly Trp Ala Glu Thr Pro Arg Thr Asp Arg Gly Gly
305                 310                 315                 320

Asp Ser Ile Gly Glu Thr Pro Thr Pro Gly Ala Ser Lys Arg Lys Ser
                325                 330                 335

Arg Trp Asp Glu Thr Pro Ala Ser Gln Met Gly Gly Ser Thr Pro Val
            340                 345                 350

Leu Thr Pro Gly Lys Thr Pro Ile Gly Thr Pro Ala Met Asn Met Ala
        355                 360                 365

Thr Pro Thr Pro Gly His Ile Met Ser Met Thr Pro Glu Gln Leu Gln
    370                 375                 380

Ala Trp Arg Trp Glu Arg Glu Ile Asp Glu Arg Asn Arg Pro Leu Ser
385                 390                 395                 400
```

```
Asp Glu Glu Leu Asp Ala Met Phe Pro Glu Gly Tyr Lys Val Leu Pro
                405                 410                 415

Pro Pro Ala Gly Tyr Val Pro Ile Arg Thr Pro Ala Arg Lys Leu Thr
            420                 425                 430

Ala Thr Pro Thr Pro Leu Gly Gly Met Thr Gly Phe His Met Gln Thr
        435                 440                 445

Glu Asp Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Asp Gln Pro Ser Gly Asn Leu
    450                 455                 460

Pro Phe Leu Lys Pro Asp Asp Ile Gln Tyr Phe Asp Lys Leu Leu Val
465                 470                 475                 480

Asp Val Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys
                485                 490                 495

Ile Met Lys Leu Leu Leu Lys Ile Lys Asn Gly Thr Pro Pro Met Arg
            500                 505                 510

Lys Ala Ala Leu Arg Gln Ile Thr Asp Lys Ala Arg Glu Phe Gly Ala
        515                 520                 525

Gly Pro Leu Phe Asn Gln Ile Leu Pro Leu Leu Met Ser Pro Thr Leu
    530                 535                 540

Glu Asp Gln Glu Arg His Leu Leu Val Lys Val Ile Asp Arg Ile Leu
545                 550                 555                 560

Tyr Lys Leu Asp Asp Leu Val Arg Pro Tyr Val His Lys Ile Leu Val
                565                 570                 575

Val Ile Glu Pro Leu Leu Ile Asp Glu Asp Tyr Tyr Ala Arg Val Glu
            580                 585                 590

Gly Arg Glu Ile Ile Ser Asn Leu Ala Lys Ala Ala Gly Leu Ala Thr
        595                 600                 605

Met Ile Ser Thr Met Arg Pro Asp Ile Asp Asn Met Asp Glu Tyr Val
    610                 615                 620

Arg Asn Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Val Val Ala Ser Ala Leu Gly
625                 630                 635                 640

Ile Pro Ser Leu Leu Pro Phe Leu Lys Ala Val Cys Lys Ser Lys Lys
                645                 650                 655
```

```
Ser Trp Gln Ala Arg His Thr Gly Ile Lys Ile Val Gln Gln Ile Ala
            660                 665                 670

Ile Leu Met Gly Cys Ala Ile Leu Pro His Leu Arg Ser Leu Val Glu
        675                 680                 685

Ile Ile Glu His Gly Leu Val Asp Glu Gln Gln Lys Val Arg Thr Ile
    690                 695                 700

Ser Ala Leu Ala Ile Ala Ala Leu Ala Glu Ala Ala Thr Pro Tyr Gly
705                 710                 715                 720

Ile Glu Ser Phe Asp Ser Val Leu Lys Pro Leu Trp Lys Gly Ile Arg
                725                 730                 735

Gln His Arg Gly Lys Gly Leu Ala Ala Phe Leu Lys Ala Ile Gly Tyr
            740                 745                 750

Leu Ile Pro Leu Met Asp Ala Glu Tyr Ala Asn Tyr Tyr Thr Arg Glu
        755                 760                 765

Val Met Leu Ile Leu Ile Arg Glu Phe Gln Ser Pro Asp Glu Glu Met
    770                 775                 780

Lys Lys Ile Val Leu Lys Val Val Lys Gln Cys Cys Gly Thr Asp Gly
785                 790                 795                 800

Val Glu Ala Asn Tyr Ile Lys Thr Glu Ile Leu Pro Pro Phe Phe Lys
                805                 810                 815

His Phe Trp Gln His Arg Met Ala Leu Asp Arg Arg Asn Tyr Arg Gln
            820                 825                 830

Leu Val Asp Thr Thr Val Glu Leu Ala Asn Lys Val Gly Ala Ala Glu
        835                 840                 845

Ile Ile Ser Arg Ile Val Asp Asp Leu Lys Asp Glu Ala Glu Gln Tyr
    850                 855                 860

Arg Lys Met Val Met Glu Thr Ile Glu Lys Ile Met Gly Asn Leu Gly
865                 870                 875                 880

Ala Ala Asp Ile Asp His Lys Leu Glu Glu Gln Leu Ile Asp Gly Ile
                885                 890                 895

Leu Tyr Ala Phe Gln Glu Gln Thr Thr Glu Asp Ser Val Met Leu Asn
```

```
            900                 905                 910

Gly Phe Gly Thr Val Val Asn Ala Leu Gly Lys Arg Val Lys Pro Tyr
        915                 920                 925

Leu Pro Gln Ile Cys Gly Thr Val Leu Trp Arg Leu Asn Asn Lys Ser
    930                 935                 940

Ala Lys Val Arg Gln Gln Ala Ala Asp Leu Ile Ser Arg Thr Ala Val
945                 950                 955                 960

Val Met Lys Thr Cys Gln Glu Glu Lys Leu Met Gly His Leu Gly Val
                965                 970                 975

Val Leu Tyr Glu Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu Val Leu Gly Ser
            980                 985                 990

Ile Leu Gly Ala Leu Lys Ala Ile  Val Asn Val Ile Gly  Met His Lys
        995                 1000                1005

Met Thr  Pro Pro Ile Lys Asp  Leu Leu Pro Arg Leu  Thr Pro Ile
    1010                1015                1020

Leu Lys  Asn Arg His Glu Lys  Val Gln Glu Asn Cys  Ile Asp Leu
    1025                1030                1035

Val Gly  Arg Ile Ala Asp Arg  Gly Ala Glu Tyr Val  Ser Ala Arg
    1040                1045                1050

Glu Trp  Met Arg Ile Cys Phe  Glu Leu Leu Glu Leu  Leu Lys Ala
    1055                1060                1065

His Lys  Lys Ala Ile Arg Arg  Ala Thr Val Asn Thr  Phe Gly Tyr
    1070                1075                1080

Ile Ala  Lys Ala Ile Gly Pro  His Asp Val Leu Ala  Thr Leu Leu
    1085                1090                1095

Asn Asn  Leu Lys Val Gln Glu  Arg Gln Asn Arg Val  Cys Thr Thr
    1100                1105                1110

Val Ala  Ile Ala Ile Val Ala  Glu Thr Cys Ser Pro  Phe Thr Val
    1115                1120                1125

Leu Pro  Ala Leu Met Asn Glu  Tyr Arg Val Pro Glu  Leu Asn Val
    1130                1135                1140
```

```
Gln Asn  Gly Val Leu Lys Ser  Leu Ser Phe Leu Phe  Glu Tyr Ile
    1145                 1150                 1155

Gly Glu  Met Gly Lys Asp Tyr  Ile Tyr Ala Val Thr  Pro Leu Leu
    1160                 1165                 1170

Glu Asp  Ala Leu Met Asp Arg  Asp Leu Val His Arg  Gln Thr Ala
    1175                 1180                 1185

Ser Ala  Val Val Gln His Met  Ser Leu Gly Val Tyr  Gly Phe Gly
    1190                 1195                 1200

Cys Glu  Asp Ser Leu Asn His  Leu Leu Asn Tyr Val  Trp Pro Asn
    1205                 1210                 1215

Val Phe  Glu Thr Ser Pro His  Val Ile Gln Ala Val  Met Gly Ala
    1220                 1225                 1230

Leu Glu  Gly Leu Arg Val Ala  Ile Gly Pro Cys Arg  Met Leu Gln
    1235                 1240                 1245

Tyr Cys  Leu Gln Gly Leu Phe  His Pro Ala Arg Lys  Val Arg Asp
    1250                 1255                 1260

Val Tyr  Trp Lys Ile Tyr Asn  Ser Ile Tyr Ile Gly  Ser Gln Asp
    1265                 1270                 1275

Ala Leu  Ile Ala His Tyr Pro  Arg Ile Tyr Asn Asp  Asp Lys Asn
    1280                 1285                 1290

Thr Tyr  Ile Arg Tyr Glu Leu  Asp Tyr Ile Leu
    1295                 1300
```

<210> 2
<211> 309
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Arg Pro Asp Arg Ala Glu Ala Pro Gly Pro Pro Ala Met Ala Ala
1               5                  10                  15

Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser Thr Ser Ser
            20                  25                  30

Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg Leu Ser Leu
        35                  40                  45
```

```
Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr Ala Leu Ala
    50                  55                  60

Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu Glu Thr Gln
65                  70                  75                  80

Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly Arg Pro Gly
                85                  90                  95

Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Glu Leu Leu Thr Lys Leu Gly Arg Asp
            100                 105                 110

Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp Cys Gln Lys
        115                 120                 125

Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro Leu Gln Val
    130                 135                 140

Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu Ala Gly Ile
145                 150                 155                 160

Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg Phe Asp Ala
                165                 170                 175

Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile Gln Phe Val Gln Glu Met Ile
            180                 185                 190

Arg Gln Leu Glu Gln Thr Asn Tyr Arg Leu Lys Leu Cys Val Ser Asp
        195                 200                 205

Arg Asp Val Leu Pro Gly Thr Cys Val Trp Ser Ile Ala Ser Glu Leu
    210                 215                 220

Ile Glu Lys Arg Cys Arg Arg Met Val Val Val Val Ser Asp Asp Tyr
225                 230                 235                 240

Leu Gln Ser Lys Glu Cys Asp Phe Gln Thr Lys Phe Ala Leu Ser Leu
                245                 250                 255

Ser Pro Gly Ala His Gln Lys Arg Leu Ile Pro Ile Lys Tyr Lys Ala
            260                 265                 270

Met Lys Lys Glu Phe Pro Ser Ile Leu Arg Phe Ile Thr Val Cys Asp
        275                 280                 285

Tyr Thr Asn Pro Cys Thr Lys Ser Trp Phe Trp Thr Arg Leu Ala Lys
    290                 295                 300

Ala Leu Ser Leu Pro
305
```

<210> 3
<211> 393
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1               5                  10                  15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
            20                  25                  30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
        35                  40                  45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
    50                  55                  60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65                  70                  75                  80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
                85                  90                  95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
            100                 105                 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
        115                 120                 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
    130                 135                 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145                 150                 155                 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
                165                 170                 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
            180                 185                 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
        195                 200                 205
```

```
Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
    210                 215                 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225                 230                 235                 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
                245                 250                 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
            260                 265                 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
        275                 280                 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
    290                 295                 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305                 310                 315                 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
                325                 330                 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
            340                 345                 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
        355                 360                 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
    370                 375                 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385                 390
```

<210> 4
<211> 3056
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Met Ser Leu Val Leu Asn Asp Leu Leu Ile Cys Cys Arg Gln Leu Glu
1               5                   10                  15

His Asp Arg Ala Thr Glu Arg Lys Lys Glu Val Glu Lys Phe Lys Arg
            20                  25                  30
```

```
Leu Ile Arg Asp Pro Glu Thr Ile Lys His Leu Asp Arg His Ser Asp
        35                  40                  45

Ser Lys Gln Gly Lys Tyr Leu Asn Trp Asp Ala Val Phe Arg Phe Leu
    50                  55                  60

Gln Lys Tyr Ile Gln Lys Glu Thr Glu Cys Leu Arg Ile Ala Lys Pro
65                  70                  75                  80

Asn Val Ser Ala Ser Thr Gln Ala Ser Arg Gln Lys Lys Met Gln Glu
                85                  90                  95

Ile Ser Ser Leu Val Lys Tyr Phe Ile Lys Cys Ala Asn Arg Arg Ala
            100                 105                 110

Pro Arg Leu Lys Cys Gln Glu Leu Leu Asn Tyr Ile Met Asp Thr Val
        115                 120                 125

Lys Asp Ser Ser Asn Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Asp Cys Ser Asn Ile
    130                 135                 140

Leu Leu Lys Asp Ile Leu Ser Val Arg Lys Tyr Trp Cys Glu Ile Ser
145                 150                 155                 160

Gln Gln Gln Trp Leu Glu Leu Phe Ser Val Tyr Phe Arg Leu Tyr Leu
                165                 170                 175

Lys Pro Ser Gln Asp Val His Arg Val Leu Val Ala Arg Ile Ile His
            180                 185                 190

Ala Val Thr Lys Gly Cys Cys Ser Gln Thr Asp Gly Leu Asn Ser Lys
        195                 200                 205

Phe Leu Asp Phe Phe Ser Lys Ala Ile Gln Cys Ala Arg Gln Glu Lys
    210                 215                 220

Ser Ser Ser Gly Leu Asn His Ile Leu Ala Ala Leu Thr Ile Phe Leu
225                 230                 235                 240

Lys Thr Leu Ala Val Asn Phe Arg Ile Arg Val Cys Glu Leu Gly Asp
                245                 250                 255

Glu Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Ile Trp Thr Gln His Arg Leu Asn
            260                 265                 270

Asp Ser Leu Lys Glu Val Ile Ile Glu Leu Phe Gln Leu Gln Ile Tyr
        275                 280                 285
```

```
Ile His His Pro Lys Gly Ala Lys Thr Gln Glu Lys Gly Ala Tyr Glu
    290                 295                 300

Ser Thr Lys Trp Arg Ser Ile Leu Tyr Asn Leu Tyr Asp Leu Leu Val
305                 310                 315                 320

Asn Glu Ile Ser His Ile Gly Ser Arg Gly Lys Tyr Ser Ser Gly Phe
                325                 330                 335

Arg Asn Ile Ala Val Lys Glu Asn Leu Ile Glu Leu Met Ala Asp Ile
            340                 345                 350

Cys His Gln Val Phe Asn Glu Asp Thr Arg Ser Leu Glu Ile Ser Gln
        355                 360                 365

Ser Tyr Thr Thr Thr Gln Arg Glu Ser Ser Asp Tyr Ser Val Pro Cys
    370                 375                 380

Lys Arg Lys Lys Ile Glu Leu Gly Trp Glu Val Ile Lys Asp His Leu
385                 390                 395                 400

Gln Lys Ser Gln Asn Asp Phe Asp Leu Val Pro Trp Leu Gln Ile Ala
                405                 410                 415

Thr Gln Leu Ile Ser Lys Tyr Pro Ala Ser Leu Pro Asn Cys Glu Leu
            420                 425                 430

Ser Pro Leu Leu Met Ile Leu Ser Gln Leu Leu Pro Gln Gln Arg His
        435                 440                 445

Gly Glu Arg Thr Pro Tyr Val Leu Arg Cys Leu Thr Glu Val Ala Leu
    450                 455                 460

Cys Gln Asp Lys Arg Ser Asn Leu Glu Ser Ser Gln Lys Ser Asp Leu
465                 470                 475                 480

Leu Lys Leu Trp Asn Lys Ile Trp Cys Ile Thr Phe Arg Gly Ile Ser
                485                 490                 495

Ser Glu Gln Ile Gln Ala Glu Asn Phe Gly Leu Leu Gly Ala Ile Ile
            500                 505                 510

Gln Gly Ser Leu Val Glu Val Asp Arg Glu Phe Trp Lys Leu Phe Thr
        515                 520                 525

Gly Ser Ala Cys Arg Pro Ser Cys Pro Ala Val Cys Cys Leu Thr Leu
```

```
    530                 535                 540

Ala Leu Thr Thr Ser Ile Val Pro Gly Thr Val Lys Met Gly Ile Glu
545                 550                 555                 560

Gln Asn Met Cys Glu Val Asn Arg Ser Phe Ser Leu Lys Glu Ser Ile
                565                 570                 575

Met Lys Trp Leu Leu Phe Tyr Gln Leu Glu Gly Asp Leu Glu Asn Ser
            580                 585                 590

Thr Glu Val Pro Pro Ile Leu His Ser Asn Phe Pro His Leu Val Leu
        595                 600                 605

Glu Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Met Lys Asn Cys Lys Ala Ala Met
    610                 615                 620

Asn Phe Phe Gln Ser Val Pro Glu Cys Glu His His Gln Lys Asp Lys
625                 630                 635                 640

Glu Glu Leu Ser Phe Ser Glu Val Glu Glu Leu Phe Leu Gln Thr Thr
                645                 650                 655

Phe Asp Lys Met Asp Phe Leu Thr Ile Val Arg Glu Cys Gly Ile Glu
            660                 665                 670

Lys His Gln Ser Ser Ile Gly Phe Ser Val His Gln Asn Leu Lys Glu
        675                 680                 685

Ser Leu Asp Arg Cys Leu Leu Gly Leu Ser Glu Gln Leu Leu Asn Asn
    690                 695                 700

Tyr Ser Ser Glu Ile Thr Asn Ser Glu Thr Leu Val Arg Cys Ser Arg
705                 710                 715                 720

Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Cys Tyr Cys Tyr Met Gly Val Ile Ala
                725                 730                 735

Glu Glu Glu Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Phe Gln Lys Ala Lys Ser Leu
            740                 745                 750

Met Gln Cys Ala Gly Glu Ser Ile Thr Leu Phe Lys Asn Lys Thr Asn
        755                 760                 765

Glu Glu Phe Arg Ile Gly Ser Leu Arg Asn Met Met Gln Leu Cys Thr
    770                 775                 780
```

```
Arg Cys Leu Ser Asn Cys Thr Lys Lys Ser Pro Asn Lys Ile Ala Ser
785                 790                 795                 800

Gly Phe Phe Leu Arg Leu Leu Thr Ser Lys Leu Met Asn Asp Ile Ala
                805                 810                 815

Asp Ile Cys Lys Ser Leu Ala Ser Phe Ile Lys Lys Pro Phe Asp Arg
            820                 825                 830

Gly Glu Val Glu Ser Met Glu Asp Asp Thr Asn Gly Asn Leu Met Glu
        835                 840                 845

Val Glu Asp Gln Ser Ser Met Asn Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Asp Ser
    850                 855                 860

Ser Val Ser Asp Ala Asn Glu Pro Gly Glu Ser Gln Ser Thr Ile Gly
865                 870                 875                 880

Ala Ile Asn Pro Leu Ala Glu Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Asp Leu Leu
                885                 890                 895

Phe Leu Asp Met Leu Lys Phe Leu Cys Leu Cys Val Thr Thr Ala Gln
            900                 905                 910

Thr Asn Thr Val Ser Phe Arg Ala Ala Asp Ile Arg Arg Lys Leu Leu
        915                 920                 925

Met Leu Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Pro Thr Lys Ser Leu His Leu
    930                 935                 940

His Met Tyr Leu Met Leu Leu Lys Glu Leu Pro Gly Glu Glu Tyr Pro
945                 950                 955                 960

Leu Pro Met Glu Asp Val Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Ser Asn Val
                965                 970                 975

Cys Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Gln Asp Val Cys Lys Thr Ile Leu Asn
            980                 985                 990

His Val Leu His Val Val Lys Asn  Leu Gly Gln Ser Asn  Met Asp Ser
        995                 1000                1005

Glu Asn  Thr Arg Asp Ala Gln  Gly Gln Phe Leu Thr  Val Ile Gly
    1010                1015                1020

Ala Phe  Trp His Leu Thr Lys  Glu Arg Lys Tyr Ile  Phe Ser Val
    1025                1030                1035
```

```
Arg Met  Ala Leu Val Asn Cys  Leu Lys Thr Leu Leu  Glu Ala Asp
    1040                1045                1050

Pro Tyr  Ser Lys Trp Ala Ile  Leu Asn Val Met Gly  Lys Asp Phe
    1055                1060                1065

Pro Val  Asn Glu Val Phe Thr  Gln Phe Leu Ala Asp  Asn His His
    1070                1075                1080

Gln Val  Arg Met Leu Ala Ala  Glu Ser Ile Asn Arg  Leu Phe Gln
    1085                1090                1095

Asp Thr  Lys Gly Asp Ser Ser  Arg Leu Leu Lys Ala  Leu Pro Leu
    1100                1105                1110

Lys Leu  Gln Gln Thr Ala Phe  Glu Asn Ala Tyr Leu  Lys Ala Gln
    1115                1120                1125

Glu Gly  Met Arg Glu Met Ser  His Ser Ala Glu Asn  Pro Glu Thr
    1130                1135                1140

Leu Asp  Glu Ile Tyr Asn Arg  Lys Ser Val Leu Leu  Thr Leu Ile
    1145                1150                1155

Ala Val  Val Leu Ser Cys Ser  Pro Ile Cys Glu Lys  Gln Ala Leu
    1160                1165                1170

Phe Ala  Leu Cys Lys Ser Val  Lys Glu Asn Gly Leu  Glu Pro His
    1175                1180                1185

Leu Val  Lys Lys Val Leu Glu  Lys Val Ser Glu Thr  Phe Gly Tyr
    1190                1195                1200

Arg Arg  Leu Glu Asp Phe Met  Ala Ser His Leu Asp  Tyr Leu Val
    1205                1210                1215

Leu Glu  Trp Leu Asn Leu Gln  Asp Thr Glu Tyr Asn  Leu Ser Ser
    1220                1225                1230

Phe Pro  Phe Ile Leu Leu Asn  Tyr Thr Asn Ile Glu  Asp Phe Tyr
    1235                1240                1245

Arg Ser  Cys Tyr Lys Val Leu  Ile Pro His Leu Val  Ile Arg Ser
    1250                1255                1260

His Phe  Asp Glu Val Lys Ser  Ile Ala Asn Gln Ile  Gln Glu Asp
    1265                1270                1275
```

```
Trp Lys  Ser Leu Leu Thr Asp  Cys Phe Pro Lys Ile  Leu Val Asn
    1280                1285                1290

Ile Leu  Pro Tyr Phe Ala Tyr  Glu Gly Thr Arg Asp  Ser Gly Met
    1295                1300                1305

Ala Gln  Gln Arg Glu Thr Ala  Thr Lys Val Tyr Asp  Met Leu Lys
    1310                1315                1320

Ser Glu  Asn Leu Leu Gly Lys  Gln Ile Asp His Leu  Phe Ile Ser
    1325                1330                1335

Asn Leu  Pro Glu Ile Val Val  Glu Leu Leu Met Thr  Leu His Glu
    1340                1345                1350

Pro Ala  Asn Ser Ser Ala Ser  Gln Ser Thr Asp Leu  Cys Asp Phe
    1355                1360                1365

Ser Gly  Asp Leu Asp Pro Ala  Pro Asn Pro Pro His  Phe Pro Ser
    1370                1375                1380

His Val  Ile Lys Ala Thr Phe  Ala Tyr Ile Ser Asn  Cys His Lys
    1385                1390                1395

Thr Lys  Leu Lys Ser Ile Leu  Glu Ile Leu Ser Lys  Ser Pro Asp
    1400                1405                1410

Ser Tyr  Gln Lys Ile Leu Leu  Ala Ile Cys Glu Gln  Ala Ala Glu
    1415                1420                1425

Thr Asn  Asn Val Tyr Lys Lys  His Arg Ile Leu Lys  Ile Tyr His
    1430                1435                1440

Leu Phe  Val Ser Leu Leu Leu  Lys Asp Ile Lys Ser  Gly Leu Gly
    1445                1450                1455

Gly Ala  Trp Ala Phe Val Leu  Arg Asp Val Ile Tyr  Thr Leu Ile
    1460                1465                1470

His Tyr  Ile Asn Gln Arg Pro  Ser Cys Ile Met Asp  Val Ser Leu
    1475                1480                1485

Arg Ser  Phe Ser Leu Cys Cys  Asp Leu Leu Ser Gln  Val Cys Gln
    1490                1495                1500

Thr Ala  Val Thr Tyr Cys Lys  Asp Ala Leu Glu Asn  His Leu His
```

```
    1505                1510                1515

Val Ile  Val Gly Thr Leu Ile  Pro Leu Val Tyr Glu  Gln Val Glu
    1520                1525                1530

Val Gln  Lys Gln Val Leu Asp  Leu Leu Lys Tyr Leu  Val Ile Asp
    1535                1540                1545

Asn Lys  Asp Asn Glu Asn Leu  Tyr Ile Thr Ile Lys  Leu Leu Asp
    1550                1555                1560

Pro Phe  Pro Asp His Val Val  Phe Lys Asp Leu Arg  Ile Thr Gln
    1565                1570                1575

Gln Lys  Ile Lys Tyr Ser Arg  Gly Pro Phe Ser Leu  Leu Glu Glu
    1580                1585                1590

Ile Asn  His Phe Leu Ser Val  Ser Val Tyr Asp Ala  Leu Pro Leu
    1595                1600                1605

Thr Arg  Leu Glu Gly Leu Lys  Asp Leu Arg Arg Gln  Leu Glu Leu
    1610                1615                1620

His Lys  Asp Gln Met Val Asp  Ile Met Arg Ala Ser  Gln Asp Asn
    1625                1630                1635

Pro Gln  Asp Gly Ile Met Val  Lys Leu Val Val Asn  Leu Leu Gln
    1640                1645                1650

Leu Ser  Lys Met Ala Ile Asn  His Thr Gly Glu Lys  Glu Val Leu
    1655                1660                1665

Glu Ala  Val Gly Ser Cys Leu  Gly Glu Val Gly Pro  Ile Asp Phe
    1670                1675                1680

Ser Thr  Ile Ala Ile Gln His  Ser Lys Asp Ala Ser  Tyr Thr Lys
    1685                1690                1695

Ala Leu  Lys Leu Phe Glu Asp  Lys Glu Leu Gln Trp  Thr Phe Ile
    1700                1705                1710

Met Leu  Thr Tyr Leu Asn Asn  Thr Leu Val Glu Asp  Cys Val Lys
    1715                1720                1725

Val Arg  Ser Ala Ala Val Thr  Cys Leu Lys Asn Ile  Leu Ala Thr
    1730                1735                1740
```

```
Lys Thr  Gly His Ser Phe Trp  Glu Ile Tyr Lys Met  Thr Thr Asp
    1745                1750                1755

Pro Met  Leu Ala Tyr Leu Gln  Pro Phe Arg Thr Ser  Arg Lys Lys
    1760                1765                1770

Phe Leu  Glu Val Pro Arg Phe  Asp Lys Glu Asn Pro  Phe Glu Gly
    1775                1780                1785

Leu Asp  Asp Ile Asn Leu Trp  Ile Pro Leu Ser Glu  Asn His Asp
    1790                1795                1800

Ile Trp  Ile Lys Thr Leu Thr  Cys Ala Phe Leu Asp  Ser Gly Gly
    1805                1810                1815

Thr Lys  Cys Glu Ile Leu Gln  Leu Leu Lys Pro Met  Cys Glu Val
    1820                1825                1830

Lys Thr  Asp Phe Cys Gln Thr  Val Leu Pro Tyr Leu  Ile His Asp
    1835                1840                1845

Ile Leu  Leu Gln Asp Thr Asn  Glu Ser Trp Arg Asn  Leu Leu Ser
    1850                1855                1860

Thr His  Val Gln Gly Phe Phe  Thr Ser Cys Leu Arg  His Phe Ser
    1865                1870                1875

Gln Thr  Ser Arg Ser Thr Thr  Pro Ala Asn Leu Asp  Ser Glu Ser
    1880                1885                1890

Glu His  Phe Phe Arg Cys Cys  Leu Asp Lys Lys Ser  Gln Arg Thr
    1895                1900                1905

Met Leu  Ala Val Val Asp Tyr  Met Arg Arg Gln Lys  Arg Pro Ser
    1910                1915                1920

Ser Gly  Thr Ile Phe Asn Asp  Ala Phe Trp Leu Asp  Leu Asn Tyr
    1925                1930                1935

Leu Glu  Val Ala Lys Val Ala  Gln Ser Cys Ala Ala  His Phe Thr
    1940                1945                1950

Ala Leu  Leu Tyr Ala Glu Ile  Tyr Ala Asp Lys Lys  Ser Met Asp
    1955                1960                1965

Asp Gln  Glu Lys Arg Ser Leu  Ala Phe Glu Glu Gly  Ser Gln Ser
    1970                1975                1980
```

```
Thr Thr  Ile Ser Ser Leu Ser  Glu Lys Ser Lys Glu  Glu Thr Gly
    1985                 1990                 1995

Ile Ser  Leu Gln Asp Leu Leu  Leu Glu Ile Tyr Arg  Ser Ile Gly
    2000                 2005                 2010

Glu Pro  Asp Ser Leu Tyr Gly  Cys Gly Gly Gly Lys  Met Leu Gln
    2015                 2020                 2025

Pro Ile  Thr Arg Leu Arg Thr  Tyr Glu His Glu Ala  Met Trp Gly
    2030                 2035                 2040

Lys Ala  Leu Val Thr Tyr Asp  Leu Glu Thr Ala Ile  Pro Ser Ser
    2045                 2050                 2055

Thr Arg  Gln Ala Gly Ile Ile  Gln Ala Leu Gln Asn  Leu Gly Leu
    2060                 2065                 2070

Cys His  Ile Leu Ser Val Tyr  Leu Lys Gly Leu Asp  Tyr Glu Asn
    2075                 2080                 2085

Lys Asp  Trp Cys Pro Glu Leu  Glu Glu Leu His Tyr  Gln Ala Ala
    2090                 2095                 2100

Trp Arg  Asn Met Gln Trp Asp  His Cys Thr Ser Val  Ser Lys Glu
    2105                 2110                 2115

Val Glu  Gly Thr Ser Tyr His  Glu Ser Leu Tyr Asn  Ala Leu Gln
    2120                 2125                 2130

Ser Leu  Arg Asp Arg Glu Phe  Ser Thr Phe Tyr Glu  Ser Leu Lys
    2135                 2140                 2145

Tyr Ala  Arg Val Lys Glu Val  Glu Glu Met Cys Lys  Arg Ser Leu
    2150                 2155                 2160

Glu Ser  Val Tyr Ser Leu Tyr  Pro Thr Leu Ser Arg  Leu Gln Ala
    2165                 2170                 2175

Ile Gly  Glu Leu Glu Ser Ile  Gly Glu Leu Phe Ser  Arg Ser Val
    2180                 2185                 2190

Thr His  Arg Gln Leu Ser Glu  Val Tyr Ile Lys Trp  Gln Lys His
    2195                 2200                 2205

Ser Gln  Leu Leu Lys Asp Ser  Asp Phe Ser Phe Gln  Glu Pro Ile
    2210                 2215                 2220
```

```
Met Ala  Leu Arg Thr Val Ile  Leu Glu Ile Leu Met  Glu Lys Glu
    2225                 2230                 2235

Met Asp  Asn Ser Gln Arg Glu  Cys Ile Lys Asp Ile  Leu Thr Lys
    2240                 2245                 2250

His Leu  Val Glu Leu Ser Ile  Leu Ala Arg Thr Phe  Lys Asn Thr
    2255                 2260                 2265

Gln Leu  Pro Glu Arg Ala Ile  Phe Gln Ile Lys Gln  Tyr Asn Ser
    2270                 2275                 2280

Val Ser  Cys Gly Val Ser Glu  Trp Gln Leu Glu Glu  Ala Gln Val
    2285                 2290                 2295

Phe Trp  Ala Lys Lys Glu Gln  Ser Leu Ala Leu Ser  Ile Leu Lys
    2300                 2305                 2310

Gln Met  Ile Lys Lys Leu Asp  Ala Ser Cys Ala Ala  Asn Asn Pro
    2315                 2320                 2325

Ser Leu  Lys Leu Thr Tyr Thr  Glu Cys Leu Arg Val  Cys Gly Asn
    2330                 2335                 2340

Trp Leu  Ala Glu Thr Cys Leu  Glu Asn Pro Ala Val  Ile Met Gln
    2345                 2350                 2355

Thr Tyr  Leu Glu Lys Ala Val  Glu Val Ala Gly Asn  Tyr Asp Gly
    2360                 2365                 2370

Glu Ser  Ser Asp Glu Leu Arg  Asn Gly Lys Met Lys  Ala Phe Leu
    2375                 2380                 2385

Ser Leu  Ala Arg Phe Ser Asp  Thr Gln Tyr Gln Arg  Ile Glu Asn
    2390                 2395                 2400

Tyr Met  Lys Ser Ser Glu Phe  Glu Asn Lys Gln Ala  Leu Leu Lys
    2405                 2410                 2415

Arg Ala  Lys Glu Glu Val Gly  Leu Leu Arg Glu His  Lys Ile Gln
    2420                 2425                 2430

Thr Asn  Arg Tyr Thr Val Lys  Val Gln Arg Glu Leu  Glu Leu Asp
    2435                 2440                 2445

Glu Leu  Ala Leu Arg Ala Leu  Lys Glu Asp Arg Lys  Arg Phe Leu
```

```
    2450                2455                2460

Cys Lys  Ala Val Glu Asn Tyr  Ile Asn Cys Leu Leu  Ser Gly Glu
    2465                2470                2475

Glu His  Asp Met Trp Val Phe  Arg Leu Cys Ser Leu  Trp Leu Glu
    2480                2485                2490

Asn Ser  Gly Val Ser Glu Val  Asn Gly Met Met Lys  Arg Asp Gly
    2495                2500                2505

Met Lys  Ile Pro Thr Tyr Lys  Phe Leu Pro Leu Met  Tyr Gln Leu
    2510                2515                2520

Ala Ala  Arg Met Gly Thr Lys  Met Met Gly Gly Leu  Gly Phe His
    2525                2530                2535

Glu Val  Leu Asn Asn Leu Ile  Ser Arg Ile Ser Met  Asp His Pro
    2540                2545                2550

His His  Thr Leu Phe Ile Ile  Leu Ala Leu Ala Asn  Ala Asn Arg
    2555                2560                2565

Asp Glu  Phe Leu Thr Lys Pro  Glu Val Ala Arg Arg  Ser Arg Ile
    2570                2575                2580

Thr Lys  Asn Val Pro Lys Gln  Ser Ser Gln Leu Asp  Glu Asp Arg
    2585                2590                2595

Thr Glu  Ala Ala Asn Arg Ile  Ile Cys Thr Ile Arg  Ser Arg Arg
    2600                2605                2610

Pro Gln  Met Val Arg Ser Val  Glu Ala Leu Cys Asp  Ala Tyr Ile
    2615                2620                2625

Ile Leu  Ala Asn Leu Asp Ala  Thr Gln Trp Lys Thr  Gln Arg Lys
    2630                2635                2640

Gly Ile  Asn Ile Pro Ala Asp  Gln Pro Ile Thr Lys  Leu Lys Asn
    2645                2650                2655

Leu Glu  Asp Val Val Val Pro  Thr Met Glu Ile Lys  Val Asp His
    2660                2665                2670

Thr Gly  Glu Tyr Gly Asn Leu  Val Thr Ile Gln Ser  Phe Lys Ala
    2675                2680                2685
```

```
Glu Phe  Arg Leu Ala Gly Gly  Val Asn Leu Pro Lys  Ile Ile Asp
    2690                 2695                 2700

Cys Val  Gly Ser Asp Gly Lys  Glu Arg Arg Gln Leu  Val Lys Gly
    2705                 2710                 2715

Arg Asp  Asp Leu Arg Gln Asp  Ala Val Met Gln Gln  Val Phe Gln
    2720                 2725                 2730

Met Cys  Asn Thr Leu Leu Gln  Arg Asn Thr Glu Thr  Arg Lys Arg
    2735                 2740                 2745

Lys Leu  Thr Ile Cys Thr Tyr  Lys Val Val Pro Leu  Ser Gln Arg
    2750                 2755                 2760

Ser Gly  Val Leu Glu Trp Cys  Thr Gly Thr Val Pro  Ile Gly Glu
    2765                 2770                 2775

Phe Leu  Val Asn Asn Glu Asp  Gly Ala His Lys Arg  Tyr Arg Pro
    2780                 2785                 2790

Asn Asp  Phe Ser Ala Phe Gln  Cys Gln Lys Lys Met  Met Glu Val
    2795                 2800                 2805

Gln Lys  Lys Ser Phe Glu Glu  Lys Tyr Glu Val Phe  Met Asp Val
    2810                 2815                 2820

Cys Gln  Asn Phe Gln Pro Val  Phe Arg Tyr Phe Cys  Met Glu Lys
    2825                 2830                 2835

Phe Leu  Asp Pro Ala Ile Trp  Phe Glu Lys Arg Leu  Ala Tyr Thr
    2840                 2845                 2850

Arg Ser  Val Ala Thr Ser Ser  Ile Val Gly Tyr Ile  Leu Gly Leu
    2855                 2860                 2865

Gly Asp  Arg His Val Gln Asn  Ile Leu Ile Asn Glu  Gln Ser Ala
    2870                 2875                 2880

Glu Leu  Val His Ile Asp Leu  Gly Val Ala Phe Glu  Gln Gly Lys
    2885                 2890                 2895

Ile Leu  Pro Thr Pro Glu Thr  Val Pro Phe Arg Leu  Thr Arg Asp
    2900                 2905                 2910

Ile Val  Asp Gly Met Gly Ile  Thr Gly Val Glu Gly  Val Phe Arg
    2915                 2920                 2925
```

```
Arg Cys  Cys Glu Lys Thr Met  Glu Val Met Arg Asn  Ser Gln Glu
    2930                 2935                 2940

Thr Leu  Leu Thr Ile Val Glu  Val Leu Leu Tyr Asp  Pro Leu Phe
    2945                 2950                 2955

Asp Trp  Thr Met Asn Pro Leu  Lys Ala Leu Tyr Leu  Gln Gln Arg
    2960                 2965                 2970

Pro Glu  Asp Glu Thr Glu Leu  His Pro Thr Leu Asn  Ala Asp Asp
    2975                 2980                 2985

Gln Glu  Cys Lys Arg Asn Leu  Ser Asp Ile Asp Gln  Ser Phe Asn
    2990                 2995                 3000

Lys Val  Ala Glu Arg Val Leu  Met Arg Leu Gln Glu  Lys Leu Lys
    3005                 3010                 3015

Gly Val  Glu Glu Gly Thr Val  Leu Ser Val Gly Gly  Gln Val Asn
    3020                 3025                 3030

Leu Leu  Ile Gln Gln Ala Ile  Asp Pro Lys Asn Leu  Ser Arg Leu
    3035                 3040                 3045

Phe Pro  Gly Trp Lys Ala Trp  Val
    3050                 3055
```

<210> 5
<211> 1130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Met Leu Glu Ile Cys Leu Lys Leu Val Gly Cys Lys Ser Lys Lys Gly
1               5                  10                  15

Leu Ser Ser Ser Ser Ser Cys Tyr Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Pro
            20                  25                  30

Val Ala Ser Asp Phe Glu Pro Gln Gly Leu Ser Glu Ala Ala Arg Trp
        35                  40                  45

Asn Ser Lys Glu Asn Leu Leu Ala Gly Pro Ser Glu Asn Asp Pro Asn
    50                  55                  60

Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Phe Val Ala Ser Gly Asp Asn Thr Leu
65                  70                  75                  80
```

```
Ser Ile Thr Lys Gly Glu Lys Leu Arg Val Leu Gly Tyr Asn His Asn
                85                  90                  95

Gly Glu Trp Cys Glu Ala Gln Thr Lys Asn Gly Gln Gly Trp Val Pro
            100                 105                 110

Ser Asn Tyr Ile Thr Pro Val Asn Ser Leu Glu Lys His Ser Trp Tyr
        115                 120                 125

His Gly Pro Val Ser Arg Asn Ala Ala Glu Tyr Leu Leu Ser Ser Gly
    130                 135                 140

Ile Asn Gly Ser Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu Ser Ser Pro Gly Gln
145                 150                 155                 160

Arg Ser Ile Ser Leu Arg Tyr Glu Gly Arg Val Tyr His Tyr Arg Ile
                165                 170                 175

Asn Thr Ala Ser Asp Gly Lys Leu Tyr Val Ser Ser Glu Ser Arg Phe
            180                 185                 190

Asn Thr Leu Ala Glu Leu Val His His His Ser Thr Val Ala Asp Gly
        195                 200                 205

Leu Ile Thr Thr Leu His Tyr Pro Ala Pro Lys Arg Asn Lys Pro Thr
    210                 215                 220

Val Tyr Gly Val Ser Pro Asn Tyr Asp Lys Trp Glu Met Glu Arg Thr
225                 230                 235                 240

Asp Ile Thr Met Lys His Lys Leu Gly Gly Gly Gln Tyr Gly Glu Val
                245                 250                 255

Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys Tyr Ser Leu Thr Val Ala Val Lys Thr
            260                 265                 270

Leu Lys Glu Asp Thr Met Glu Val Glu Glu Phe Leu Lys Glu Ala Ala
        275                 280                 285

Val Met Lys Glu Ile Lys His Pro Asn Leu Val Gln Leu Leu Gly Val
    290                 295                 300

Cys Thr Arg Glu Pro Pro Phe Tyr Ile Ile Thr Glu Phe Met Thr Tyr
305                 310                 315                 320

Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu Arg Glu Cys Asn Arg Gln Glu Val Asn
                325                 330                 335
```

```
Ala Val Val Leu Leu Tyr Met Ala Thr Gln Ile Ser Ser Ala Met Glu
            340                 345                 350

Tyr Leu Glu Lys Lys Asn Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
        355                 360                 365

Cys Leu Val Gly Glu Asn His Leu Val Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu
    370                 375                 380

Ser Arg Leu Met Thr Gly Asp Thr Tyr Thr Ala His Ala Gly Ala Lys
385                 390                 395                 400

Phe Pro Ile Lys Trp Thr Ala Pro Glu Ser Leu Ala Tyr Asn Lys Phe
                405                 410                 415

Ser Ile Lys Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
            420                 425                 430

Ala Thr Tyr Gly Met Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Asp Leu Ser Gln Val
        435                 440                 445

Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Asp Tyr Arg Met Glu Arg Pro Glu Gly Cys
    450                 455                 460

Pro Glu Lys Val Tyr Glu Leu Met Arg Ala Cys Trp Gln Trp Asn Pro
465                 470                 475                 480

Ser Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Ile His Gln Ala Phe Glu Thr Met
                485                 490                 495

Phe Gln Glu Ser Ser Ile Ser Asp Glu Val Glu Lys Glu Leu Gly Lys
            500                 505                 510

Gln Gly Val Arg Gly Ala Val Ser Thr Leu Leu Gln Ala Pro Glu Leu
        515                 520                 525

Pro Thr Lys Thr Arg Thr Ser Arg Arg Ala Ala Glu His Arg Asp Thr
    530                 535                 540

Thr Asp Val Pro Glu Met Pro His Ser Lys Gly Gln Gly Glu Ser Asp
545                 550                 555                 560

Pro Leu Asp His Glu Pro Ala Val Ser Pro Leu Leu Pro Arg Lys Glu
                565                 570                 575

Arg Gly Pro Pro Glu Gly Gly Leu Asn Glu Asp Glu Arg Leu Leu Pro
```

```
            580                 585                 590

Lys Asp Lys Lys Thr Asn Leu Phe Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys
        595                 600                 605

Lys Thr Ala Pro Thr Pro Pro Lys Arg Ser Ser Ser Phe Arg Glu Met
    610                 615                 620

Asp Gly Gln Pro Glu Arg Arg Gly Ala Gly Glu Glu Glu Gly Arg Asp
625                 630                 635                 640

Ile Ser Asn Gly Ala Leu Ala Phe Thr Pro Leu Asp Thr Ala Asp Pro
                645                 650                 655

Ala Lys Ser Pro Lys Pro Ser Asn Gly Ala Gly Val Pro Asn Gly Ala
            660                 665                 670

Leu Arg Glu Ser Gly Gly Ser Gly Phe Arg Ser Pro His Leu Trp Lys
        675                 680                 685

Lys Ser Ser Thr Leu Thr Ser Ser Arg Leu Ala Thr Gly Glu Glu Glu
    690                 695                 700

Gly Gly Gly Ser Ser Ser Lys Arg Phe Leu Arg Ser Cys Ser Ala Ser
705                 710                 715                 720

Cys Val Pro His Gly Ala Lys Asp Thr Glu Trp Arg Ser Val Thr Leu
                725                 730                 735

Pro Arg Asp Leu Gln Ser Thr Gly Arg Gln Phe Asp Ser Ser Thr Phe
            740                 745                 750

Gly Gly His Lys Ser Glu Lys Pro Ala Leu Pro Arg Lys Arg Ala Gly
        755                 760                 765

Glu Asn Arg Ser Asp Gln Val Thr Arg Gly Thr Val Thr Pro Pro Pro
    770                 775                 780

Arg Leu Val Lys Lys Asn Glu Glu Ala Ala Asp Glu Val Phe Lys Asp
785                 790                 795                 800

Ile Met Glu Ser Ser Pro Gly Ser Ser Pro Pro Asn Leu Thr Pro Lys
                805                 810                 815

Pro Leu Arg Arg Gln Val Thr Val Ala Pro Ala Ser Gly Leu Pro His
            820                 825                 830
```

```
Lys Glu Glu Ala Gly Lys Gly Ser Ala Leu Gly Thr Pro Ala Ala Ala
        835                 840                 845

Glu Pro Val Thr Pro Thr Ser Lys Ala Gly Ser Gly Ala Pro Gly Gly
    850                 855                 860

Thr Ser Lys Gly Pro Ala Glu Glu Ser Arg Val Arg Arg His Lys His
865                 870                 875                 880

Ser Ser Glu Ser Pro Gly Arg Asp Lys Gly Lys Leu Ser Arg Leu Lys
                885                 890                 895

Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ser Ala Gly Lys Ala Gly Gly
            900                 905                 910

Lys Pro Ser Gln Ser Pro Ser Gln Glu Ala Ala Gly Glu Ala Val Leu
        915                 920                 925

Gly Ala Lys Thr Lys Ala Thr Ser Leu Val Asp Ala Val Asn Ser Asp
    930                 935                 940

Ala Ala Lys Pro Ser Gln Pro Gly Glu Gly Leu Lys Lys Pro Val Leu
945                 950                 955                 960

Pro Ala Thr Pro Lys Pro Gln Ser Ala Lys Pro Ser Gly Thr Pro Ile
                965                 970                 975

Ser Pro Ala Pro Val Pro Ser Thr Leu Pro Ser Ala Ser Ser Ala Leu
            980                 985                 990

Ala Gly Asp Gln Pro Ser Ser Thr  Ala Phe Ile Pro Leu  Ile Ser Thr
        995                 1000                1005

Arg Val  Ser Leu Arg Lys Thr  Arg Gln Pro Pro Glu  Arg Ile Ala
    1010                1015                1020

Ser Gly  Ala Ile Thr Lys Gly  Val Val Leu Asp Ser  Thr Glu Ala
    1025                1030                1035

Leu Cys  Leu Ala Ile Ser Arg  Asn Ser Glu Gln Met  Ala Ser His
    1040                1045                1050

Ser Ala  Val Leu Glu Ala Gly  Lys Asn Leu Tyr Thr  Phe Cys Val
    1055                1060                1065

Ser Tyr  Val Asp Ser Ile Gln  Gln Met Arg Asn Lys  Phe Ala Phe
    1070                1075                1080
```

```
Arg Glu  Ala Ile Asn Lys Leu  Glu Asn Asn Leu Arg  Glu Leu Gln
    1085                1090                1095

Ile Cys  Pro Ala Thr Ala Gly  Ser Gly Pro Ala Ala  Thr Gln Asp
    1100                1105                1110

Phe Ser  Lys Leu Leu Ser Ser  Val Lys Glu Ile Ser  Asp Ile Val
    1115                1120                1125

Gln Arg
    1130
```

<210> 6
<211> 707
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Asn Gln Glu Leu Leu Ser Val Gly Ser Lys Arg Arg Arg Thr Gly
1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Arg Gly Asn Pro Ser Ser Ser Gln Val Asp Glu Glu Gln
            20                  25                  30

Met Asn Arg Val Val Glu Glu Glu Gln Gln Gln Gln Leu Arg Gln Gln
        35                  40                  45

Glu Glu Glu His Thr Ala Arg Asn Gly Glu Val Val Gly Val Glu Pro
    50                  55                  60

Arg Pro Gly Gly Gln Asn Asp Ser Gln Gln Gly Gln Leu Glu Glu Asn
65                  70                  75                  80

Asn Asn Arg Phe Ile Ser Val Asp Glu Asp Ser Ser Gly Asn Gln Glu
                85                  90                  95

Glu Gln Glu Glu Asp Glu Glu His Ala Gly Glu Gln Asp Glu Glu Asp
            100                 105                 110

Glu Glu Glu Glu Glu Met Asp Gln Glu Ser Asp Asp Phe Asp Gln Ser
        115                 120                 125

Asp Asp Ser Ser Arg Glu Asp Glu His Thr His Thr Asn Ser Val Thr
    130                 135                 140

Asn Ser Ser Ser Ile Val Asp Leu Pro Val His Gln Leu Ser Ser Pro
145                 150                 155                 160
```

```
Phe Tyr Thr Lys Thr Thr Lys Met Lys Arg Lys Leu Asp His Gly Ser
                165                 170                 175

Glu Val Arg Ser Phe Ser Leu Gly Lys Lys Pro Cys Lys Val Ser Glu
            180                 185                 190

Tyr Thr Ser Thr Thr Gly Leu Val Pro Cys Ser Ala Thr Pro Thr Thr
        195                 200                 205

Phe Gly Asp Leu Arg Ala Ala Asn Gly Gln Gly Gln Gln Arg Arg Arg
    210                 215                 220

Ile Thr Ser Val Gln Pro Pro Thr Gly Leu Gln Glu Trp Leu Lys Met
225                 230                 235                 240

Phe Gln Ser Trp Ser Gly Pro Glu Lys Leu Leu Ala Leu Asp Glu Leu
                245                 250                 255

Ile Asp Ser Cys Glu Pro Thr Gln Val Lys His Met Met Gln Val Ile
            260                 265                 270

Glu Pro Gln Phe Gln Arg Asp Phe Ile Ser Leu Leu Pro Lys Glu Leu
        275                 280                 285

Ala Leu Tyr Val Leu Ser Phe Leu Glu Pro Lys Asp Leu Leu Gln Ala
    290                 295                 300

Ala Gln Thr Cys Arg Tyr Trp Arg Ile Leu Ala Glu Asp Asn Leu Leu
305                 310                 315                 320

Trp Arg Glu Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ile Asp Glu Pro Leu His Ile
                325                 330                 335

Lys Arg Arg Lys Val Ile Lys Pro Gly Phe Ile His Ser Pro Trp Lys
            340                 345                 350

Ser Ala Tyr Ile Arg Gln His Arg Ile Asp Thr Asn Trp Arg Arg Gly
        355                 360                 365

Glu Leu Lys Ser Pro Lys Val Leu Lys Gly His Asp Asp His Val Ile
    370                 375                 380

Thr Cys Leu Gln Phe Cys Gly Asn Arg Ile Val Ser Gly Ser Asp Asp
385                 390                 395                 400

Asn Thr Leu Lys Val Trp Ser Ala Val Thr Gly Lys Cys Leu Arg Thr
                405                 410                 415
```

```
Leu Val Gly His Thr Gly Gly Val Trp Ser Ser Gln Met Arg Asp Asn
            420                 425                 430

Ile Ile Ile Ser Gly Ser Thr Asp Arg Thr Leu Lys Val Trp Asn Ala
        435                 440                 445

Glu Thr Gly Glu Cys Ile His Thr Leu Tyr Gly His Thr Ser Thr Val
    450                 455                 460

Arg Cys Met His Leu His Glu Lys Arg Val Val Ser Gly Ser Arg Asp
465                 470                 475                 480

Ala Thr Leu Arg Val Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Cys Leu His Val
                485                 490                 495

Leu Met Gly His Val Ala Ala Val Arg Cys Val Gln Tyr Asp Gly Arg
            500                 505                 510

Arg Val Val Ser Gly Ala Tyr Asp Phe Met Val Lys Val Trp Asp Pro
        515                 520                 525

Glu Thr Glu Thr Cys Leu His Thr Leu Gln Gly His Thr Asn Arg Val
    530                 535                 540

Tyr Ser Leu Gln Phe Asp Gly Ile His Val Val Ser Gly Ser Leu Asp
545                 550                 555                 560

Thr Ser Ile Arg Val Trp Asp Val Glu Thr Gly Asn Cys Ile His Thr
                565                 570                 575

Leu Thr Gly His Gln Ser Leu Thr Ser Gly Met Glu Leu Lys Asp Asn
            580                 585                 590

Ile Leu Val Ser Gly Asn Ala Asp Ser Thr Val Lys Ile Trp Asp Ile
        595                 600                 605

Lys Thr Gly Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln Gly Pro Asn Lys His Gln
    610                 615                 620

Ser Ala Val Thr Cys Leu Gln Phe Asn Lys Asn Phe Val Ile Thr Ser
625                 630                 635                 640

Ser Asp Asp Gly Thr Val Lys Leu Trp Asp Leu Lys Thr Gly Glu Phe
                645                 650                 655

Ile Arg Asn Leu Val Thr Leu Glu Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Val
```

660 665 670

Trp Arg Ile Arg Ala Ser Asn Thr Lys Leu Val Cys Ala Val Gly Ser
675 680 685

Arg Asn Gly Thr Glu Glu Thr Lys Leu Leu Val Leu Asp Phe Asp Val
690 695 700

Asp Met Lys
705

<210> 7
<211> 662
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Met Ser His Val Ala Val Glu Asn Ala Leu Gly Leu Asp Gln Gln Phe
1 5 10 15

Ala Gly Leu Asp Leu Asn Ser Ser Asp Asn Gln Ser Gly Gly Ser Thr
20 25 30

Ala Ser Lys Gly Arg Tyr Ile Pro Pro His Leu Arg Asn Arg Glu Ala
35 40 45

Thr Lys Gly Phe Tyr Asp Lys Asp Ser Ser Gly Trp Ser Ser Ser Lys
50 55 60

Asp Lys Asp Ala Tyr Ser Ser Phe Gly Ser Arg Ser Asp Ser Arg Gly
65 70 75 80

Lys Ser Ser Phe Phe Ser Asp Arg Gly Ser Gly Ser Arg Gly Arg Phe
85 90 95

Asp Asp Arg Gly Arg Ser Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Arg Gly Asp
100 105 110

Arg Ser Gly Phe Gly Lys Phe Glu Arg Gly Gly Asn Ser Arg Trp Cys
115 120 125

Asp Lys Ser Asp Glu Asp Asp Trp Ser Lys Pro Leu Pro Pro Ser Glu
130 135 140

Arg Leu Glu Gln Glu Leu Phe Ser Gly Gly Asn Thr Gly Ile Asn Phe
145 150 155 160

Glu Lys Tyr Asp Asp Ile Pro Val Glu Ala Thr Gly Asn Asn Cys Pro

```
                165                 170                 175

Pro His Ile Glu Ser Phe Ser Asp Val Glu Met Gly Glu Ile Ile Met
            180                 185                 190

Gly Asn Ile Glu Leu Thr Arg Tyr Thr Arg Pro Thr Pro Val Gln Lys
        195                 200                 205

His Ala Ile Pro Ile Ile Lys Glu Lys Arg Asp Leu Met Ala Cys Ala
    210                 215                 220

Gln Thr Gly Ser Gly Lys Thr Ala Ala Phe Leu Leu Pro Ile Leu Ser
225                 230                 235                 240

Gln Ile Tyr Ser Asp Gly Pro Gly Glu Ala Leu Arg Ala Met Lys Glu
                245                 250                 255

Asn Gly Arg Tyr Gly Arg Arg Lys Gln Tyr Pro Ile Ser Leu Val Leu
            260                 265                 270

Ala Pro Thr Arg Glu Leu Ala Val Gln Ile Tyr Glu Glu Ala Arg Lys
        275                 280                 285

Phe Ser Tyr Arg Ser Arg Val Arg Pro Cys Val Val Tyr Gly Gly Ala
    290                 295                 300

Asp Ile Gly Gln Gln Ile Arg Asp Leu Glu Arg Gly Cys His Leu Leu
305                 310                 315                 320

Val Ala Thr Pro Gly Arg Leu Val Asp Met Met Glu Arg Gly Lys Ile
                325                 330                 335

Gly Leu Asp Phe Cys Lys Tyr Leu Val Leu Asp Glu Ala Asp Arg Met
            340                 345                 350

Leu Asp Met Gly Phe Glu Pro Gln Ile Arg Arg Ile Val Glu Gln Asp
        355                 360                 365

Thr Met Pro Pro Lys Gly Val Arg His Thr Met Met Phe Ser Ala Thr
    370                 375                 380

Phe Pro Lys Glu Ile Gln Met Leu Ala Arg Asp Phe Leu Asp Glu Tyr
385                 390                 395                 400

Ile Phe Leu Ala Val Gly Arg Val Gly Ser Thr Ser Glu Asn Ile Thr
                405                 410                 415
```

```
Gln Lys Val Val Trp Val Glu Glu Ser Asp Lys Arg Ser Phe Leu Leu
            420                 425                 430

Asp Leu Leu Asn Ala Thr Gly Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Phe Val
        435                 440                 445

Glu Thr Lys Lys Gly Ala Asp Ser Leu Glu Asp Phe Leu Tyr His Glu
    450                 455                 460

Gly Tyr Ala Cys Thr Ser Ile His Gly Asp Arg Ser Gln Arg Asp Arg
465                 470                 475                 480

Glu Glu Ala Leu His Gln Phe Arg Ser Gly Lys Ser Pro Ile Leu Val
                485                 490                 495

Ala Thr Ala Val Ala Ala Arg Gly Leu Asp Ile Ser Asn Val Lys His
            500                 505                 510

Val Ile Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp Ile Glu Glu Tyr Val His Arg
        515                 520                 525

Ile Gly Arg Thr Gly Arg Val Gly Asn Leu Gly Leu Ala Thr Ser Phe
    530                 535                 540

Phe Asn Glu Arg Asn Ile Asn Ile Thr Lys Asp Leu Leu Asp Leu Leu
545                 550                 555                 560

Val Glu Ala Lys Gln Glu Val Pro Ser Trp Leu Glu Asn Met Ala Tyr
                565                 570                 575

Glu His His Tyr Lys Gly Ser Ser Arg Gly Arg Ser Lys Ser Ser Arg
            580                 585                 590

Phe Ser Gly Gly Phe Gly Ala Arg Asp Tyr Arg Gln Ser Ser Gly Ala
        595                 600                 605

Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Ser Arg Ala Ser Ser Ser Arg Ser Gly
    610                 615                 620

Gly Gly Gly His Gly Ser Ser Arg Gly Phe Gly Gly Gly Gly Tyr Gly
625                 630                 635                 640

Gly Phe Tyr Asn Ser Asp Gly Tyr Gly Gly Asn Tyr Asn Ser Gln Gly
                645                 650                 655

Val Asp Trp Trp Gly Asn
            660
```

<210> 8
<211> 360
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Glu Met Val Arg Gly
1               5                   10                  15

Gln Val Phe Asp Val Gly Pro Arg Tyr Thr Asn Leu Ser Tyr Ile Gly
            20                  25                  30

Glu Gly Ala Tyr Gly Met Val Cys Ser Ala Tyr Asp Asn Val Asn Lys
        35                  40                  45

Val Arg Val Ala Ile Lys Lys Ile Ser Pro Phe Glu His Gln Thr Tyr
    50                  55                  60

Cys Gln Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Ile Leu Leu Arg Phe Arg His
65                  70                  75                  80

Glu Asn Ile Ile Gly Ile Asn Asp Ile Ile Arg Ala Pro Thr Ile Glu
                85                  90                  95

Gln Met Lys Asp Val Tyr Ile Val Gln Asp Leu Met Glu Thr Asp Leu
            100                 105                 110

Tyr Lys Leu Leu Lys Thr Gln His Leu Ser Asn Asp His Ile Cys Tyr
        115                 120                 125

Phe Leu Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn
    130                 135                 140

Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Leu Asn Thr Thr
145                 150                 155                 160

Cys Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ala Asp Pro
                165                 170                 175

Asp His Asp His Thr Gly Phe Leu Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp
            180                 185                 190

Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Ser Lys Gly Tyr Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Leu Ala Glu Met Leu Ser Asn
    210                 215                 220
```

```
Arg Pro Ile Phe Pro Gly Lys His Tyr Leu Asp Gln Leu Asn His Ile
225                 230                 235                 240

Leu Gly Ile Leu Gly Ser Pro Ser Gln Glu Asp Leu Asn Cys Ile Ile
                245                 250                 255

Asn Leu Lys Ala Arg Asn Tyr Leu Leu Ser Leu Pro His Lys Asn Lys
            260                 265                 270

Val Pro Trp Asn Arg Leu Phe Pro Asn Ala Asp Ser Lys Ala Leu Asp
        275                 280                 285

Leu Leu Asp Lys Met Leu Thr Phe Asn Pro His Lys Arg Ile Glu Val
    290                 295                 300

Glu Gln Ala Leu Ala His Pro Tyr Leu Glu Gln Tyr Tyr Asp Pro Ser
305                 310                 315                 320

Asp Glu Pro Ile Ala Glu Ala Pro Phe Lys Phe Asp Met Glu Leu Asp
                325                 330                 335

Asp Leu Pro Lys Glu Lys Leu Lys Glu Leu Ile Phe Glu Glu Thr Ala
            340                 345                 350

Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser
        355                 360
```

<210> 9
<211> 340
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Met Ser Glu Leu Asp Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Asn
1               5                   10                  15

Gln Ile Arg Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Ala Thr Leu Ser Gln
            20                  25                  30

Ile Thr Asn Asn Ile Asp Pro Val Gly Arg Ile Gln Met Arg Thr Arg
        35                  40                  45

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Gly
    50                  55                  60

Thr Asp Ser Arg Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile
65                  70                  75                  80
```

```
Ile Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg
                85                  90                  95

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Tyr Val
            100                 105                 110

Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Ile Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Thr
        115                 120                 125

Arg Glu Gly Asn Val Arg Val Ser Arg Glu Leu Ala Gly His Thr Gly
    130                 135                 140

Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Gln Ile Val Thr Ser
145                 150                 155                 160

Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln
                165                 170                 175

Thr Thr Thr Phe Thr Gly His Thr Gly Asp Val Met Ser Leu Ser Leu
            180                 185                 190

Ala Pro Asp Thr Arg Leu Phe Val Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala
        195                 200                 205

Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Met Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly
    210                 215                 220

His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Pro Asn Gly Asn Ala
225                 230                 235                 240

Phe Ala Thr Gly Ser Asp Asp Ala Thr Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg
                245                 250                 255

Ala Asp Gln Glu Leu Met Thr Tyr Ser His Asp Asn Ile Ile Cys Gly
            260                 265                 270

Ile Thr Ser Val Ser Phe Ser Lys Ser Gly Arg Leu Leu Leu Ala Gly
        275                 280                 285

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ala Leu Lys Ala Asp Arg
    290                 295                 300

Ala Gly Val Leu Ala Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val
305                 310                 315                 320

Thr Asp Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu
                325                 330                 335

Lys Ile Trp Asn
            340
```

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 10
Lys Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido parental

<400> 11
Leu Met Pro Lys His Phe Ile Arg
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido mutante con cambio de sentido

<400> 12
Leu Met Pro Lys Leu Phe Ile Arg
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 13
Ala Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Ile
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 14
Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Thr Ser
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 15
Ile Leu Leu Met Thr Val Thr Ser Ile
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 16
Leu Leu Met Thr Val Thr Ser Ile Asp
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 17
Leu Met Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 18
Met Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 19
Thr Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 20
Val Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 21
Thr Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala Val
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 22
Ala Ser Ile Leu Leu Met Thr Val Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

<400> 23
Glu Val Tyr Glu Gly Val Trp Lys Lys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica específica de tumor que comprende dos o más péptidos o polipéptidos mutantes, en la que cada péptido o polipéptido mutante comprende un neoepítopo específico de tumor que comprende una mutación específica de tumor seleccionada entre una mutación puntual, de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica, para uso en un método para vacunar o tratar a un sujeto que padece cáncer, el método comprende:

A. seleccionar los dos o más péptidos o polipéptidos mutantes mediante un método que comprende:

a. identificar una pluralidad de mutaciones tumorales en genes expresados del sujeto mediante el secuenciamiento de los ácidos nucleicos del genoma completo o del exoma completo de muestras tumorales y de tejido normal del sujeto, donde las mutaciones están presentes en el genoma de las células cancerosas del sujeto pero no en el tejido normal del sujeto; donde cuando dicha mutación identificada es:

i. una mutación puntual, identificar además un péptido mutante que tiene la mutación puntual; y/o

ii. una mutación de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica, identificar además un polipéptido mutante codificado por la mutación;

b. aplicar un algoritmo de predicción de unión péptido-MHC validado para seleccionar dos o más péptidos o polipéptidos mutantes identificados en la etapa (a), cada péptido o polipéptido mutante comprende un neoepítopo específico de tumor que comprende una mutación específica de tumor seleccionada entre una mutación puntual, de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica, donde el neoepítopo específico de tumor se une a una proteína HLA de clase I en el sujeto con una IC50 que se predice inferior a 150 nM; y

B. administrar la composición inmunogénica específica de tumor al sujeto.

2. Una composición según la reivindicación 1 para uso en el método de la reivindicación 1, donde la composición comprende además un adyuvante.

3. Una composición según la reivindicación 1 para uso en el método de la reivindicación 1, donde el método comprende además administrar al sujeto un adyuvante, opcionalmente donde el adyuvante es un adyuvante basado en TLR.

4. Una composición según la reivindicación 1 para uso en el método de la reivindicación 1, donde el método comprende además administrar otro agente terapéutico anti-cáncer o un agente anti-inmunosupresor.

5. Una composición según la reivindicación 4 para uso en el método de la reivindicación 4, donde dicho agente anti-inmunosupresor es un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD1 o un anticuerpo anti-PD-LI.

6. Una composición según la reivindicación 1 para uso en el método de la reivindicación 1, en la que cada péptido mutante tiene de 8 a 11 aminoácidos de longitud.

7. Una composición según la reivindicación 1 para uso en el método de la reivindicación 1, que comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 péptidos diferentes.

8. Uso de dos o más péptidos o polipéptidos mutantes en la preparación de una composición inmunogénica específica de tumor para vacunar o tratar a un sujeto que padece cáncer, donde cada péptido o polipéptido mutante comprende un neoepítopo específico de tumor que comprende una mutación específica de tumor seleccionada entre una mutación puntual, de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica, donde los dos o más péptidos o polipéptidos se seleccionan mediante un método que comprende:

a. identificar una pluralidad de mutaciones tumorales en genes expresados del sujeto mediante el secuenciamiento de los ácidos nucleicos del genoma completo o del exoma completo de muestras tumorales y de tejido normal del sujeto, donde las mutaciones están presentes en el genoma de las células cancerosas del sujeto pero no en el tejido normal del sujeto; donde cuando dicha mutación identificada es:

i. una mutación puntual, identificar además un péptido mutante que tiene la mutación puntual; y/o

ii. una mutación de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica, identificar además un polipéptido codificado por la mutación; y

b. aplicar un algoritmo de predicción de unión péptido-MHC validado para seleccionar dos o más péptidos o polipéptidos mutantes identificados en la etapa (a), cada péptido o polipéptido mutante comprende un neoepítopo específico de tumor que comprende una mutación específica de tumor seleccionada entre una

mutación puntual, de sitio de división, de cambio estructural, de lectura o de fusión génica, donde el neoepítopo específico de tumor se une a una proteína HLA de clase I en el sujeto con una IC50 que se predice inferior a 150 nM.

5

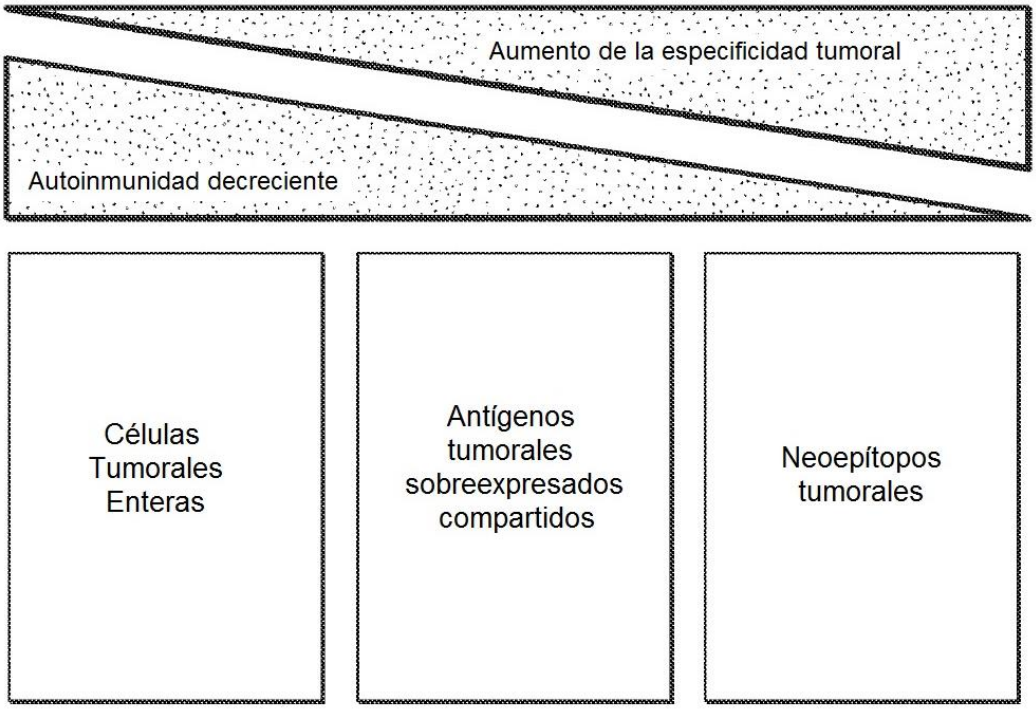

Aumento de la especificidad tumoral
Autoinmunidad decreciente
Células Tumorales Enteras
Antígenos tumorales sobreexpresados compartidos
Neoepítopos tumorales

FIG. 1

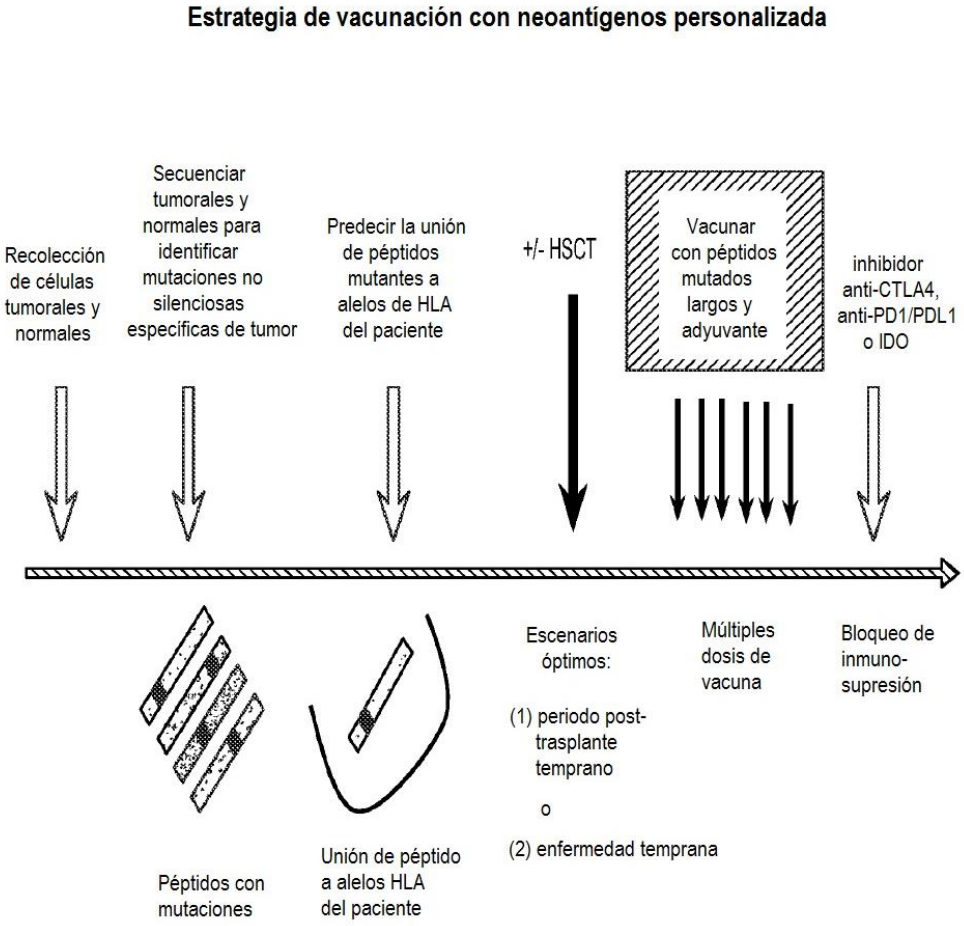

Estrategia de vacunación con neoantígenos personalizada
Recolección de células tumorales y normales
Secuenciar tumorales y normales para identificar mutaciones no silenciosas específicas de tumor
Predecir la unión de péptidos mutantes a alelos de HLA del paciente
+/- HSCT
Vacunar con péptidos mutados largos y adyuvante
inhibidor anti-CTLA4, anti-PD1/PDL1 o IDO
Escenarios óptimos:
(1) periodo post-trasplante temprano
o
(2) enfermedad temprana
Múltiples dosis de vacuna
Bloqueo de inmuno-supresión
Péptidos con mutaciones
Unión de péptido a alelos HLA del paciente

FIG. 2

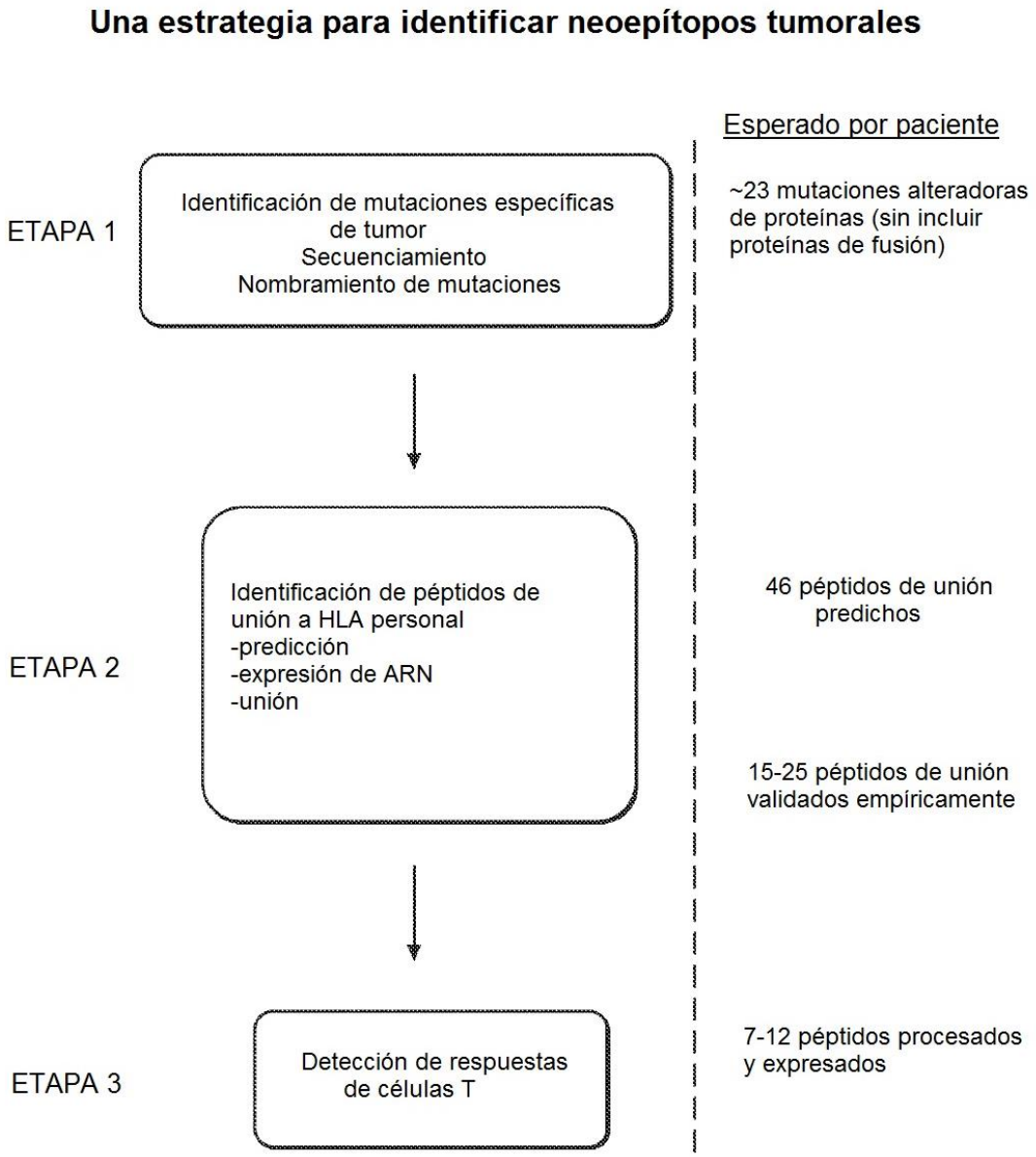

Una estrategia para identificar neoepítopos tumorales
Esperado por paciente
ETAPA 1
Identificación de mutaciones específicas de tumor
Secuenciamiento
Nombramiento de mutaciones
~23 mutaciones alteradoras de proteínas (sin incluir proteínas de fusión)
ETAPA 2
Identificación de péptidos de unión a HLA personal
-predicción
-expresión de ARN
-unión
46 péptidos de unión predichos
15-25 péptidos de unión validados empíricamente
ETAPA 3
Detección de respuestas de células T
7-12 péptidos procesados y expresados

FIG. 3

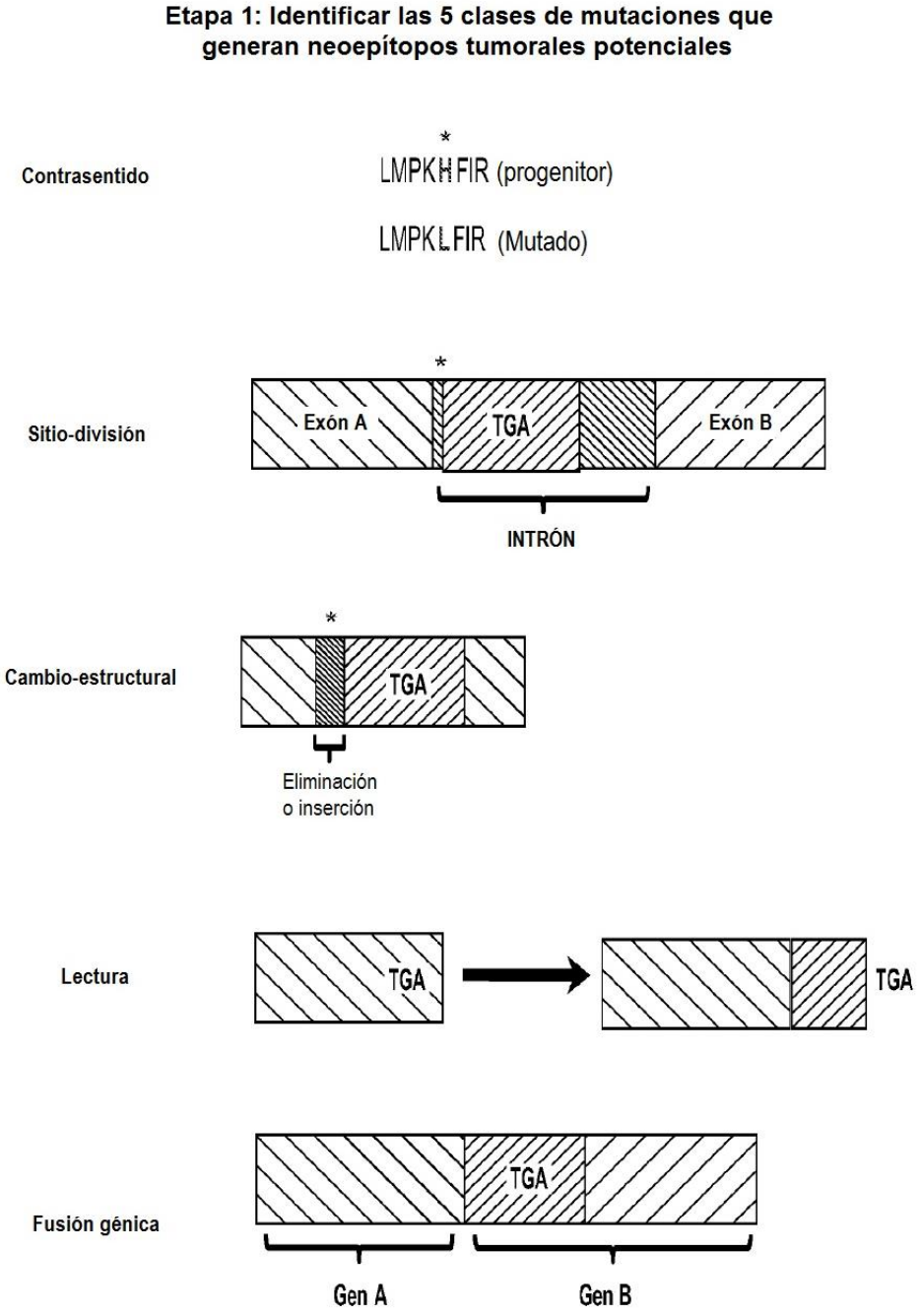

Etapa 1: Identificar las 5 clases de mutaciones que generan neoepítopos tumorales potenciales
Contrasentido
LMPKHFIR (progenitor)
LMPKLFIR (Mutado)
Sitio-división
Exón A
TGA
Exón B
INTRÓN
Cambio-estructural
TGA
Eliminación o inserción
Lectura
TGA
TGA
Fusión génica
TGA
Gen A
Gen B

FIG. 4

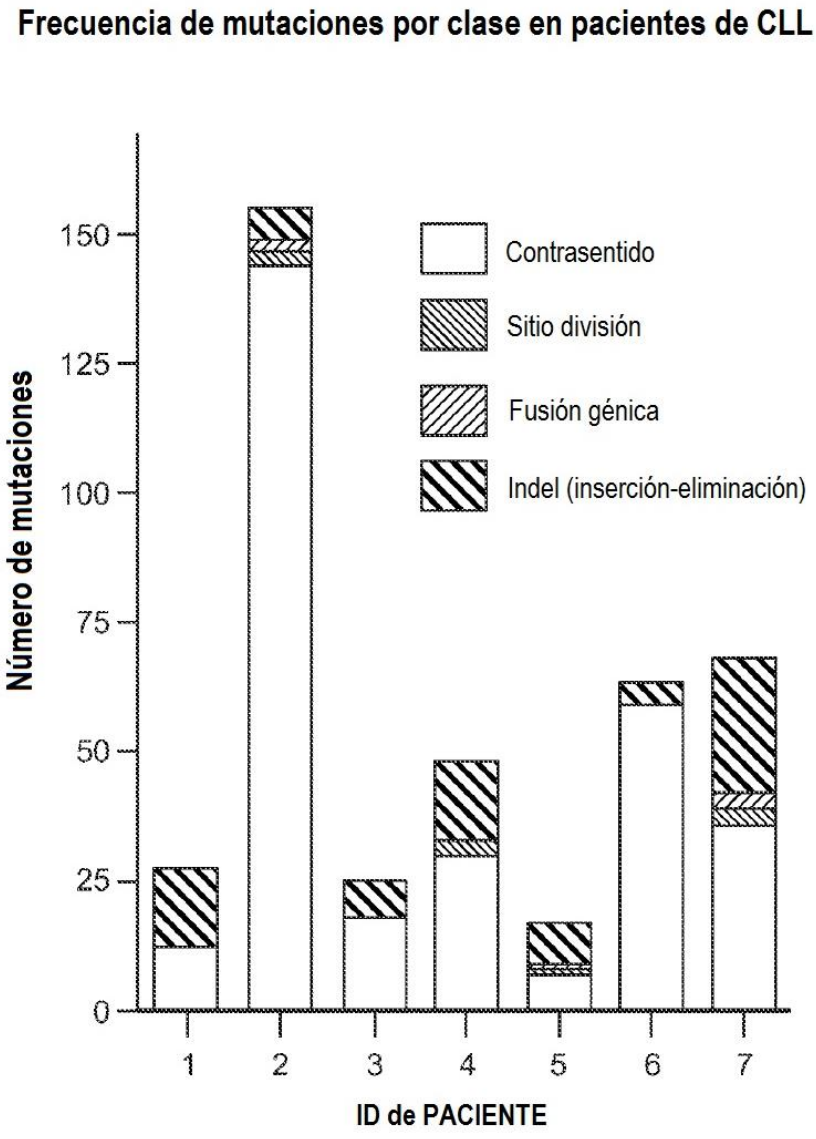

Frecuencia de mutaciones por clase en pacientes de CLL
Número de mutaciones
150
125
100
75
50
25
0
Contrasentido
Sitio división
Fusión génica
Indel (inserción-eliminación)
1
2
3
4
5
6
7
ID de PACIENTE

FIG. 5

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

Afinidad de unión fuerte IC_{50}<50 nM

Unión intermedia IC_{50}<500 nM

No mutado ASILLMTVI

Mutado ASILLMTVT

Posición	F2R/NM_001992 T@196	HLA-A*0101	HLA-A*0201	HLA-B*0702	HLA-B*0801	HLA-C*0701	HLA-C*0702
188-196	ASILLMTVT	23671,85	19359,42	29705,82	33914,47	30813,86	29921,85
189-197	SILLMTVTS	33864,61	8502,78	32065,73	14437,61	35076,88	31257,98
190-198	ILLMTVTSI	28921,10	41,91	11185,03	921,87	18346,73	13844,36
191-199	LLMTVTSID	32446,28	6105,16	31413,94	19157,37	42419,53	41446,55
192-200	LMTVTSIDR	30402,31	33262,16	41747,34	39837,33	37470,89	35512,98
193-201	MTVTSIDRF	5066,20	17874,71	16830,38	27827,56	7827,33	6665,52
194-202	TVTSIDRFL	25673,87	10165,34	17459,35	29667,50	19864,06	20854,32
195-203	VTSIDRFLA	4397,21	7438,75	27799,40	34937,23	34058,25	28879,51
196-204	TSIDRFLAV	5703,43	527,45	9124,17	245,43	11255,57	9553,74

FIG. 6

ES 2 788 863 T3

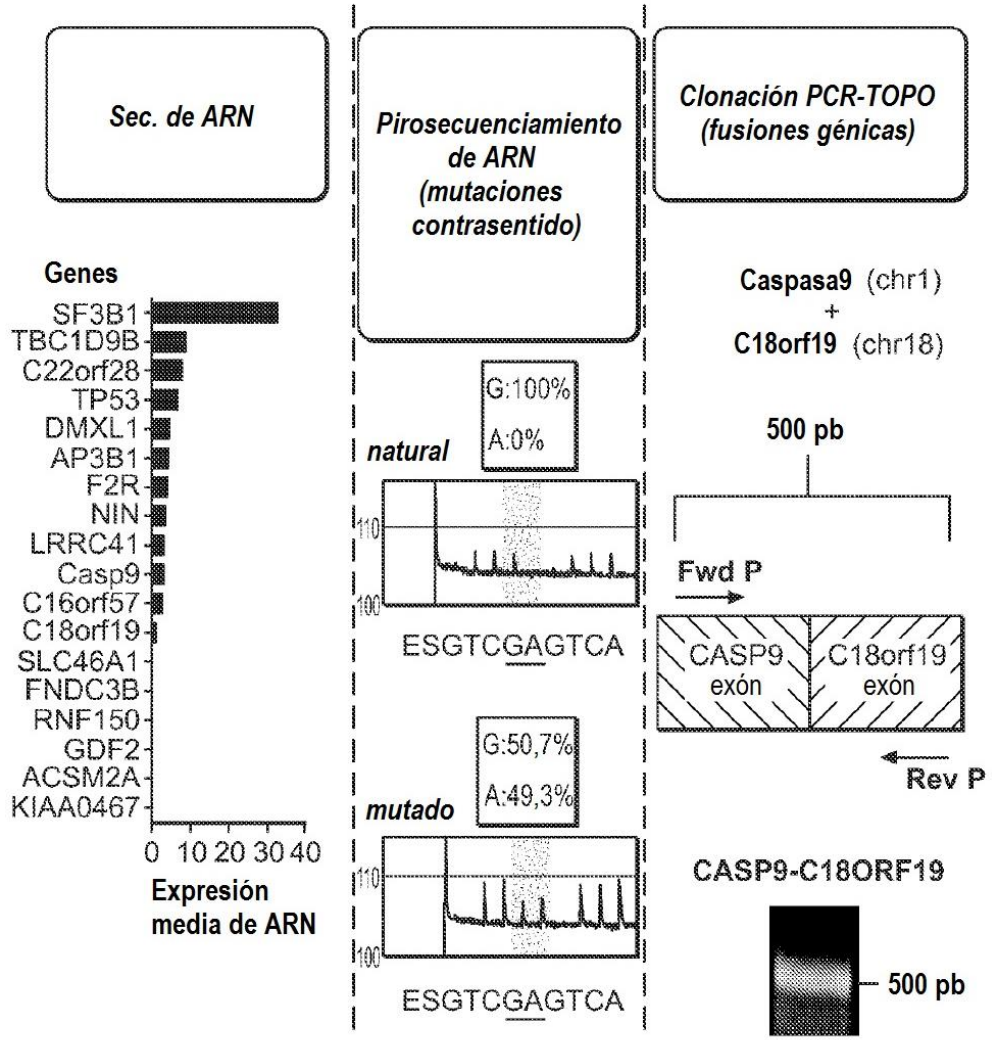

Etapa 2B: Confirmación de la expresión de ARN de genes mutados
Sec. de ARN
Pirosecuenciamiento de ARN (mutaciones contrasentido)
Clonación PCR-TOPO (fusiones génicas)
Genes
SF3B1
TBC1D9B
C22orf28
TP53
DMXL1
AP3B1
F2R
NIN
LRRC41
Casp9
C16orf57
C18orf19
SLC46A1
FNDC3B
RNF150
GDF2
ACSM2A
KIAA0467
0 10 20 30 40
Expresión media de ARN
natural
G:100%
A:0%
ESGTCGAGTCA
mutado
G:50,7%
A:49,3%
ESGTCGAGTCA
Caspasa9 (chr1)
+
C18orf19 (chr18)
500 pb
Fwd P
CASP9 exón
C18orf19 exón
Rev P
CASP9-C18ORF19
500 pb

FIG. 7

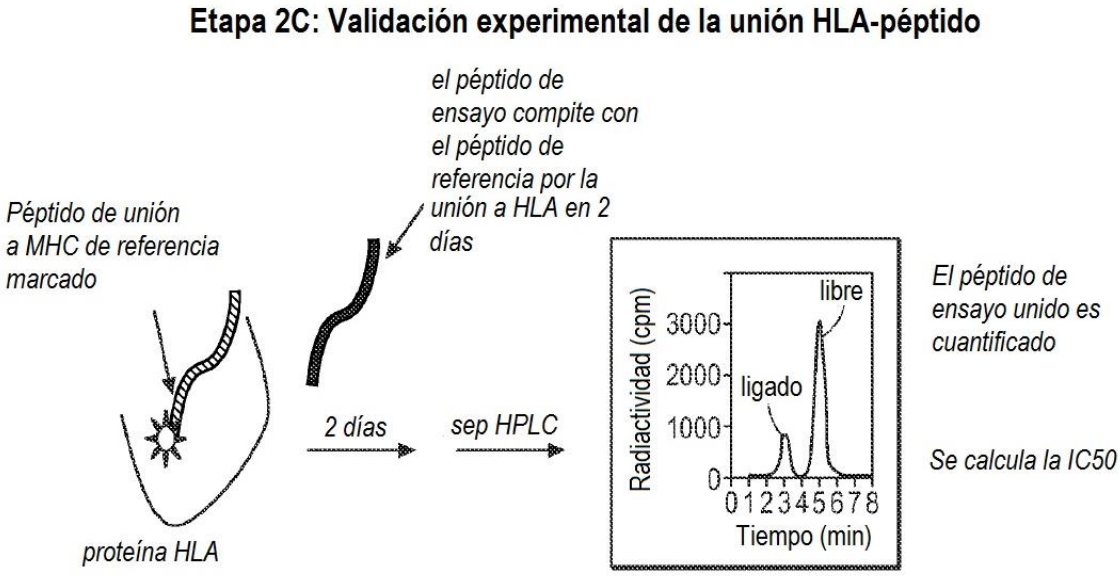


FIG. 8A

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

FIG. 8B

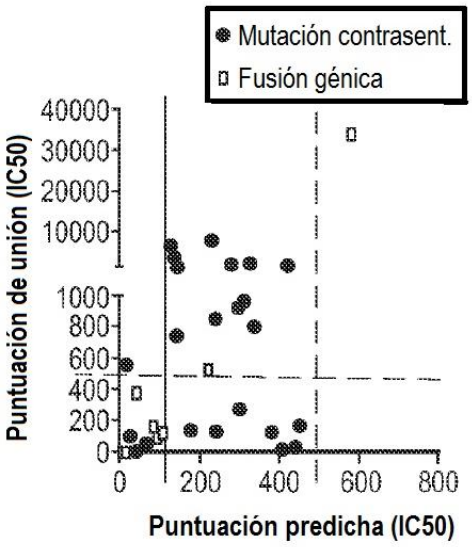


FIG. 8C

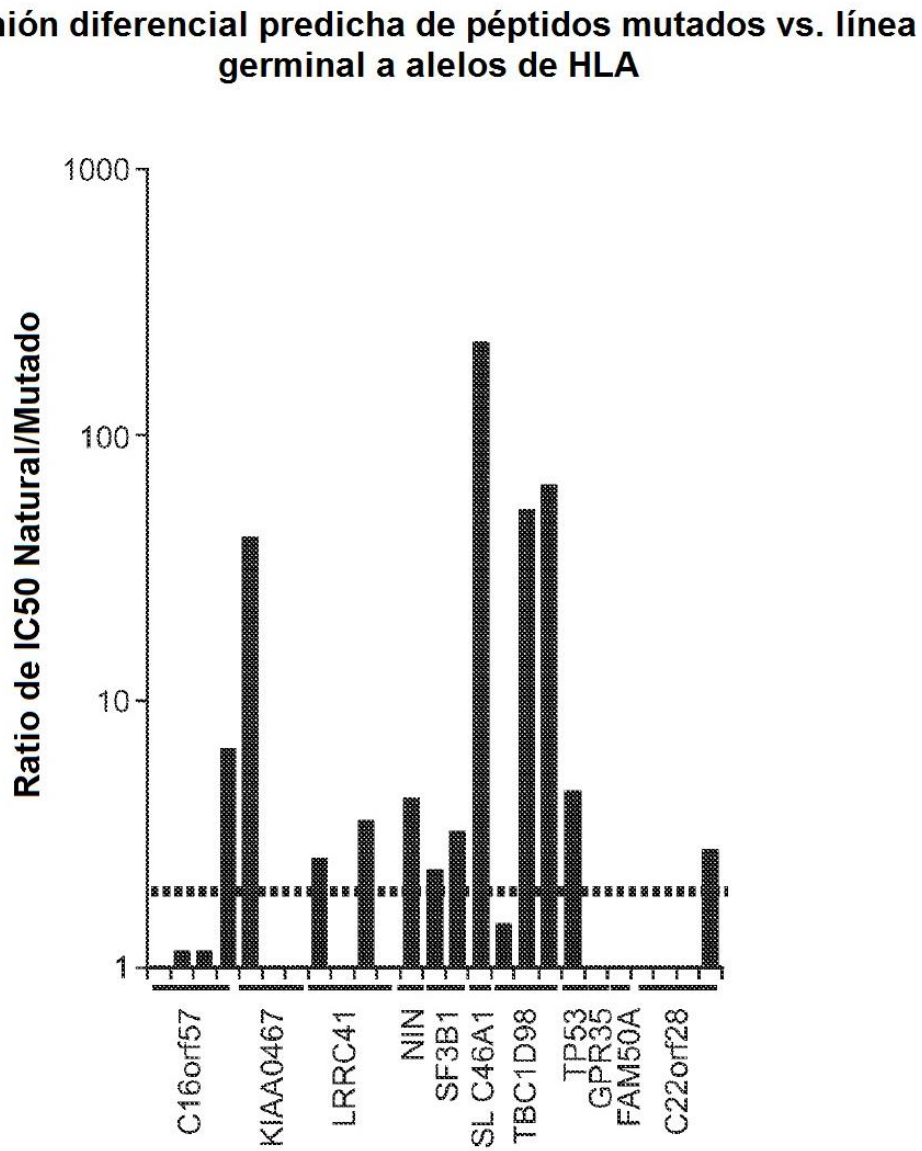

Unión diferencial predicha de péptidos mutados vs. línea germinal a alelos de HLA
Ratio de IC50 Natural/Mutado
1000
100
10
1
C16orf57
KIAA0467
LRRC41
NIN
SF3B1
SL C46A1
TBC1D98
TP53
GPR35
FAM50A
C22orf28

FIG. 9

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

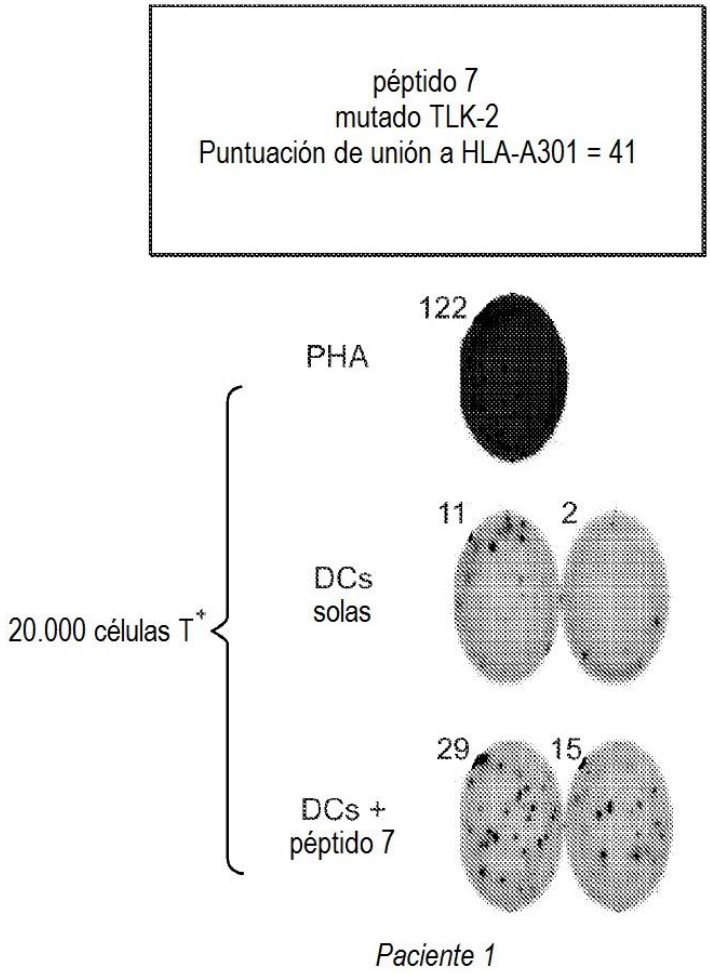


FIG. 10

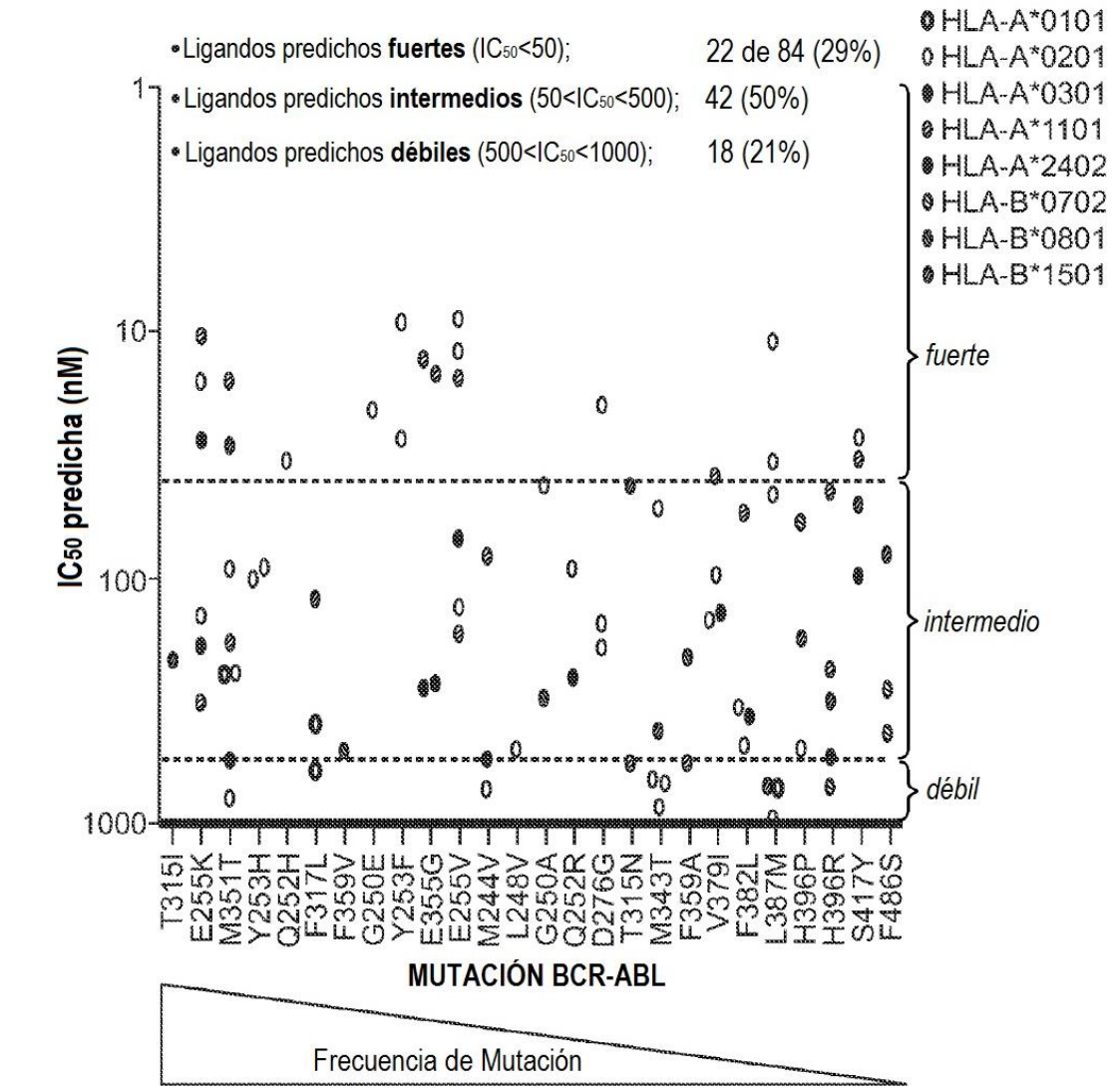

Las mutaciones BCR-ABL generan muchos péptidos con predicción de unión a alelos de HLA-A y HLA-B
• Ligandos predichos fuertes (IC50<50); 22 de 84 (29%)
• Ligandos predichos intermedios (50<IC50<500); 42 (50%)
• Ligandos predichos débiles (500<IC50<1000); 18 (21%)
HLA-A*0101
HLA-A*0201
HLA-A*0301
HLA-A*1101
HLA-A*2402
HLA-B*0702
HLA-B*0801
HLA-B*1501
IC50 predicha (nM)
1
10
100
1000
fuerte
intermedio
débil
T315I
E255K
M351T
Y253H
Q252H
F317L
F359V
G250E
Y253F
E355G
E255V
M244V
L248V
G250A
Q252R
D276G
T315N
M343T
F359A
V379I
F382L
L387M
H396P
H396R
S417Y
F486S
MUTACIÓN BCR-ABL
Frecuencia de Mutación

FIG. 11

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

FIG. 12A

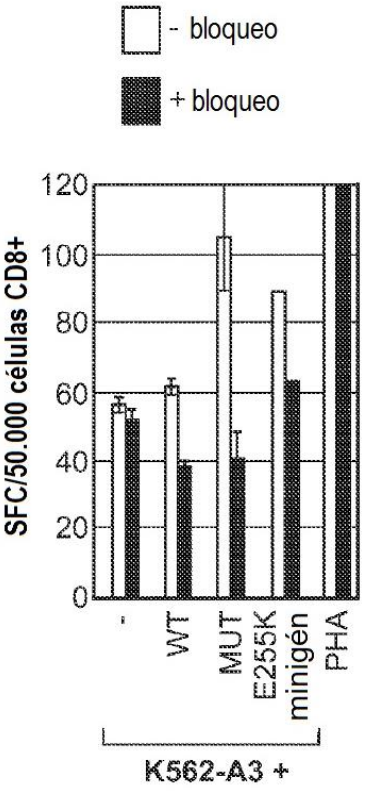


FIG. 12B

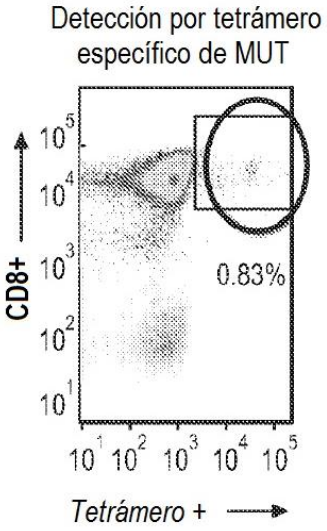


FIG. 12C

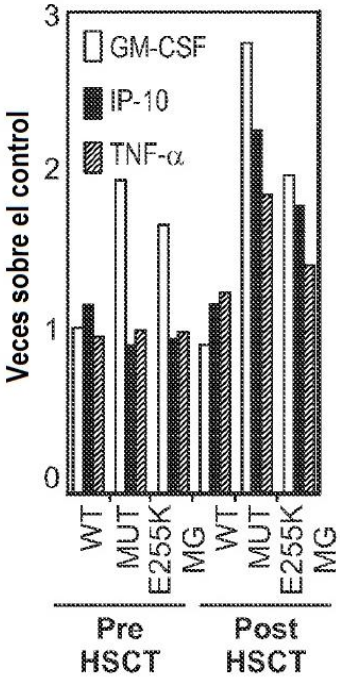


FIG. 12D

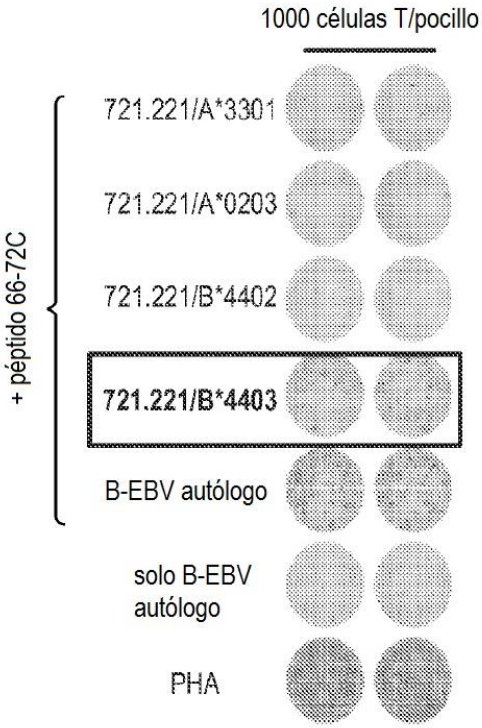


FIG. 13A

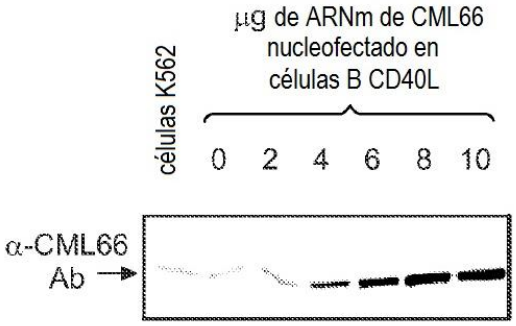


FIG. 13B

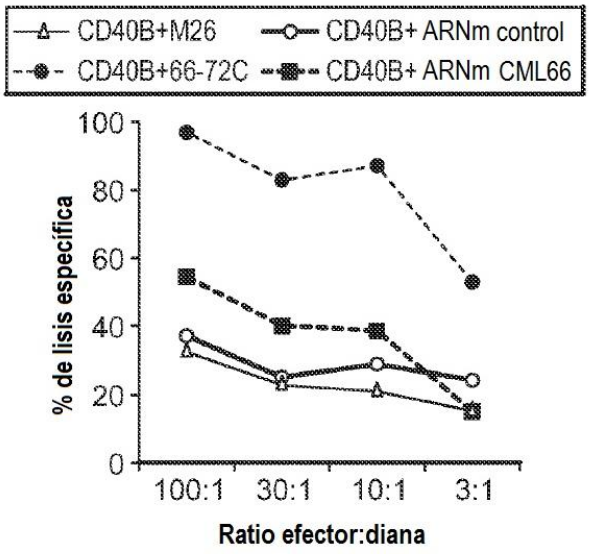


FIG. 13C

FIG. 14A

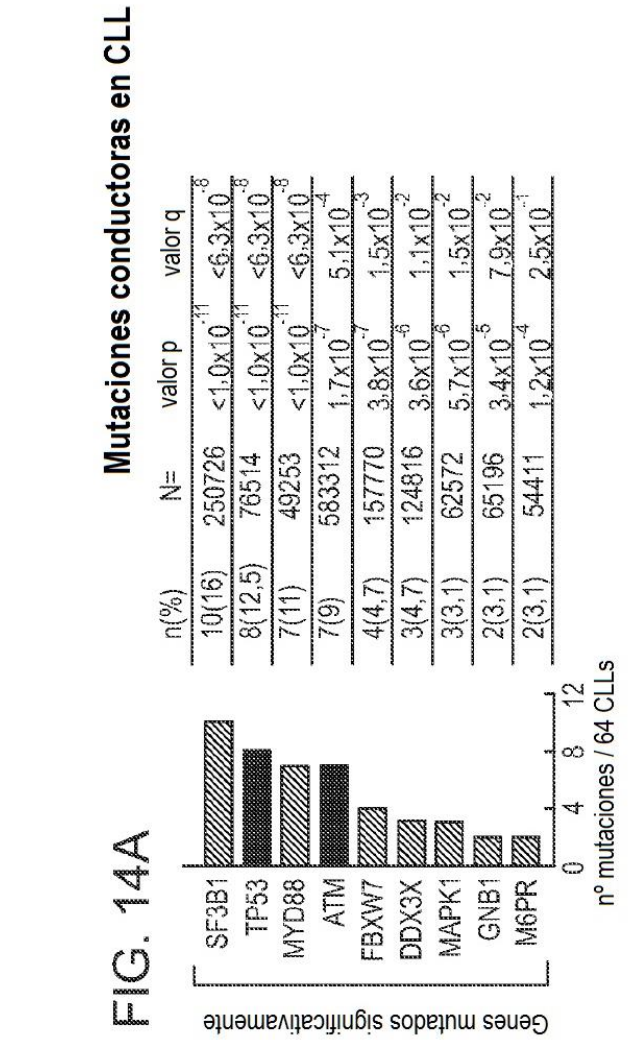
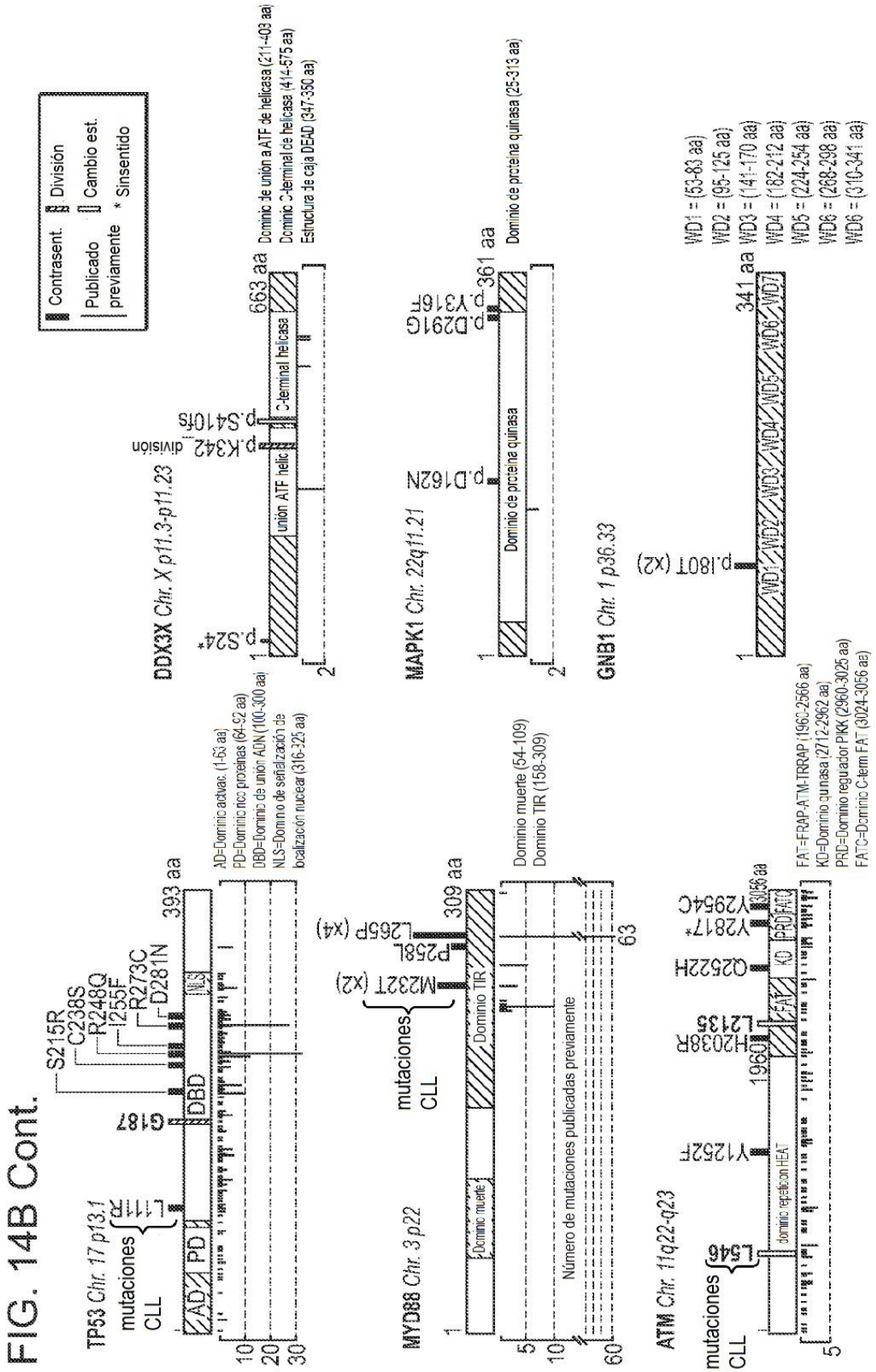


FIG. 14B

FIG. 14B Cont.


Contrasent.
División
Publicado previamente
Cambio est.
* Sinsentido
TP53 Chr. 17 p13.1
mutaciones CLL
S215R
C238S
R248Q
I255F
R273C
D281N
G187
AD
PD
DBD
NLS
393 aa
AD=Dominio activac. (1-63 aa)
PD=Dominio rico proteínas (64-92 aa)
DBD=Dominio de unión ADN (100-300 aa)
NLS=Dominio de señalización de localización nuclear (316-325 aa)
DDX3X Chr. X p11.3-p11.23
p.S24*
p.K342_división
p.S410fs
unión ATP helic
C-terminal helicasa
663 aa
Dominio de unión a ATP de helicasa (211-403 aa)
Dominio C-terminal de helicasa (414-575 aa)
Estructura de caja DEAD (347-350 aa)
MAPK1 Chr. 22q11.21
p.D162N
p.D291G
p.Y316T
Dominio de proteína quinasa
361 aa
Dominio de proteína quinasa (25-313 aa)
GNB1 Chr. 1 p36.33
p.I80T (x2)
WD1
WD2
WD3
WD4
WD5
WD6
WD7
341 aa
WD1 = (53-83 aa)
WD2 = (95-125 aa)
WD3 = (141-170 aa)
WD4 = (182-212 aa)
WD5 = (224-254 aa)
WD6 = (268-298 aa)
WD6 = (310-341 aa)
MYD88 Chr. 3 p22
mutaciones CLL
M232T (x2)
L265P (x4)
P258L
Dominio muerte
Dominio TIR
309 aa
Dominio muerte (54-109)
Dominio TIR (158-309)
Número de mutaciones publicadas previamente
ATM Chr. 11q22-q23
mutaciones CLL
L546
Y1252F
H2038R
1960
L2135
Q2522H
Y2817*
Y2954C
3056 aa
dominio regulación HEAT
FAT
KD
PRD
FATC
FAT=FRAP-ATM-TRRAP (1962-2566 aa)
KD=Dominio quinasa (2712-2962 aa)
PRD=Dominio regulador PIKK (2960-3025 aa)
FATC=Dominio C-term FAT (3024-3056 aa)

La expresión de SF3B1 es elevada en células de CLL

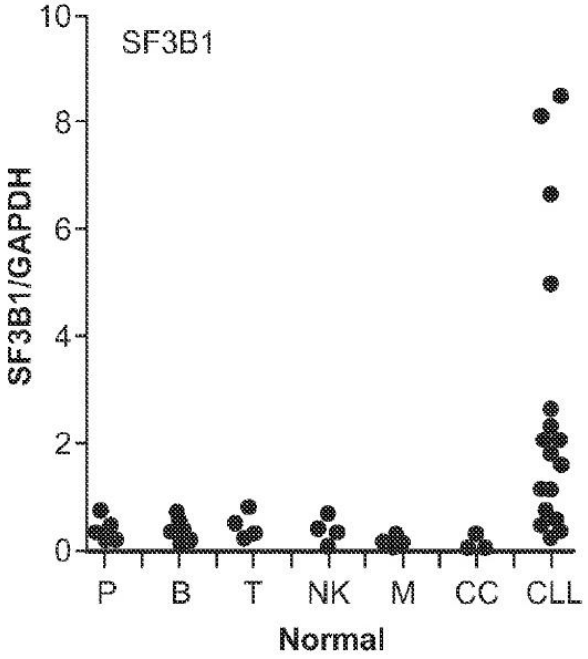


FIG. 15

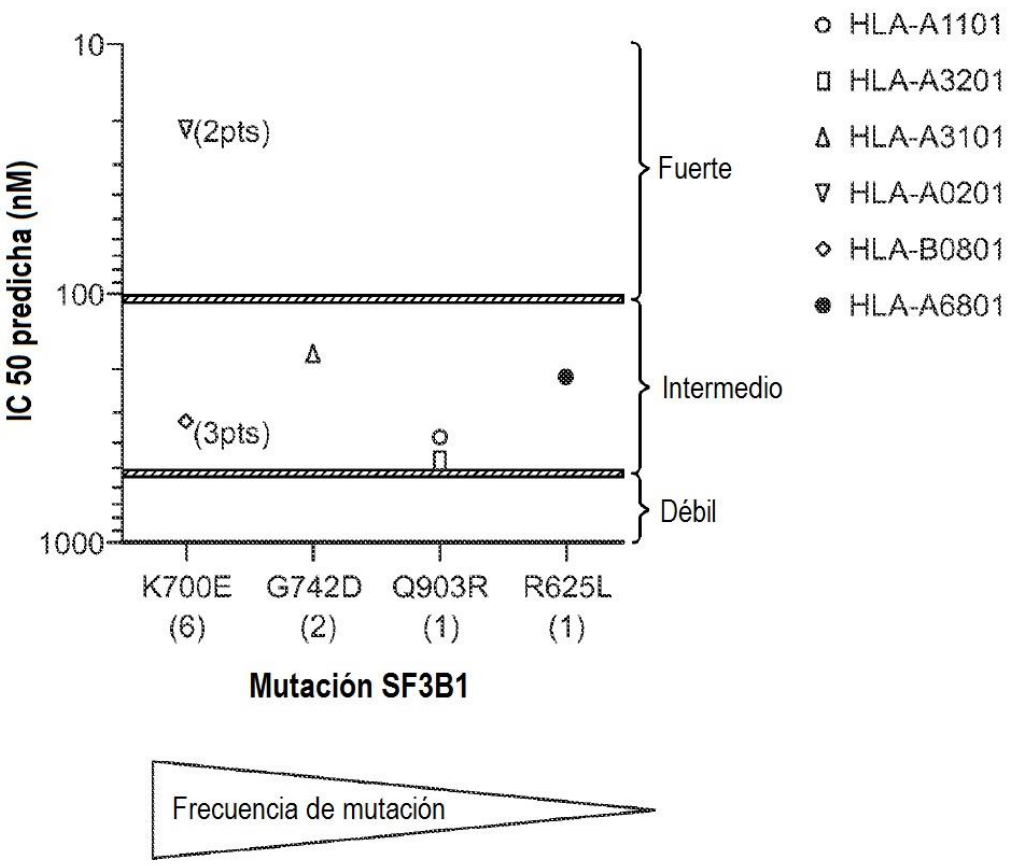

Las mutaciones SF3B1 generan péptidos con unión predicha a alelos de HLA de pacientes de CLL secuenciados
IC 50 predicha (nM)
10
100
1000
(2pts)
(3pts)
Fuerte
Intermedio
Débil
HLA-A1101
HLA-A3201
HLA-A3101
HLA-A0201
HLA-B0801
HLA-A6801
K700E (6)
G742D (2)
Q903R (1)
R625L (1)
Mutación SF3B1
Frecuencia de mutación

FIG. 16