

PÉPTIDOS

Campo de la Invención

La presente invención proporciona péptidos de TGB β R2
5 que tienen una mutación por desplazamiento del marco de lectura
para provocar una respuesta inmunológica, mezclas de péptidos
que comprenden péptidos de TGB β R2 que tienen una mutación por
desplazamiento del marco de lectura para provocar una respuesta
inmunológica, linfocitos T específicas para tales péptidos, y
10 mezclas de linfocitos T y preparaciones de linfocitos T que
comprenden linfocitos T específicas para tales péptidos. La
invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas que
comprenden tales péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T y
mezclas y preparaciones de linfocitos T, a los usos de tales
15 péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T y mezclas y
preparaciones de linfocitos T para la profilaxis y/o
tratamiento del cáncer, y a los métodos de selección de los
péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T, mezclas de
linfocitos T y preparaciones de linfocitos T para el
20 tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la Invención

Los microsatélites de ADN son cadenas de ADN
repetitivo, en las que se repiten ciertas porciones de ADN
(patrones de la secuencia de nucleótidos), usualmente de manera
25 aproximada de 5 a 50 veces. La inestabilidad de los

microsatélites (MSI, por sus siglas en inglés) es un cambio en el número de repeticiones de los microsatélites y puede ser provocada por una alteración de la actividad de la enzima de reparación de desapareamiento del ADN (MMR).

5 La MMR corrige los errores que ocurren espontáneamente durante la replicación del ADN, tales como los desapareamientos de una sola base o las inserciones o delecciones cortas. Cuando se altera la actividad de MMR, estos errores espontáneos no son reparados, y esto puede conducir a
10 la inestabilidad de los microsatélites (es decir, un cambio en el número de repeticiones) y a mutaciones por desplazamiento del marco de lectura en las secuencias de microsatélites del ADN.

Las mutaciones por desplazamiento del marco de
15 lectura son la adición o delección de uno o dos pares de bases de un gen, lo que conduce a codones diferentes y, por lo tanto, se codifica una proteína diferente, a partir del punto de la mutación. El desplazamiento del marco de lectura típicamente conduce a secuencias de proteínas truncadas porque un codón de
20 parada se produce de manera prematura y las proteínas codificadas usualmente están defectuosas o son inactivas.

En los últimos años, la inmuno-oncología ha sido un campo en desarrollo, con esfuerzos centrados en el uso del propio sistema inmunológico del paciente para combatir el
25 cáncer. Sin embargo, un problema es que los anticuerpos

solamente pueden unirse a los antígenos tumorales que están expuestos sobre la superficie de las células tumorales. Por esta razón, los esfuerzos para producir un tratamiento contra el cáncer basado en el sistema inmunológico del cuerpo han
5 tenido menos éxito de lo esperado.

TGF β R2 (SEC ID NO: 1) es un factor de crecimiento, y su interacción con TGF β media el control del crecimiento celular. Las mutaciones por desplazamiento del marco de lectura en TGF β R2 lo vuelven biológicamente no funcional, lo que induce
10 el crecimiento celular descontrolado y la progresión del cáncer. Una delección de un solo nucleótido es, por mucho, la mutación por desplazamiento del marco de lectura más dominante en TGF β R2, aunque es posible que se produzca una adición de un solo nucleótido. La secuencia de aminoácidos de TGF β R2 que
15 resulta de una mutación por desplazamiento del marco de lectura de la delección de un solo nucleótido (-1a) se muestra en la SEC ID NO: 2.

La detección de MSI en el cáncer, tales como los cánceres colorrectales (CCR, por sus siglas en inglés), se
20 lleva a cabo por medio del perfil del panel de Bethesda, el cual es un panel de referencia que incluye cinco sitios de microsatélites: dos mononucleótidos (BAT25 y BAT26) y tres dinucleótidos (D5S346, D2S123 y D17S250) (Cortes-Ciriano *et al.*, Nature Communications, 2017, vol. 8, artículo número
25 15180; Vilar & Gruber, Nat Rev Clin Oncol, 2010, vol. 7(3),

p.153-162). El MSI se clasifica como alto (MSI-H) cuando existe inestabilidad en dos o más sitios, y se clasifica como bajo (MSI-L) cuando existe inestabilidad en un sitio (Vilar & Gruber, Nat Rev Clin Oncol, 2010, vol. 7(3), p.153-162). Los
5 microsatélites se pueden clasificar como estables (MSS) cuando no existe ningún sitio que presente inestabilidades (Vilar & Gruber, Nat Rev Clin Oncol, 2010, vol. 7(3), p.153-162).

Aproximadamente 15% de todos los CCR son MSI-H; (Cortes-Ciriano *et al.*, Nature Communications, 2017, vol. 8,
10 artículo número 15180), y 99% de los CCR hereditarios (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC, por sus siglas en inglés)) son MSI-H (Pinheiro *et al.*, British Journal of Cancer, 2015, vol. 113, p. 686-692). De los pacientes con HNPCC MSI-H, aproximadamente 90% tiene una mutación por
15 desplazamiento del marco de lectura en la proteína de TGF β R2 (Pinheiro *et al.*, British Journal of Cancer, 2015, vol. 113, p. 686-692). Las personas con HNPCC tienen una mutación somática que se espera que se convierta en una mutación por desplazamiento del marco de lectura. El CCR frecuentemente es
20 precedido por el desarrollo de pólipos, pero la remoción de estos en pacientes con CCR hereditario no es efectiva para prevenir el cáncer, a diferencia de los pacientes que no tienen CCR hereditario.

Además, aproximadamente 22% de los cánceres de
25 estómago (gástrico) son MSI-H (Cortes-Ciriano *et al.*, Nature

Communications, 2017, vol. 8, artículo número 15180).

Además, se informa que las mutaciones por desplazamiento del marco de lectura en TGF β R2 se encuentran en aproximadamente 10% de todos los CCR, aproximadamente 44% de todos los cánceres MSI-H y, en particular, en aproximadamente 58% de los cánceres de colon MSI-H y en aproximadamente 80% de los cánceres de estómago MSI-H (Cortes-Ciriano *et al.*, Nature Communications, 2017, vol. 8, artículo número 15180).

Se ha informado que los péptidos de TGF β R2 que tienen una mutación por desplazamiento del marco de lectura son inmunogénicos, aunque existen inconsistencias en los resultados informados, como se describirá de manera adicional posteriormente.

EP1078000 describe el uso de fragmentos de proteínas que surgen de las mutaciones por desplazamiento del marco de lectura en los genes BAX y TGF β R2 para tratar el cáncer, provocando la inmunidad de los linfocitos T.

Linnebacher *et al.* (Int J Cancer, 2001, 93, p. 6-11) informa que tres péptidos derivados de proteínas que tienen mutaciones por desplazamiento del marco de lectura fueron capaces de activar los CTL específicos (restringidos por HLA-A2.1) *in vitro*, que incluyen un péptido (referido allí como FSP02: RLSSCPVA; SEC ID NO: 10) de TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a. Este péptido también fue capaz de lisar la línea celular HCT1 16

del cáncer colorrectal, que porta la correspondiente mutación por desplazamiento del marco de lectura. Sin embargo, otros dos péptidos de TGF β R2 con desplazamiento del marco de lectura de -1a no activaron los CTL.

5 Saeterdal et al. (Cancer Immunol Immunother, noviembre de 2001, 50(9), 469-476) informa que un péptido (RLSSCVPVA (etiquetado en Saeterdal et al., Cancer Immunol Immunother como p573); SEC ID NO: 10 en este documento) de TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de
10 lectura fue capaz de generar una línea de CTL y varios clones de CTL. Un clon de CTL fue capaz de destruir una línea celular HLA-A2+ del cáncer de colon que albergaba el TGF β R2 con desplazamiento del marco de lectura.

 Saeterdal et al. (PNAS, 6 de noviembre de 2001,
15 98(23), 13255-13260) informa un péptido altamente inmunogénico (etiquetado como p538; SLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQ (SEC ID NO: 11)) derivado de TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura, como un objetivo para los linfocitos Th infiltrantes del tumor en los tumores MSI+. Este péptido fue
20 reconocido por dos de tres pacientes que tienen cáncer de colon MSI+ espontáneo, y por la totalidad de los tres pacientes con HNPCC. Varios otros péptidos que corresponden a la misma mutación por desplazamiento del marco de lectura (p540: SPKCIMKEKKSLVRLSSCVPVA (SEC ID NO: 12), y p541:
25 PKCIMKEKKKSLVRLSSCV (SEC ID NO: 13)) también fueron capaces de

inducir las respuestas de los linfocitos T en algunos pacientes.

Sin embargo, los estudios anteriores tienen resultados contradictorios, de modo que no está claro si los péptidos de TGF β R2 que tienen una mutación por desplazamiento del marco de lectura son realmente inmunogénicos o no. Por ejemplo, el péptido FSP01 (SLVRLSSCV; SEC ID NO: 13 en este documento) de Linnebacher *et al.* es el mismo que el péptido de la SEC ID NO: 428 de EP1078000, pero Linnebacher *et al.* informa que este péptido no es inmunogénico (figura 1 de Linnebacher *et al.*) mientras que EP1078000 informa que este péptido es inmunogénico (figura 14 de EP1078000), aunque solamente después de cuatro rondas de estimulación de los linfocitos T. El péptido FSP02 (RLSSCVPVA; SEC ID NO: 10 en este documento) de Linnebacher *et al.* es el mismo que el péptido de la SEC ID NO: 439 de EP1078000 y el péptido p573 de Saeterdal *et al.*, (2001, Cancer Immunol Immunother), pero Linnebacher *et al.* y Saeterdal *et al.* (2001, Cancer Immunol Immunother) informan que este péptido es inmunogénico (figura 1 de Linnebacher *et al.*; resumen, y página 472, columna 1, párrafo 3, de Saeterdal *et al.*), mientras que EP 1078000 informa que este péptido no es inmunogénico incluso después de cuatro rondas de estimulación de los linfocitos T (figura 14 de EP 1078000). Además, Saeterdal (2001, PNAS) describe que los péptidos p537 y p621 no son inmunogénicos, pero que los péptidos p538, p540 y p4541

son inmunogénicos; sin embargo, tanto p538 como p621 comprenden la secuencia de los péptidos p523 y p573 que se ha demostrado que son inmunogénicos por medio de algunos estudios (como se describió anteriormente). Por consiguiente, no está claro la razón por la que p621 no es inmunogénico mientras que p538 es

5 inmunogénico. Además, EP1078000 describe que el péptido de la SEC ID NO: 17 del mismo es capaz de estimular los clones de los linfocitos T cultivados, derivados de un paciente con adenocarcinoma (figuras 8 y 9 de EP1078000), pero que el

10 péptido de la SEC ID NO: 17 del mismo no induce una respuesta de los linfocitos T por encima de los valores del fondo en los linfocitos T de los donadores de sangre sanos (figura 12 de EP1078000). Los resultados mostrados en las figuras 8 y 9 de EP1078000 muestran que se podría haber inducido una respuesta

15 inmunológica espontánea de los linfocitos T en un paciente con cáncer y que estos linfocitos T, después del cultivo con el péptido de la SEC ID NO: 17, pueden reconocer el péptido de la SEC ID NO: 17. Sin embargo, estos resultados no muestran que el péptido de la SEC ID NO: 17 sea un antígeno lo

20 suficientemente fuerte como para inducir una respuesta inmunológica protectora.

US 8053552 describe que un péptido derivado de TGF β R2 con desplazamiento del marco de lectura de -1a fue capaz, *in vitro*, de inducir una respuesta inmunológica usando los

25 linfocitos T de los donadores de HLA-A2.1+ sanos. Sin embargo,

estos resultados están limitados solamente a los epítomos de HLA-A2.1+ y no muestran que se hayan inducido otros linfocitos T restringidos de la clase I de HLA, o cualesquiera linfocitos T restringidos de la clase II de HLA. Históricamente, las vacunas que consisten solamente de los epítomos de la clase I de HLA no han tenido éxito en el tratamiento del cáncer y, por lo tanto, US 8053552 no muestra que los péptidos probados allí sean una vacuna o tratamiento efectivos contra el cáncer.

Por consiguiente, existe la necesidad de proporcionar vacunas y/o tratamientos efectivos contra los cánceres, en particular los cánceres asociados con MSI y mutaciones por desplazamiento del marco de lectura. En particular, existe la necesidad de desarrollar vacunas para personas con riesgo de desarrollar HNPCC. Además, existe la necesidad de proporcionar vacunas y/o tratamientos para estos cánceres, que sean rentables y se puedan usar para tratar o vacunar contra tantos cánceres asociados con MSI-H como sea posible.

Breve Descripción de la Invención

La presente invención resuelve al menos algunos de los problemas anteriores porque ahora se ha descubierto que los péptidos que comprenden un fragmento de TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura pueden ser usados para inducir una respuesta inmunológica contra las células cancerosas y, por lo tanto, son útiles para el

tratamiento y/o profilaxis del cáncer asociado con TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura. La presente invención es particularmente útil para el tratamiento y/o profilaxis de cánceres asociados con TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a (referido en este documento como "mutTGF β R2"). Se ha descubierto que los péptidos particularmente útiles comprenden un fragmento de mutTGF β R2, y pueden comprender una sustitución de un aminoácido de mutTGF β R2. En particular, los péptidos de acuerdo con la presente invención pueden ser usados para tratar aproximadamente 10% de todos los cánceres colorrectales, incluyendo aproximadamente 90% de los cánceres colorrectales hereditarios, y aproximadamente 18% de los cánceres gástricos. Los péptidos de la presente invención resuelven los problemas de los resultados contradictorios para la inmunogenicidad de los péptidos de mutTGF β R2, y proporcionan una vacuna y/o tratamiento efectivos y rentables. Además, los péptidos de la presente invención comprenden múltiples epítomos anidados, de tal modo que los péptidos comprendan epítomos para más de un alelo de HLA. Esto proporciona la ventaja de que los péptidos son capaces de inducir una respuesta inmunológica en los pacientes que tienen diferentes alelos de HLA, de tal modo que los péptidos son útiles como un tratamiento y/o vacuna universales.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona

un péptido que comprende un fragmento de la SEC ID NO: 8, en donde el fragmento comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8, en donde el péptido
5 es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra una proteína mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2.

Preferentemente, se proporciona un péptido que comprende un fragmento de la SEC ID NO: 8, en donde el fragmento
10 comprende al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8, en donde el péptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra una proteína mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2.

15 Convenientemente, el fragmento comprende al menos 9, preferentemente al menos 12, aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8

Ventajosamente, el fragmento comprende al menos 15
20 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8.

Convenientemente, el fragmento comprende solamente una de las posiciones 121 y de la SEC ID NO: 8.

Ventajosamente, el péptido comprende no más de 33
25 aminoácidos.

Preferentemente, el péptido comprende no más de 24 aminoácidos.

Convenientemente, el péptido comprende no más de 20 aminoácidos.

5 Preferentemente, el péptido comprende no más de 17 aminoácidos.

Convenientemente, el péptido comprende no más de 9 aminoácidos.

Ventajosamente, el fragmento comprende las
10 posiciones 121 a 132 de la SEC ID NO: 8 o las posiciones 135 a 146 de la SEC ID NO: 8.

Preferentemente, el aminoácido que corresponde a las posiciones 121 o 135 de la SEC ID NO: 8 es la glicina.

Convenientemente, fuera del fragmento, el péptido
15 tiene al menos 70% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 8.

Ventajosamente, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 28 o SEC ID NO: 30.

20 Preferentemente, el péptido consiste de la SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 28 o SEC ID NO: 30.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un péptido que comprende un fragmento de la SEC ID NO: 2, en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC
25 ID NO: 3, las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, o las

posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3, en donde el péptido comprende no más de 40 aminoácidos, y en donde el péptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra un mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2.

5 Preferentemente, el fragmento comprende i) las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3, y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos; ii) las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 40 aminoácidos; o
10 iii) las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3, y el péptido comprende no más de 33 aminoácidos; en donde el péptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra un mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2.

 Convenientemente, el fragmento comprende las posiciones 6 a 15 de la SEC ID NO: 3, las posiciones 2 a 22 de
15 la SEC ID NO: 3 o las posiciones 16 a 33 de la SEC ID NO: 3.

 Ventajosamente, el péptido comprende la secuencia de la SEC ID NO: 3.

 Preferentemente, fuera del fragmento, el péptido tiene al menos 70% de identidad de la secuencia con la SEC ID
20 NO: 3.

 Convenientemente, el péptido comprende la secuencia de la SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 26.

 Preferentemente, el péptido consiste de la SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 26.

25 Convenientemente, el péptido comprende no más de 33

aminoácidos, preferentemente no más de 24 aminoácidos, preferentemente no más de 20 aminoácidos o preferentemente no más de 17 aminoácidos.

Ventajosamente, el péptido i) comprende las
5 posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3 y comprende no más de 20 aminoácidos o, preferentemente, no más de 17 aminoácidos; ii) comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3 y comprende no más de 33 aminoácidos, preferentemente no más de 24 aminoácidos, preferentemente no más de 20 aminoácidos o
10 preferentemente no más de 17 aminoácidos; o iii) comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3 y comprende no más de 24 aminoácidos, o preferentemente no más de 20 aminoácidos.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un péptido que comprende un fragmento de la SEC ID NO: 2, para
15 su uso en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, en donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29, el péptido comprende no más de 21 aminoácidos y el péptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra un mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de
20 TGF β R2.

Preferentemente, el cáncer es el cáncer colorrectal o el cáncer de estómago.

Ventajosamente, el péptido comprende no más de 17 aminoácidos.

25 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona

una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido del primer, segundo o tercer aspectos anteriores.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona una mezcla de péptidos que comprende un primer y un segundo
5 péptidos, en donde el primer y segundo péptidos son péptidos de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspectos anteriores, y en donde el primer péptido es diferente del segundo péptido.

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que
10 comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspectos anteriores, o una mezcla de péptidos de acuerdo con el quinto aspecto anterior.

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona
15 una célula hospedera que comprende un vector de acuerdo con el sexto aspecto anterior.

En un octavo aspecto de la invención, se proporciona una preparación de linfocitos T que comprende linfocitos T no transfectadas específicas para un péptido de acuerdo con el
20 primer, segundo o tercer aspectos anteriores.

En un noveno aspecto de la invención, se proporciona una mezcla de linfocitos T no transfectadas específica para una mezcla de péptidos del quinto aspecto anterior.

En un décimo aspecto de la invención, se proporciona
25 una composición farmacéutica que comprende un péptido de

acuerdo con el primer, segundo o tercer aspectos anteriores, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto anterior, una mezcla de péptidos de acuerdo con el quinto aspecto anterior, un vector de acuerdo con el sexto aspecto anterior, una célula hospedera de acuerdo con el séptimo aspecto anterior, un linfocito T no transfectado de acuerdo con el octavo aspecto anterior o una mezcla de linfocitos T no transfectadas de acuerdo con el noveno aspecto anterior, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un undécimo aspecto de la invención, se proporciona un péptido de acuerdo con el primer o segundo aspectos anteriores, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto anterior, una mezcla de péptidos de acuerdo con el quinto aspecto anterior, un vector de acuerdo con el sexto aspecto anterior, una célula hospedera de acuerdo con el séptimo aspecto anterior, un linfocito T no transfectado de acuerdo con el octavo aspecto anterior, una mezcla de linfocitos T no transfectadas de acuerdo con el noveno aspecto anterior o una composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto anterior, para su uso en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer.

Ventajosamente, el cáncer es el cáncer colorrectal o el cáncer de estómago.

Convenientemente, el cáncer comprende células cancerosas que expresan un mutante con desplazamiento del marco

de lectura de la proteína de TGF β R2.

Preferentemente, el mutante con desplazamiento del marco de lectura de la proteína de TGF β R2 es un mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a.

5 En un duodécimo aspecto de la invención, se proporciona un método para seleccionar un péptido, molécula de ácido nucleico, mezcla de péptidos, vector, célula hospedera, linfocito T, mezcla de linfocitos T o una composición farmacéutica para su administración a un paciente, que
10 comprende:

 i) identificar si un paciente con cáncer tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura en la proteína de TGF β R2 y, de ser así,

 ii) seleccionar un péptido de acuerdo con el primer,
15 segundo o tercer aspectos anteriores, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto anterior, una mezcla de péptidos de acuerdo con el quinto aspecto anterior, un vector de acuerdo con el sexto aspecto anterior, una célula hospedera de acuerdo con el séptimo aspecto anterior, un
20 linfocito T no transfectado de acuerdo con el octavo aspecto anterior, una mezcla de linfocitos T no transfectadas de acuerdo con el noveno aspecto anterior o una composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto anterior.

 En un decimotercer aspecto de la invención, se
25 proporciona un método para tratar el cáncer que comprende

administrar, al paciente que lo necesita, un péptido de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspectos anteriores, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto anterior, una mezcla de péptidos de acuerdo con el quinto
5 aspecto anterior, un vector de acuerdo con el sexto aspecto anterior, una célula hospedera de acuerdo con el séptimo aspecto anterior, un linfocito T no transfectado de acuerdo con el octavo aspecto anterior, una mezcla de linfocitos T no transfectadas de acuerdo con el noveno aspecto anterior o una
10 composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto anterior.

En un decimocuarto aspecto de la invención, se proporciona el uso de un péptido de acuerdo con el primer, segundo o tercer aspectos anteriores, una molécula de ácido
15 nucleico de acuerdo con el cuarto aspecto anterior, una mezcla de péptidos de acuerdo con el quinto aspecto anterior, un vector de acuerdo con el sexto aspecto anterior, una célula hospedera de acuerdo con el séptimo aspecto anterior, una composición farmacéutica de acuerdo con el décimo aspecto
20 anterior que comprende un péptido o mezcla de péptidos, o un péptido, mezcla de péptidos, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedera o composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el undécimo aspecto anterior, para la preparación de un linfocito T no transfectado de acuerdo con
25 el octavo aspecto anterior o una mezcla de linfocitos T no

transfectadas de acuerdo con el noveno aspecto anterior.

El término "péptido", como se usa en este documento, se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos que es (o tiene una secuencia que corresponde a) un fragmento de una proteína más larga. El término también se aplica a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un residuo modificado, o un residuo que no está presente de manera natural, tal como un mimético químico artificial de un aminoácido que está presente de manera natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que están presentes de manera natural. El péptido puede estar unido a otro agente o porción.

El término "fragmento", como se usa en este documento, se refiere a una serie de aminoácidos consecutivos de un polipéptido o proteína más larga.

El porcentaje de "identidad" entre dos secuencias se puede determinar usando el algoritmo BLASTP versión 2.2.2 de Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402), usando los parámetros predeterminados. En particular, se puede acceder al algoritmo BLAST en Internet usando la URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

El término "respuesta inmunológica", como se usa en

este documento, se refiere en algunas modalidades a una respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T (es decir, la activación de los linfocitos T) tras el reconocimiento de un péptido. La respuesta de los linfocitos T puede ser una
5 respuesta de los linfocitos T mediada por HLA-I y/o una respuesta de los linfocitos T mediada por HLA-II. La respuesta inmunológica puede ser una respuesta de cualesquiera linfocitos T alfa beta ($\alpha\beta$) y/o linfocitos T gamma delta ($\gamma\delta$), de tal modo que los péptidos pueden ser presentados o no a los linfocitos
10 T por medio de las moléculas de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos.

El término "mutante con desplazamiento del marco de lectura", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos
15 que tiene una adición o delección de uno o dos nucleótidos en comparación con la secuencia de tipo salvaje del ácido nucleico, lo que conduce a diferentes codones a partir del punto de mutación.

El término "mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a", como se usa en este documento, se refiere a un polipéptido resultante de la delección de un solo nucleótido de la secuencia de ácidos nucleicos de tipo salvaje.
20

El término "mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a" se refiere a un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido en comparación con la secuencia
25

de aminoácidos de tipo salvaje del polipéptido, que resulta de la delección de un solo nucleótido de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica este polipéptido.

El término "mutTGF β R2", como se usa en este documento, se refiere a una proteína de TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a. La secuencia de aminoácidos de mutTGF β R2 se muestra en la SEC ID NO: 2.

El término "sustitución de aminoácidos", como se usa en este documento, se refiere al reemplazo de un aminoácido en un polipéptido con un aminoácido diferente, en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje del polipéptido.

El término "mezcla de péptidos", como se usa en este documento, se refiere a dos o más péptidos que se mezclan, pero no se combinan químicamente. Las mezclas pueden estar presentes como un polvo seco, solución, suspensión o coloide, y pueden ser homogéneas o heterogéneas.

El término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico", como se usa en este documento, se refiere a un polímero de múltiples nucleótidos. El ácido nucleico puede comprender nucleótidos que están presentes de manera natural o puede comprender nucleótidos artificiales tales como los nucleótidos peptídicos, morfolina y nucleótidos bloqueados, así como los nucleótidos de glicol y los nucleótidos de treosa.

El término "nucleótido", como se usa en este

documento, se refiere a los nucleótidos que están presentes de manera natural y a los análogos de nucleótidos sintéticos que son reconocidos por las enzimas celulares.

El término "composición farmacéutica", como se usa
5 en este documento, significa una preparación farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto humano o animal propuesto con fines terapéuticos.

Breve Descripción de las Figuras

La figura 1 muestra el desarrollo de las secuencias
10 de consenso, los péptidos de la presente invención, y un péptido de prueba.

La figura 2 es una traza de UPLC de fsp5 crudo recién preparado (SEC ID NO: 3).

La figura 3 es una traza de UPLC de fsp5 purificado
15 (SEC ID NO: 3) en solución antes de la liofilización.

La figura 4 es una traza de UPLC de fsp5 purificado (SEC ID NO: 3) después de la liofilización.

La figura 5 es una traza de HPLC de fsp5 crudo (SEC ID NO: 3) después de un almacenamiento durante tres días a
20 temperatura ambiente, seguido por la reconstitución y la liofilización.

La figura 6 es una traza de UPLC de fsp1 purificado (SEC ID NO: 4).

La figura 7 es una traza de UPLC de fsp2 purificado
25 (SEC ID NO: 5).

La figura 8 es una traza de UPLC de fsp3 purificado (SEC ID NO: 6).

La figura 9 es una traza de UPLC de fsp4 purificado (SEC ID NO: 7).

5 La figura 10 es una gráfica que muestra la proliferación de los linfocitos T después de una ronda de estimulación con una mezcla de péptidos que contiene fsp2 (SEC ID NO: 5) y fsp4 (SEC ID NO: 7).

10 La figura 11 es una gráfica que muestra la proliferación de los linfocitos T después de una segunda ronda de estimulación con una mezcla de péptidos que contiene fsp2 (SEC ID NO: 5) y fsp4 (SEC ID NO: 7).

15 La figura 12 es una gráfica que muestra una presentación alternativa de la proliferación de los linfocitos T en las muestras de los donadores 2, 3 y 4 que se muestran en la figura 11.

20 La figura 13 es una gráfica que muestra la proliferación de los linfocitos T inducida por fsp2 (SEC ID NO: 5), fsp6 (SEC ID NO: 26) o fsp7 (SEC ID NO: 27), después de la estimulación con una mezcla de péptidos que contiene fsp2 (SEC ID NO: 5), fsp8 (SEC ID NO: 31) y fsp9 (SEC ID NO: 32).

Breve descripción del listado de secuencias

La SEC ID NO: 1 es la proteína de TGF β R2 de tipo salvaje de longitud completa.

25 La SEC ID NO: 2 es el TGF β R2 mutado de longitud

completa con una mutación por desplazamiento del marco de lectura del aminoácido de -1.

La SEC ID NO: 3 es un péptido de 33 aminoácidos de la SEC ID NO: 2, referido en este documento como fsp5.

5 La SEC ID NO: 4 es un péptido referido en este documento como fsp1.

La SEC ID NO: 5 es un péptido referido en este documento como fsp2. Texto libre en el listado de secuencias: péptido modificado.

10 La SEC ID NO: 6 es un péptido referido en este documento como fsp3.

La SEC ID NO: 7 es un péptido referido en este documento como fsp4. Texto libre en el listado de secuencias: péptido modificado.

15 La SEC ID NO: 8 es el TGF β R2 mutado de longitud completa con una mutación por desplazamiento del marco de lectura del aminoácido de -1 y que tiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones 121 y 135. Texto libre en el listado de secuencias: péptido modificado; la posición 121 es
20 cualquier aminoácido excepto la cisteína; la posición 135 es cualquier aminoácido excepto la cisteína.

La SEC ID NO: 9 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

25 La SEC ID NO: 10 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

La SEC ID NO: 11 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

La SEC ID NO: 12 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

5 La SEC ID NO: 13 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

La SEC ID NO: 14 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

10 La SEC ID NO: 15 es un péptido de la técnica anterior de mutTGF β R2.

La SEC ID NO: 16 es una secuencia de consenso predicha manualmente de mutTGF β R2.

La SEC ID NO: 17 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho por SYFPEITHI.

15 La SEC ID NO: 18 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho por SYFPEITHI.

La SEC ID NO: 19 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho por SYFPEITHI.

20 La SEC ID NO: 20 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho por SYFPEITHI.

La SEC ID NO: 21 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho por SYFPEITHI.

La SEC ID NO: 22 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho por SYFPEITHI.

25 La SEC ID NO: 23 es un epítipo de mutTGF β R2 predicho

por SYFPEITHI.

La SEC ID NO: 24 es un epítopo de mutTGFβR2 predicho por SYFPEITHI.

La SEC ID NO: 25 es un epítopo de mutTGFβR2 predicho
5 por SYFPEITHI.

La SEC ID NO: 26 es un péptido referido en este documento como fsp6.

La SEC ID NO: 27 es un péptido referido en este documento como fsp7.

10 La SEC ID NO: 28 es un péptido referido en este documento como fsp6a. Texto libre en el listado de secuencias: péptido modificado.

La SEC ID NO: 29 es un péptido referido en este documento como fspl1a.

15 La SEC ID NO: 30 es un péptido referido en este documento como fspl1b. Texto libre en el listado de secuencias: péptido modificado.

La SEC ID NO: 31 es un péptido referido en este documento como fsp8.

20 La SEC ID NO: 32 es un péptido referido en este documento como fsp9.

Descripción Detallada de la Invención

La invención se refiere, en términos generales, a un péptido derivado de TGFβR2 que tiene una mutación por
25 desplazamiento del marco de lectura. El péptido comprende un

fragmento de una proteína mutante con desplazamiento del marco de lectura de TGF β R2 y es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra una proteína mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2. En algunas modalidades, el mutante con desplazamiento del marco de lectura de TGF β R2 es un mutante con desplazamiento del marco de lectura de TGF β R2 de -1a (referido en este documento como "mutTGF β R2"). La secuencia de aminoácidos de la proteína mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2 se muestra en la SEC ID NO: 2.

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 22, al menos 24, al menos 26, al menos 28, al menos 30 o al menos 32 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento comprende al menos 20 aminoácidos. En otras modalidades, el fragmento comprende al menos 24 aminoácidos. En las modalidades adicionales, el fragmento comprende al menos 33 aminoácidos.

En algunas modalidades, el fragmento comprende no más de 100, 50 o 40 aminoácidos. Por ejemplo, el fragmento puede comprender no más de 35, 33, 31, 29, 27, 25, 23, 21, 19, 17 o 9 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento comprende no más de 33 aminoácidos. En otras modalidades, el fragmento comprende no más de 24, 20, 17 o 9 aminoácidos.

En algunas modalidades, el péptido comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 22, al menos 24, al menos 26, al menos 28, al menos 30 o al menos 32 aminoácidos.

5 En algunas modalidades, el péptido comprende al menos 20 aminoácidos. En otras modalidades, el péptido comprende al menos 24 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido comprende al menos 17 aminoácidos. En otras modalidades, el péptido comprende al menos 9 aminoácidos. En las modalidades
10 adicionales, el péptido comprende al menos 33 aminoácidos.

En algunas modalidades, el péptido comprende no más de 100, 50 o 40 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido puede comprender no más de 35, 33, 31, 29, 27, 25, 23, 21, 19, 17 o 9 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido comprende no
15 más de 33 aminoácidos. En otras modalidades, el péptido comprende no más de 24, 20, 17 o 9 aminoácidos.

Por consiguiente, en algunas modalidades, el péptido comprende otros aminoácidos fuera del fragmento de mutTGF β R2. Sin embargo, en otras modalidades, el péptido tiene la misma
20 longitud que el fragmento, de tal modo que el péptido es un fragmento de mutTGF β R2.

Identidad de la secuencia para mutTGF β R2 fuera del fragmento

El péptido puede tener al menos 70% de identidad de la secuencia con mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) fuera del fragmento
25 de mutTGF β R2. En algunas modalidades, el péptido tiene al menos

75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas modalidades, el péptido tiene una identidad de la secuencia de 100% con la SEC ID NO: 2 fuera
 5 del fragmento de mutTGF β R2.

Posición del fragmento dentro del péptido

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comienza en la posición uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete desde el extremo N-terminal del péptido.
 10 En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) termina en la posición uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho desde el extremo C-terminal del péptido. En otras modalidades, el fragmento es el extremo C-terminal o el extremo N-terminal del péptido.

15 Región de puenteo

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende al menos un aminoácido de la secuencia de tipo salvaje de TGF β R2 (SEC ID NO: 1) (es decir, de la posición 1 a la posición 127 de la SEC ID NO: 2) consecutivo
 20 con al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación por desplazamiento del marco de lectura (es decir, de la posición 128 a la posición 161 de la SEC ID NO: 2). Por consiguiente, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) puede superponerse sobre la secuencia de aminoácidos no
 25 afectada por la mutación por desplazamiento del marco de

lectura y la secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación por desplazamiento del marco de lectura. En algunas modalidades, el fragmento comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de TGFβR2 (SEC ID NO: 1). En algunas modalidades, al menos un aminoácido de la secuencia de tipo salvaje de TGFβR2 (SEC ID NO: 1) es consecutivo con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación por desplazamiento del marco de lectura.

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) comprende la posición 127 y la posición 128 de la SEC ID NO: 2, en donde el aminoácido en la posición 127 de la SEC ID NO: 2 es el aminoácido en la posición 127 de TGFβR2 de tipo salvaje (SEC ID NO: 1). Esto corresponde a las posiciones 8 y 9 de la SEC ID NO: 3, y a las posiciones 127 y 128 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento comprende de la posición 126 a la posición 128, de la posición 125 a la posición 128, de la posición 124 a la posición 128, de la posición 123 a la posición 128, de la posición 122 a la posición 128, de la posición 121 a la posición 128 o de la posición 120 a la posición 128 de la SEC ID NO: 2 o la SEC ID NO: 8 (que corresponden a la posición 7 a la posición 9, posición 6 a la posición 9, posición 5 a la posición 9, posición 4 a la posición 9, posición 3 a la posición 9, posición 2 a la

posición 9, o posición 1 a la posición 9 de la SEC ID NO: 3, respectivamente).

En particular, se espera que al menos los dos residuos de aminoácidos que unen con un puente la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de TGF β R2 (SEC ID NO: 1) y la
5 secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación por desplazamiento del marco de lectura, sean útiles para proporcionar un epítipo efectivo, y para que el péptido tenga una buena inmunogenicidad. En particular, las figuras 10 y 11
10 muestran que los péptidos que comprenden aminoácidos de la secuencia de tipo salvaje de TGF β R2 (SEC ID NO: 1) (es decir, fsp1 (SEC ID NO: 4), fsp2 (SEC ID NO: 5) y fsp5 (SEC ID NO: 3)) son más inmunogénicos que los péptidos que no comprenden aminoácidos de la secuencia de tipo salvaje de TGF β R2 (SEC ID
15 NO: 1) (es decir, fsp3 (SEC ID NO: 6) y fsp4 (SEC ID NO: 7)). También se espera que la presencia de más de un aminoácido de la secuencia de tipo salvaje de TGF β R2 (SEC ID NO: 1), consecutivos con al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación por desplazamiento del
20 marco de lectura, mejore probablemente la inmunogenicidad del péptido. En particular, se espera que cinco, seis, siete u ocho aminoácidos de la secuencia de tipo salvaje de TGF β R2 (SEC ID NO: 1), consecutivos con al menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos que resulta de la mutación por desplazamiento
25 del marco de lectura, sean particularmente útiles para la

inmunogenicidad del péptido.

Fsp1, fsp3, fsp5 y fsp6

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3, las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, o las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3. En este caso, el péptido comprende no más de 40 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos, el fragmento comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 40 aminoácidos, o el fragmento comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 33 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento comprende las posiciones 6 a 15, las posiciones 6 a 17, de la posición 2 a la posición 22 o de la posición 16 a la posición 33 de la SEC ID NO: 3. En algunas modalidades, el fragmento comprende las posiciones 6 a 15 de la SEC ID NO: 3, y el fragmento comienza en la posición seis desde el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el fragmento comprende las posiciones 6 a 17 de la SEC ID NO: 3, y el fragmento comienza en la posición seis desde el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el fragmento comprende las posiciones 2 a 15 de la SEC ID NO: 3, y el fragmento comienza en la posición dos desde el extremo N-terminal del péptido. En algunas

modalidades, el fragmento comprende de la posición 2 a la posición 22 de la SEC ID NO: 3, y el fragmento comienza en la posición dos desde el extremo N-terminal del péptido. En otras modalidades, el fragmento comprende de la posición 1 a la posición 17, o de la posición 1 a la posición 24, de la SEC ID NO: 3, y el fragmento es el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el fragmento comprende de la posición 16 a la posición 33 de la SEC ID NO: 3, y el fragmento comienza en la posición tres desde el extremo N-terminal del péptido.

En algunas modalidades, el fragmento comprende de la posición 14 a la posición 33 de la SEC ID NO: 3. En algunas modalidades, el fragmento comprende de la posición 14 a la posición 33 de la SEC ID NO: 3, y el fragmento es el extremo N-terminal del péptido.

En algunas modalidades, el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 26. En algunas modalidades, el fragmento consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 26. Cuando el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4, el péptido es referido en este documento como "fsp1". Cuando el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6, el péptido es referido en este documento como "fsp3". Cuando el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3, el péptido es referido en este documento como

"fsp5". Cuando el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 26, el péptido es referido en este documento como "fsp6".

En algunas modalidades, el péptido comprende un
5 fragmento que consiste de la SEC ID NO: 26 y el péptido
comprende uno o más aminoácidos adicionales en el extremo C-
terminal del fragmento. Por ejemplo, el péptido puede
comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete
aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del fragmento.
10 En algunas modalidades, el fragmento que consiste de la SEC ID
NO: 26 es el extremo N-terminal del péptido. En algunas
modalidades, el fragmento que consiste de la SEC ID NO: 26 es
el extremo N-terminal del péptido y el péptido comprende siete
aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del fragmento.
15 En otras modalidades, el fragmento que consiste de la SEC ID
NO: 26 es el extremo N-terminal del péptido y el péptido
consiste de siete aminoácidos adicionales en el extremo C-
terminal del fragmento. En algunas modalidades, uno o más
aminoácidos adicionales tienen al menos 70%, al menos
20 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos
95%, o tienen 100%, de identidad de la secuencia con
los aminoácidos correspondientes de la SEC ID NO: 2 y,
preferentemente, tienen 100% identidad de la secuencia
con los aminoácidos correspondientes de la SEC ID NO:
25 2.

Fsp2, fsp4, fsp6a y fsp1b

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) tiene una sustitución de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos que está presente de manera natural de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2). Por consiguiente, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) puede comprender al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, e incluye al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades el fragmento puede comprender al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, e incluye al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el péptido comprende solo una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8. En particular, las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8 corresponden a las posiciones 121 y 135 de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2), respectivamente, las cuales son ambos residuos de cisteína. Las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8 son de cisteína a cualquier otro aminoácido. Por consiguiente, el aminoácido en las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8 es, independientemente, uno de la alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En algunas modalidades, la sustitución de aminoácidos es por la glicina.

La sustitución de aminoácidos en la posición 121 y/o la 135 de la SEC ID NO: 8, de cisteína a cualquier otro aminoácido, es útil para prevenir los problemas con la producción, estabilidad, calidad e inmunología del péptido. En particular, los péptidos de la presente invención se derivan de la secuencia de consenso optimizada (SEC ID NO: 3), como se describirá en los ejemplos y como se muestra en la figura 1, y se ha descubierto que la secuencia de consenso optimizada puede ser difícil de sintetizar debido a su longitud. Además, la solubilidad, estabilidad e inmunogenicidad de la secuencia de consenso optimizada (SEC ID NO: 3) pueden ser inadecuadas. En particular, la presencia de uno o más residuos de cisteína en un péptido puede conducir a un reordenamiento molecular y/o a la polimerización del péptido, debido a la formación de enlaces de disulfuro inter y/o intramoleculares. Este reordenamiento y/o la polimerización pueden reducir la potencia inmunológica del péptido, y pueden inducir efectos secundarios inflamatorios no deseados, por ejemplo, por medio de la formación de anticuerpos y reacciones alérgicas. La sustitución de uno o más residuos de cisteína en el péptido reduce el riesgo de estos problemas potenciales. Por consiguiente, en algunas modalidades, la sustitución de uno o más residuos de cisteína de la secuencia de consenso optimizada mejora la facilidad de producción, la estabilidad, la calidad y la inmunología del péptido, pero tales sustituciones no son esenciales para la

presente invención. La figura 1 muestra cómo los péptidos que tienen las sustituciones de aminoácidos están relacionados con la secuencia de consenso optimizada.

Intervalo de posiciones para fsp2, fsp4, fsp6a y fsp1b

5 En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comprende de la posición 115 a la posición 122, de la posición 116 a la posición 123, de la posición 117 a la posición 124, de la posición 118 a la posición 125, de la posición 119 a la
10 posición 126, de la posición 120 a la posición 127, de la posición 121 a la posición 128, de la posición 128 a la posición 135, de la posición 129 a la posición 136, de la posición 130 a la posición 137, de la posición 131 a la posición 138, de la posición 132 a la posición 139, de la posición 133 a la posición
15 140, de la posición 134 a la posición 141 o de la posición 135 a la posición 142 de la SEC ID NO: 8.

 En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comprende de la posición 129 a la posición 137 de la SEC ID
20 NO: 8.

 En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comprende de la posición 115 a la posición 126, de la posición 116 a la posición 127, de la posición 117 a la posición 128,
25 de la posición 118 a la posición 129, de la posición 119 a la

posición 130, de la posición 120 a la posición 131, de la
posición 121 a la posición 132, de la posición 124 a la posición
135, de la posición 125 a la posición 136, de la posición 126
a la posición 137, de la posición 127 a la posición 138, de la
5 posición 128 a la posición 139, de la posición 129 a la posición
140, de la posición 130 a la posición 141, de la posición 131
a la posición 142, de la posición 132 a la posición 143, de la
posición 133 a la posición 144, de la posición 134 a la posición
145 o de la posición 135 a la posición 146 de la SEC ID NO: 8.

10 En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO:
2) que tiene una sustitución de aminoácidos comprende de la
posición 115 a la posición 129, de la posición 116 a la posición
130, de la posición 117 a la posición 131, de la posición 118
a la posición 132, de la posición 119 a la posición 133, de la
15 posición 120 a la posición 134, de la posición 121 a la posición
135, de la posición 122 a la posición 136, de la posición 123
a la posición 137, de la posición 124 a la posición 138, de la
posición 125 a la posición 139, de la posición 126 a la posición
140, de la posición 127 a la posición 141, de la posición 128
20 a la posición 142, de la posición 129 a la posición 143, de la
posición 130 a la posición 144, de la posición 131 a la posición
145, de la posición 132 a la posición 146, de la posición 133
a la posición 147, de la posición 134 a la posición 148 o de
la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8. En algunas
25 modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende

de la posición 119 a la posición 130, de la posición 119 a la posición 133, de la posición 120 a la posición 131, de la posición 120 a la posición 134, de la posición 121 a la posición 132, de la posición 121 a la posición 135, de la posición 133 a la posición 144, de la posición 133 a la posición 147, de la posición 134 a la posición 145, de la posición 134 a la posición 148, de la posición 135 a la posición 146, o de la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8.

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos consiste de la posición 115 a la posición 122, de la posición 115 a la posición 126, de la posición 115 a la posición 129, de la posición 116 a la posición 123, de la posición 116 a la posición 127, de la posición 116 a la posición 130, de la posición 117 a la posición 124, de la posición 117 a la posición 128, de la posición 117 a la posición 131, de la posición 118 a la posición 125, de la posición 118 a la posición 129, de la posición 118 a la posición 132, de la posición 119 a la posición 126, de la posición 119 a la posición 130, de la posición 119 a la posición 133, de la posición 120 a la posición 127, de la posición 120 a la posición 131, de la posición 120 a la posición 134, de la posición 121 a la posición 128, de la posición 121 a la posición 132, de la posición 121 a la posición 135, de la posición 122 a la posición 136, de la posición 123 a la posición 137, de la posición 124 a la posición 135, de la posición 124

a la posición 138, de la posición 125 a la posición 136, de la posición 125 a la posición 139, de la posición 126 a la posición 137, de la posición 126 a la posición 140, de la posición 127 a la posición 138, de la posición 127 a la posición 141, de la posición 128 a la posición 135, de la posición 128 a la posición 139, de la posición 128 a la posición 142, de la posición 129 a la posición 136, de la posición 129 a la posición 140, de la posición 129 a la posición 143, de la posición 130 a la posición 137, de la posición 130 a la posición 141, de la posición 130 a la posición 144, de la posición 131 a la posición 138, de la posición 131 a la posición 142, de la posición 131 a la posición 145, de la posición 132 a la posición 139, de la posición 132 a la posición 143, de la posición 132 a la posición 146, de la posición 133 a la posición 140, de la posición 133 a la posición 144, de la posición 133 a la posición 147, de la posición 134 a la posición 141, de la posición 134 a la posición 145, de la posición 134 a la posición 148, de la posición 135 a la posición 142, de la posición 135 a la posición 146 o de la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8.

Fsp2 y fsp6a (y fsp5 con una sustitución de C a G)

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende la posición 121, pero no la posición 135, de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el péptido comprende al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o tiene 100%, de identidad de

la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas de tales modalidades, el péptido comprende 100% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas modalidades, el péptido comprende no más de 33 aminoácidos, no más de 24 aminoácidos o no más de 17 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido consiste de 33 aminoácidos. En otras modalidades, el péptido consiste de 24 aminoácidos. En otras modalidades, el péptido consiste de 17 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende de la posición 119 a la posición 126, de la posición 120 a la posición 127 o de la posición 121 a la posición 128 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende de la posición 119 a la posición 130, de la posición 120 a la posición 131 o de la posición 121 a la posición 132 de la SEC ID NO: 8. En otras modalidades, el fragmento comprende de la posición 119 a la posición 133, de la posición 120 a la posición 134 o de la posición 121 a la posición 135 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento consiste de la posición 119 a la posición 130, de la posición 119 a la posición 133, de la posición 120 a la posición 131, de la posición 120 a la posición 134, de la posición 121 a la posición 132 o de la posición 121 a la posición 135 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comienza en la posición uno, dos o

tres desde el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el fragmento es el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, la posición 121 de la SEC ID NO: 8 es la glicina.

5 En algunas modalidades, el péptido comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos, en donde el fragmento consiste de la posición 119 a la posición 126, de la posición 120 a la posición 127 o de la posición 121 a la posición 128 de la SEC ID NO: 8, en
10 donde la posición 121 de la SEC ID NO: 8 es la glicina, y en donde el péptido tiene 100% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento y comprende no más de 33 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido comprende un
15 fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos, en donde el fragmento consiste de la posición 119 a la posición 130, de la posición 119 a la posición 133, de la posición 120 a la posición 131, de la posición 120 a la
20 posición 134, de la posición 121 a la posición 132 o de la posición 121 a la posición 135 de la SEC ID NO: 8, en donde la posición 121 de la SEC ID NO: 8 es la glicina, y en donde el péptido tiene 100% de identidad de la secuencia con la SEC ID
NO: 2 fuera del fragmento y comprende no más de 33 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento es el extremo N-terminal del péptido. En algunas de tales modalidades, el péptido
25 consiste de 33 aminoácidos. En otras modalidades, el péptido

consiste de 24 aminoácidos, y el péptido puede consistir de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5. Los péptidos que consisten de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5 son referidos en este documento como "fsp2". En otras 5 modalidades, el péptido consiste de 17 aminoácidos, y el péptido puede consistir de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 28. Los péptidos que consisten de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 28 son referidos en este documento como "fsp6a".

10 En algunas modalidades, el péptido comprende un fragmento que consiste de la SEC ID NO: 28 y el péptido comprende uno o más aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del fragmento. Por ejemplo, el péptido puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete 15 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del fragmento. En algunas modalidades, el fragmento que consiste de la SEC ID NO: 28 es el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el fragmento que consiste de la SEC ID NO: 28 es el extremo N-terminal del péptido y el péptido comprende siete 20 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del fragmento. En otras modalidades, el fragmento que consiste de la SEC ID NO: 28 es el extremo N-terminal del péptido y el péptido consiste de siete aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal del fragmento. En algunas modalidades, uno o más 25 aminoácidos adicionales tienen al menos 70%, al menos 75%, al

menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o tienen 100%, de identidad de la secuencia con los aminoácidos correspondientes de la SEC ID NO: 2 y, preferentemente, tienen 100% de identidad de la secuencia con los aminoácidos correspondientes de la SEC ID NO: 2.

Fsp4 y fsp1b

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comprende la posición 135, pero no la posición 121, de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el péptido comprende al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o tiene 100%, de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas modalidades, el péptido comprende no más de 20 aminoácidos, mientras que en otras modalidades el péptido consiste de 20 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido comprende no más de 9 aminoácidos, mientras que en otras modalidades el péptido consiste de 9 aminoácidos.

En algunas modalidades, el fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) comprende de la posición 129 a la posición 136, de la posición 130 a la posición 137, de la posición 133 a la posición 140, de la posición 134 a la posición 141 o de la posición 135 a la posición 142 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) comprende de la posición 129 a la posición 137, de la posición 133 a la

posición 144, de la posición 134 a la posición 145 o de la posición 135 a la posición 146 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comprende de la posición 133 a la posición 147, de la posición 134 a la posición 148 o de la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos consiste de la posición 129 a la posición 136, de la posición 130 a la posición 137, de la posición 133 a la posición 144, de la posición 133 a la posición 147, de la posición 134 a la posición 145, de la posición 134 a la posición 148, de la posición 135 a la posición 146 o de la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos comienza en la posición uno, dos o tres del extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos es el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, la posición 135 de la SEC ID NO: 8 es la glicina.

En algunas modalidades, el péptido comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos, en donde el fragmento consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 30. En algunas modalidades, el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID

NO: 30, y tales péptidos son referidos en este documento como "fsp1b".

En algunas modalidades, el péptido comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que tiene una sustitución de aminoácidos, en donde el fragmento consiste de la posición 133 a la posición 140, de la posición 133 a la posición 144, de la posición 133 a la posición 147, de la posición 134 a la posición 141, de la posición 134 a la posición 145, de la posición 134 a la posición 148, de la posición 135 a la posición 142, de la posición 135 a la posición 146 o de la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8, en donde la posición 135 de la SEC ID NO: 8 es la glicina, y en donde el péptido tiene 100% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento y comprende no más de 20 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento es el extremo N-terminal del péptido. En algunas modalidades, el péptido consiste de 20 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7, y tales péptidos son referidos en este documento como "fsp4".

20 **Fsp1a**

La invención también proporciona péptidos de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) para su uso en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, en donde el péptido comprende un fragmento de la SEC ID NO: 2, en donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29 y en donde el

péptido comprende no más de 21 aminoácidos.

En algunas modalidades, el péptido de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2) comprende no más de 17 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido comprende no más de 9 aminoácidos. En
5 otras modalidades, el péptido consiste de 21, 17 o 9 aminoácidos. En algunas modalidades, el péptido comprende al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas modalidades,
10 el fragmento consiste de la secuencia de la SEC ID NO: 29.

En algunas modalidades, el péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29, y tales péptidos son referidos en este documento como "fspla".

Como se describirá en el ejemplo 8, se espera que la
15 secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29 sea inmunogénica en vista de la diferencia en la inmunogenicidad de las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 26 y la SEC ID NO: 27, y las similitudes y diferencias entre estas secuencias de aminoácidos. De manera semejante, se espera que la secuencia
20 de aminoácidos de la SEC ID NO: 30, que es idéntica a la SEC ID NO: 29 excepto por una sustitución de aminoácidos de C a G, también sea inmunogénica, ya que se ha demostrado que una sustitución de C a G es inmunológicamente aceptable.

Los péptidos de la presente invención, y el péptido
25 para su uso de acuerdo con la presente invención, son péptidos

que corresponden a los fragmentos de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) exhibidos por las moléculas de MHC I o MHC II sobre la superficie de las células y/o a los individuos que generalmente tienen un linfocito T reactiva en su repertorio de linfocitos

5 T. El péptido es capaz de inducir una respuesta inmunológica contra una proteína mutante con desplazamiento del marco de lectura de -1a de TGF β R2 y, preferentemente, la respuesta inmunológica es una respuesta de los linfocitos T, que comprenden tanto los linfocitos T restringidos por MHC-I, tales

10 como los linfocitos T CD8+, como los linfocitos T restringidos por MHC-II, tales como los linfocitos T CD4+. En particular, los péptidos pueden abarcar múltiples epítomos anidados, de tal modo que cada péptido puede comprender epítomos para más de un alelo de MHC. Esto proporciona la ventaja de que los

15 péptidos son capaces de inducir una respuesta inmunológica en los pacientes que tienen diferentes alelos de MHC, de tal modo que los péptidos son útiles como un tratamiento y/o vacuna universales.

Mezcla de péptidos

20 La invención también proporciona mezclas de los péptidos descritos anteriormente, en donde la mezcla de péptidos comprende dos o más péptidos diferentes. Las mezclas de péptidos comprenden un primer y un segundo péptidos, en donde el primer y el segundo péptidos son péptidos como se

25 describieron anteriormente, y el primer péptido es diferente

del segundo péptido. En algunas modalidades, el primer péptido comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3, comprende al menos 8 o al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8 incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8, o comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 29, y el segundo péptido, independientemente, comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) que comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3, comprende al menos 8 o al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8 incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8, o comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 29, en donde el segundo péptido es diferente del primer péptido. En algunas modalidades, el primer péptido comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2), en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3 o comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8 incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8, y el segundo péptido es un péptido para su uso en el tratamiento

y/o profilaxis del cáncer como se describió anteriormente, en donde el fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 29. En algunas modalidades, cada uno del primer y segundo péptidos se
5 seleccionan independientemente de un péptido que comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2), en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3, o comprende al menos 8
10 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8 incluyendo al menos una de las posiciones 121 y 135 de la SEC ID NO: 8.

En algunas modalidades, la mezcla de péptidos comprende un primer péptido y un segundo péptido, en donde el primer péptido comprende un fragmento de la SEC ID NO: 8 que
15 comprende la posición 121 pero no la posición 135 de la SEC ID NO: 8, y el segundo péptido comprende un fragmento de la SEC ID NO: 8 que comprende la posición 135 pero no la posición 121 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el primer péptido comprende no más de 33, 24 o 17 aminoácidos y tiene 100% de
20 identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas modalidades, el fragmento de la SEC ID NO: 8 del primer péptido comprende, o puede consistir de, de la posición 119 a la posición 126, de la posición 119 a la posición 130, de la posición 119 a la posición 133, de la
25 posición 120 a la posición 127, de la posición 120 a la posición

131, de la posición 120 a la posición 134, de la posición 121 a la posición 128, de la posición 121 a la posición 132 o de la posición 121 a la posición 135 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el primer péptido comprende un residuo de glicina en la posición 121 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el segundo péptido comprende no más de 20 aminoácidos y tiene 100% de identidad de la secuencia con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento. En algunas modalidades, el fragmento de la SEC ID NO: 8 del segundo péptido comprende y, preferentemente, consiste de, de la posición 129 a la posición 136, de la posición 130 a la posición 137, de la posición 129 a la posición 137, de la posición 133 a la posición 140, de la posición 133 a la posición 144, de la posición 133 a la posición 147, de la posición 134 a la posición 141, de la posición 134 a la posición 145, de la posición 134 a la posición 148, de la posición 135 a la posición 142, de la posición 135 a la posición 146 o de la posición 135 a la posición 149 de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el segundo péptido comprende un residuo de glicina en la posición 135 de la SEC ID NO: 8.

En algunas modalidades, el primer y segundo péptidos, independientemente, consisten de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 26, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 29 o SEC ID NO: 30. En algunas modalidades, el primer péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5, y

el segundo péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7.

En otras modalidades, el primer péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5 y el segundo péptido consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 7. En particular, la figura 11 muestra que algunos donadores exhibieron una mayor respuesta a una mezcla de la SEC ID NO: 5 y la SEC ID NO: 7 (es decir, fsp2 y fsp4) que a la SEC ID NO: 5 o la SEC ID NO: 7 solas, después de dos rondas de estimulación.

Las mezclas de péptidos pueden comprender uno o más péptidos adicionales, además del primer y segundo péptidos, los cuales pueden ser uno o más péptidos como se describieron anteriormente. Uno o más péptidos adicionales son diferentes de cada uno del primer y el segundo péptidos. Cuando la mezcla de péptidos comprende más de un péptido adicional, los péptidos adicionales son diferentes entre sí.

Las mezclas de péptidos pueden contener los péptidos en proporciones iguales o diferentes. En algunas modalidades, el primer y segundo péptidos están presentes en la mezcla en proporciones iguales, es decir, cada péptido comprende 50% del componente peptídico de la mezcla de péptidos. En otras modalidades, existe una mayor proporción del primer péptido en la mezcla de péptidos que del segundo péptido. Por ejemplo, el primer péptido puede comprender al menos 55%, al menos 60%, al

menos 70%, al menos 80% o al menos 90% del componente peptídico de la mezcla de péptidos. En las modalidades alternativas, existe una mayor proporción del segundo péptido en la mezcla de péptidos que del primer péptido. Por ejemplo, el segundo

5 péptido puede comprender al menos 55%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% del componente peptídico de la mezcla de péptidos. En las modalidades que comprenden al menos un péptido adicional, los péptidos están presentes en el componente peptídico de la mezcla de péptidos en proporciones

10 iguales. En otras modalidades, el primer, segundo y al menos un péptido adicional están presentes en diferentes proporciones entre sí. Por ejemplo, cada uno del primer, segundo y al menos un péptido adicional pueden comprender independientemente al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos

15 30%, al menos 40%, al menos 50 %, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% del componente peptídico de la mezcla de péptidos.

Ácidos nucleicos

En otro aspecto de la presente invención, se

20 proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido, o un péptido de una mezcla de péptidos, de acuerdo con las descripciones anteriores. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica

25 al menos dos péptidos de la mezcla de péptidos. También se

proporciona una mezcla de moléculas de ácidos nucleicos, en donde cada molécula de ácido nucleico de la mezcla comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido diferente de una mezcla de péptidos de acuerdo con las descripciones
5 anteriores, de tal modo que la mezcla de moléculas de ácidos nucleicos codifique la mezcla de péptidos de las descripciones anteriores. En algunas modalidades de la mezcla de moléculas de ácidos nucleicos, cada molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos dos péptidos
10 de la mezcla de péptidos.

En algunas modalidades, las moléculas de ácidos nucleicos y las mezclas de moléculas de ácidos nucleicos se usan para sintetizar los péptidos y las mezclas de péptidos de las descripciones anteriores. Por ejemplo, un péptido de las
15 descripciones anteriores puede ser sintetizado por medio de la administración de una molécula de ácido nucleico a un sujeto, después de lo cual la molécula de ácido nucleico es expresada por el sujeto, dando lugar así a un péptido de las descripciones anteriores *in situ*. El péptido producido provoca entonces una
20 respuesta inmunológica en el sujeto. En otro ejemplo, se puede usar la molécula de ácido nucleico para sintetizar un péptido de las descripciones anteriores, *in vitro*, transformando o transfectando una célula hospedera con la molécula de ácido nucleico, de tal modo que la célula hospedera exprese la
25 molécula de ácido nucleico para producir el péptido de las

descripciones anteriores. Luego, el péptido se recupera y se purifica. En algunas modalidades, los péptidos de las descripciones anteriores se producen por medio de la síntesis química, usando los métodos bien conocidos en la técnica.

5 **Linfocitos T y mezclas de linfocitos T**

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un linfocito T no transfectado, y una preparación de linfocitos T no transfectadas que comprende una o más linfocitos T no transfectadas, específicas para un péptido, o
10 un péptido para su uso, de acuerdo con las descripciones anteriores. Se proporciona además una mezcla de linfocitos T no transfectadas que comprende linfocitos T no transfectadas específicas para cada uno de los péptidos en una de las mezclas de péptidos de las descripciones anteriores.

15 El linfocito T no transfectado, la preparación de linfocitos T no transfectadas y la mezcla de linfocitos T no transfectadas pueden ser *ex vivo* y se pueden producir estimulando, *ex vivo*, al menos un linfocito T reactiva no transfectado con un péptido o una mezcla de péptidos de acuerdo
20 con las descripciones anteriores. Por ejemplo, en una modalidad, el linfocito T no transfectado es específica para un péptido que comprende un fragmento de la SEC ID NO: 8, en donde el fragmento comprende al menos 8 o al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo al
25 menos una de la posición 121 y la posición 135 de la SEC ID

NO: 8. En otra modalidad, el linfocito T no transfectado es específica para un péptido que comprende un fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2), en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13, las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, o
5 las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3, en donde el péptido comprende no más de 40 aminoácidos; o el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos. En otras modalidades, la célula no transfectada es específica para un péptido que
10 comprende un fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2), en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos; o el fragmento comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 40 aminoácidos; o el fragmento
15 comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 33 aminoácidos; o el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos. En otra modalidad, la preparación de linfocitos T no transfectadas comprende una o
20 más linfocitos T no transfectadas específicas para un péptido que comprende un fragmento de mutTGFβR2 (SEC ID NO: 2), en donde el fragmento comprende una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEC ID NO: 2 y comprende al menos 8 o al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8,
25 incluyendo al menos una de la posición 121 y la posición 135

de la SEC ID NO: 8; o en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3 o las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3, y el péptido comprende no más de 40 aminoácidos; o en donde el fragmento comprende las posiciones 5 18 a 33 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 40 aminoácidos; o en donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos. En otra modalidad, la preparación de linfocitos T no transfectadas comprende una o más linfocitos T 10 no transfectadas específicas para un péptido que comprende un fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2), en donde el fragmento comprende una sustitución de aminoácidos en comparación con la SEC ID NO: 2 y comprende al menos 8 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo al menos una de la posición 121 15 y la posición 135 de la SEC ID NO: 8; o en donde el fragmento comprende las posiciones 6 a 13 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos; o en donde el fragmento comprende las posiciones 7 a 22 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 40 aminoácidos; o en donde el fragmento 20 comprende las posiciones 18 a 33 de la SEC ID NO: 3 y el péptido comprende no más de 33 aminoácidos, o en donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 29 y el péptido comprende no más de 21 aminoácidos. En otra modalidad, la mezcla de linfocitos T no transfectadas comprende una 25 pluralidad de linfocitos T no transfectadas, en donde una

primera y una segunda linfocitos T no transfectadas son específicas para un primer y un segundo péptidos de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2) de acuerdo con las descripciones anteriores, respectivamente, en donde el primer péptido es diferente del
5 segundo péptido.

Cuando el receptor de linfocitos T de cualquier linfocito T descrita en este documento es un receptor de linfocitos T $\alpha\beta$, entonces el receptor de linfocitos T es específico para el péptido cuando se presenta sobre una
10 molécula de MHC. Cuando el receptor de linfocitos T de cualquier linfocito T descrita en este documento es un receptor de linfocitos T $\gamma\delta$, entonces el receptor de linfocitos T no requiere necesariamente la presentación del péptido sobre una molécula de MHC para reconocer el péptido.

15 **Vector y célula hospedera**

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o una mezcla de péptidos de las
20 descripciones anteriores. En algunas modalidades, el vector es un vector de ADN o un vector de ARN.

En un aspecto adicional, se proporciona una célula hospedera que comprende un vector como se describió anteriormente. La célula hospedera se transfecta o transforma
25 con el vector, de tal modo que la célula hospedera exprese

la(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) codificada(s) por el vector. La célula hospedera puede ser cualquier tipo de célula que pueda ser transfectada con un vector y que exprese el vector. En algunas modalidades, la célula hospedera es una
5 célula vegetal, una célula animal, un microorganismo, o una célula de levadura. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula dendrítica.

Composiciones farmacéuticas

También se proporcionan composiciones farmacéuticas
10 que comprenden los péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T no transfectadas, mezclas de linfocitos T no transfectadas, preparaciones de linfocitos T no transfectadas, moléculas de ácidos nucleicos, vectores o células hospederas, descritos anteriormente. Tales composiciones farmacéuticas también
15 pueden comprender al menos un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende además uno o más ingredientes activos y/o adyuvantes adicionales. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica puede
20 comprender además uno o más ingredientes terapéuticamente efectivos para la misma indicación de la enfermedad. En una modalidad, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales, una o más vacunas contra el cáncer, uno o más
25 anticuerpos, una o más moléculas pequeñas y/o uno o más

estimulantes inmunológicos (por ejemplo, citoquinas). En algunas modalidades, el péptido, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, ácido nucleico, vector, célula hospedera o la composición farmacéutica, se pueden usar en combinación con otras formas de inmunoterapia, incluyendo otras vacunas contra el cáncer. En algunas modalidades, el péptido, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, ácido nucleico, vector, célula hospedera o la composición farmacéutica, se usan en combinación con una o más vacunas contra el cáncer derivadas de un antígeno contra el cáncer diferente.

15 **Uso**

Los péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T no transfectadas, preparaciones de linfocitos T no transfectadas, mezclas de linfocitos T no transfectadas, moléculas de ácidos nucleicos, vectores, células hospederas y composición farmacéutica, descritos anteriormente, son para su uso en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, y en particular cánceres asociados con una mutación por desplazamiento del marco de lectura, preferentemente una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a, en TGF β R2. En particular, aproximadamente 10% de todos los CCR, y aproximadamente 44% de

todos los cánceres MSI-H, tienen una mutación por desplazamiento del marco de lectura en TGF β R2. El cáncer puede ser el cáncer colorrectal o el cáncer de estómago. El cáncer colorrectal puede ser el cáncer de colon o el cáncer de recto.

5 Los péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T no transfectadas, preparaciones de linfocitos T no transfectadas, mezclas de linfocitos T no transfectadas, moléculas de ácidos nucleicos, vectores y células hospederas, se pueden usar para el tratamiento y/o profilaxis de más de uno de estos tipos de

10 cáncer. En particular, los péptidos, mezclas de péptidos, linfocitos T no transfectadas, preparaciones de linfocitos T no transfectadas, mezclas de linfocitos T no transfectadas, moléculas de ácidos nucleicos, vectores y células hospederas de las descripciones anteriores, se pueden usar para tratar

15 aproximadamente 10% de todos los cánceres colorrectales (es decir, todos los CCR hereditarios y espontáneos), incluyendo aproximadamente 85.5% de todos los cánceres colorrectales hereditarios, y aproximadamente 18% de todos los cánceres de estómago. Por consiguiente, la presente invención proporciona

20 un tratamiento efectivo para una gran proporción de cánceres, particularmente el cáncer colorrectal y el cáncer de estómago, y más particularmente, el cáncer colorrectal hereditario.

En algunas modalidades, un péptido que comprende un fragmento de la SEC ID NO: 8, en donde el fragmento comprende

25 al menos 8 o al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID

NO: 8, incluyendo la posición 121 de la SEC ID NO: 8, en donde el péptido comprende no más de 33 aminoácidos, es particularmente útil para el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, el péptido comprende un fragmento de la SEC ID

5 NO: 8, en donde el fragmento comprende al menos 8 o al menos 12 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8, incluyendo la posición 121, pero no la posición 135, de la SEC ID NO: 8, en donde el aminoácido en la posición 121 de la SEC ID NO: 8 es la glicina, y el péptido tiene 100% de identidad de la secuencia

10 con la SEC ID NO: 2 fuera del fragmento de mutTGF β R2 (SEC ID NO: 2). En algunas modalidades, el péptido consiste de 17, 24 o 33 aminoácidos, y el fragmento de la SEC ID NO: 8 consiste de 8, 10, 12 o 15 aminoácidos consecutivos de la SEC ID NO: 8. En algunas modalidades, el péptido consiste de la secuencia de

15 aminoácidos de la SEC ID NO: 5. En particular, se ha descubierto que el péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5 (es decir, fsp2) es particularmente útil como una vacuna o tratamiento contra el cáncer porque es completamente desconocido para el sistema inmunológico humano

20 y es capaz de inducir una respuesta inmunológica no solamente por sí mismo sino también para la secuencia correspondiente que está presente de manera natural (es decir, SEC ID NO: 4; fsp1), como se muestra en la figura 11. En otras palabras, fsp2 presenta una reacción cruzada para mutTGF β R2 que está presente

25 de manera natural. La figura 11 muestra los resultados de la

estimulación de los donadores con una mezcla de péptidos que consiste de la SEC ID NO: 5 y la SEC ID NO: 7 (es decir, fsp2 y fsp4), y el donador 3, por ejemplo, exhibió una respuesta inmunológica al péptido de la SEC ID NO: 4 (es decir, fsp1; un
5 fragmento de mutTGF β R2 que está presente de manera natural) así como a la SEC ID NO: 5 (es decir, fsp2).

Los péptidos de las SEC ID NO: 3, 4, 7, 26, 28, 29 y
30 también son particularmente útiles como una vacuna o tratamiento contra el cáncer. Las figuras 11 y 12 muestran que
10 los linfocitos T inducidas a partir de PBMC usando una mezcla de la SEC ID NO: 5 (es decir, fsp2) y la SEC ID NO: 7 (es decir, fsp4), son estimuladas por la SEC ID NO: 3 (es decir, fsp5), la SEC ID NO: 4 (es decir, fsp1) y la SEC ID NO: 7 (es decir, fsp4), así como la SEC ID NO: 5 (es decir, fsp2), lo
15 que significa que estos péptidos también son inmunogénicos y son útiles como una vacuna o tratamiento contra el cáncer. Además, la figura 13 muestra que los linfocitos T inducidas a partir de PMBC usando el péptido de la SEC ID NO: 5 (es decir, fsp2), son estimuladas por el péptido de la SEC ID NO: 26 (es
20 decir, fsp6), de tal modo que fsp6 (SEC ID NO: 26) también puede ser usado como una vacuna o tratamiento contra el cáncer.

La figura 13 también muestra que se espera que fsp6a (SEC ID NO: 28), que tiene una sola sustitución de aminoácidos de C a G en comparación con fsp6 (SEC ID NO: 26), sea
25 inmunogénico en vista de la figura 11, que muestra que tanto

fsp1 como fsp2 son inmunogénicos. Como se mencionó anteriormente, fsp2 (SEC ID NO: 5) es capaz de inducir una respuesta inmunológica tanto por sí mismo como para la secuencia correspondiente que está presente de manera natural (SEC ID NO: 4, fsp1), lo que demuestra que una sustitución de aminoácidos de C a G en fsp2 en comparación con fsp1 es inmunológicamente aceptable. Por lo tanto, se espera que una sustitución de aminoácidos de C a G correspondiente en fsp6 (como se muestra en fsp6a) no comprometa la inmunogenicidad de tal péptido modificado.

Además, la figura 13 muestra que la actividad inmunogénica completa de fsp2 (SEC ID NO: 5) puede ser lograda agregando al menos un aminoácido al extremo C-terminal de fsp6 (SEC ID NO: 26) o fsp6a (SEC ID NO: 28), hasta la longitud completa de fsp2 (SEC ID NO: 5; es decir, hasta siete aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal). Además, la figura 13 muestra que fsp7 (SEC ID NO: 27) está demasiado truncado en el extremo N-terminal en comparación con fsp2 (SEC ID NO: 5) para ser inmunogénico. Por lo tanto, para que un péptido sea inmunogénico contra mutTGF β R2, el mismo debe comprender al menos un aminoácido adicional en el extremo N-terminal de fsp7 (SEC ID NO: 27).

Además, y como se describió anteriormente, la figura 13 muestra que se espera que fsp1a (SEC ID NO: 29) y fsp1b (SEC ID NO: 30) sean inmunogénicos en vista de la diferencia en la

inmunogenicidad de las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 26 y la SEC ID NO: 27, y las similitudes y diferencias entre estas secuencias de aminoácidos.

El linfocito T no transfectado, o los linfocitos T
5 no transfectadas en la preparación de linfocitos T o la mezcla de linfocitos T, para su uso en el tratamiento y/o profilaxis del cáncer, pueden ser autólogas o alogénicas. Por ejemplo, se pueden administrar linfocitos T heterólogas a un paciente cuando los linfocitos T son de un donador que tiene un
10 repertorio de HLA idéntico o semejante a aquel del paciente.

El péptido, péptido para su uso, mezcla de péptidos, vector, célula hospedera o composición farmacéutica de la invención, se pueden administrar a un sujeto por medio de cualquier técnica de suministro adecuada conocida por aquellas
15 personas expertas en la técnica. Por ejemplo, entre otras técnicas, el péptido, mezcla de péptidos o composición farmacéutica, se pueden administrar a un sujeto por medio de una inyección, en la forma de una solución, en la forma de liposomas o en forma seca (por ejemplo, en la forma de partículas
20 recubiertas, etc.). La célula hospedera puede ser administrada, por ejemplo, por medio de la transfusión. El vector puede ser administrado, por ejemplo, por medio de una inyección por vía subcutánea o en el tumor. En algunas modalidades, el péptido, mezcla de péptidos o composición farmacéutica, se pueden
25 administrar en una cantidad, por ejemplo, entre 1 µg y 1 g de

cada péptido una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez al mes, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses o una vez cada seis meses. En algunas modalidades, la cantidad neta de cada péptido por dosis es de 60 nM. Por ejemplo, para la
5 inyección intradérmica, cada péptido puede estar presente en un volumen de 0.1 ml a una concentración de 0.6 mM.

En algunas modalidades, el péptido o la mezcla de péptidos se administran con un adyuvante o estimulador inmunológico, tal como GM-CSF. En las modalidades que usan GM-
10 CSF, este puede ser cualquier GM-CSF, por ejemplo, GM-CSF glicosilado o GM-CSF no glicosilado. El GM-CSF puede ser administrado en una cantidad entre 0.5 y 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 1 y 120 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 2 y 115 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 3 y 110 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 4 y 105 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 5 y 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 6 y 95 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 7 y
15 90 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 48 y 85 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 9 y 80 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 10 y 75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 11 y 70 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 12 y 65 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 13 y 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 14 y 55 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 15 y 50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 16 y 45 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, entre 17 y 40 $\mu\text{g}/\text{m}^2$, o entre 18 y 40 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ de área de superficie corporal. En algunas modalidades, GM-CSF se
20 administra en una dosificación entre 1 μg y 200 μg , entre 5 μg y 175 μg , entre 5 μg y 150 μg , entre 5 μg y 125 μg , entre 5 μg y 100 μg , entre 10 μg y 100 μg , entre 20 μg y 90 μg , entre 25 μg y 80 μg , entre 25 μg y 70 μg , entre 25 μg y 65 μg , o entre 30 μg y 60 μg , por dosis. En algunas modalidades, el GM-CSF no
25 glicosilado se administra a una dosificación de 30 μg por

dosis. En otras modalidades, el GM-CSF glicosilado se administra a una dosificación de 60 μ g por dosis. En las modalidades en donde se administra GM-CSF por medio de una inyección intradérmica, la dosis puede ser una solución de 0.1 ml que
5 contiene GM-CSF a una concentración de 0.3 mg/ml o 0.6 mg/ml. En algunas modalidades, el péptido, mezcla de péptidos o composición farmacéutica, se pueden administrar en una cantidad, por ejemplo, entre 1 μ g y 1 g de cada péptido una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez al mes, una vez cada tres meses, una vez
10 cada cuatro meses o una vez cada seis meses.

Los linfocitos T no transfectadas, las mezclas de linfocitos T no transfectadas y las preparaciones de linfocitos T no transfectadas de la presente invención, se pueden administrar por medio de una inyección intravenosa y/o
15 infusión, y se pueden administrar en una cantidad, por ejemplo, entre 10^6 y 10^{12} de cada linfocito T no transfectado específica para un péptido de la mezcla de péptidos, o el péptido una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses o una vez al año. Preferentemente, la
20 dosificación se administra una vez al mes durante entre 2 y 5 meses y subsiguientemente se administra con menos frecuencia.

El ácido nucleico y la mezcla de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden administrar por medio de una inyección intramuscular y/o una inyección subcutánea.

25 La administración de un péptido, un péptido para su

uso o una mezcla de péptidos de la presente invención a un sujeto, o la expresión del péptido o la mezcla de péptidos por un sujeto, provocan una respuesta inmunológica al péptido o la mezcla de péptidos, en particular una respuesta inmunológica
5 mediada por los linfocitos T. El péptido, o cada péptido de la mezcla de péptidos, pueden ser procesados por una célula presentadora del antígeno (APC) y pueden ser presentados sobre una molécula de MHC. Los linfocitos T $\alpha\beta$ se activan por medio de la unión del receptor de linfocitos T a un péptido presentado
10 sobre una molécula de MHC por la APC, lo que conduce a una respuesta inmunológica contra los linfocitos Tumorales que tienen una mutación que corresponde a aquella presente en el(los) péptido(s) administrado(s). Los linfocitos T $\gamma\delta$ no requieren necesariamente el procesamiento de antígenos o la
15 presentación del antígeno por medio de las moléculas de MHC.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un péptido, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, molécula de ácido nucleico o
20 una composición farmacéutica, para su uso en un método que comprende el diagnóstico de cáncer y la selección de un tratamiento apropiado. El método comprende las etapas de (i) identificar si un paciente con cáncer es MSI-H y, de ser así, (ii) seleccionar un péptido, mezcla de péptidos, linfocito T
25 no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas,

mezcla de linfocitos T no transfectadas, molécula de ácido nucleico o composición farmacéutica, de acuerdo con las descripciones anteriores. En algunas modalidades, el método comprende, además, en la etapa (i), probar si el paciente tiene
5 una mutación por desplazamiento del marco de lectura en la proteína de TGF β R2 y, de ser así, seleccionar un péptido, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, molécula de ácido nucleico o composición
10 farmacéutica, de acuerdo con las descripciones anteriores. En alguna modalidad, la mutación por desplazamiento del marco de lectura es una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a. En algunas modalidades, el método comprende además (iii) administrar al paciente el péptido, mezcla de péptidos,
15 linfocito T, preparación de linfocitos T, mezcla de linfocitos T no transfectadas, molécula de ácido nucleico o composición farmacéutica seleccionados. Se prevé que cualquiera de los péptidos, mezcla de péptidos, linfocitos T no transfectadas, preparaciones de linfocitos T no transfectadas, mezclas de
20 linfocitos T no transfectadas, moléculas de ácidos nucleicos o composiciones farmacéuticas descritos anteriormente puedan ser usados para tratar los cánceres asociados con MSI-H, más específicamente los cánceres asociados con una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a en TGF β R2, porque
25 todos los péptidos corresponden a la misma proteína.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar y/o prevenir el cáncer que comprende administrar un péptido, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, molécula de ácido nucleico o composición farmacéutica, de acuerdo con las descripciones anteriores, a un paciente que lo necesita. El método puede comprender las etapas de (i) identificar a un paciente con cáncer como MSI-H, y (ii) administrar al paciente un péptido, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, molécula de ácido nucleico o composición farmacéutica, de acuerdo con las descripciones anteriores. El método puede comprender, además, en la etapa (i), la etapa de identificar que el paciente tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura en la proteína de TGF β R2. En algunas modalidades, la mutación por desplazamiento del marco de lectura es una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit que incluye un péptido, un péptido para su uso, una mezcla de péptidos, un linfocito T no transfectado, una mezcla de linfocitos T no transfectadas, una preparación de linfocitos T no transfectadas, una molécula de ácido nucleico, una mezcla de moléculas de ácidos nucleicos, un vector y/o una célula

hospedera de acuerdo con las descripciones anteriores. El péptido, péptido para su uso, una mezcla de péptidos, un linfocito T no transfectado, una mezcla de linfocitos T no transfectadas, una preparación de linfocitos T no transfectadas, un ácido nucleico, una mezcla de ácidos nucleicos, un vector y/o una célula hospedera como tales, pueden estar presentes en el kit, o el péptido, péptido para su uso, una mezcla de péptidos, un linfocito T no transfectado, una mezcla de linfocitos T no transfectadas, una preparación de linfocitos T no transfectadas, una molécula de ácido nucleico, una mezcla de ácidos nucleicos, un vector y/o una célula hospedera, pueden estar presentes como una formulación farmacéutica. En algunas modalidades, el péptido, péptido para uso, mezcla de péptidos, linfocito T no transfectado, preparación de linfocitos T no transfectadas, mezcla de linfocitos T no transfectadas, mezcla de moléculas de ácidos nucleicos, vector y/o célula hospedera, pueden ser empaquetados, por ejemplo, en un vial, botella, matraz, que puede ser empaquetado adicionalmente, por ejemplo, dentro de una caja, envoltura o bolsa. En algunas modalidades, el kit comprende una mezcla de péptidos, una mezcla de linfocitos T no transfectadas y/o una mezcla de moléculas de ácidos nucleicos, en donde los péptidos, los linfocitos T no transfectadas y/o las moléculas de ácidos nucleicos son provistos en recipientes separados, de tal modo que el usuario

mezcle los péptidos, los linfocitos T no transfectadas y/o las moléculas de ácidos nucleicos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Los estudios previos sobre los péptidos para su uso como una vacuna contra los cánceres asociados con TGF β R2 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura mostraron que al menos algunos péptidos pueden ser inmunogénicos, pero existen
10 resultados contradictorios. Por consiguiente, se predijo manualmente un péptido de consenso con base en los péptidos probados en estudios anteriores.

Tabla 1: Péptidos de mutTGF β R2 probados previamente y su resultado de la activación de linfocitos T

15	Secuencia de péptidos probada previamente	Activación de células T	Etiqueta del péptido
	SPKCIMKEKKSLVRLSSCPVA (SEC ID NO: 11)	+	P540
	SLVRLSSCPVALMSAMTTSSSQ (SEC ID NO: 10)	+	p538
	SLVRLSSCV (SEC ID NO: 13)	+	p523
20	RLSSCPVA (SEC ID NO: 9)	+	p573
	ALMSAMTTSSSQKNITPAILTCC (SEC ID NO: 14)	-	p539
	AMTTSSSQKNITPAILTCC (SEC ID NO: 15)	-	p537

Secuencia de consenso predicha:

25 SPKCIMKEKKSLVRLSSCPVALMSAMTTSSSQ (SEC ID NO: 16).

Ejemplo 2

Luego, se usó un algoritmo en línea (es decir, SYFPEITHI) para predecir los epítomos de mutTGF β R2 para los alelos de la clase II de HLA. Los alelos de la clase II de HLA incluidos en la búsqueda fueron: HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301 (DR17), HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4), HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1501 (DR2b).

Se usó una puntuación de predicción límite de 20, en donde la fuerza de unión de HLA aumenta con la puntuación de predicción. SYFPEITHI produjo los siguientes epítomos predichos:

Tabla 2: Resultados de la búsqueda de SYFPEITHI

Secuencia de péptidos	Puntuación de predicción (SYFPEITHI)
KKSLVRLSSCPVAL (SEC ID NO: 17)	31 (HLA-DRB1*0101) 20 (HLA-DRB1*0401)
VALMSAMTTSSSQKN (SEC ID NO: 18)	28 (HLA-DRB1*0101) 20 (HLA-DRB1*0401)
PVALMSAMTTSSSQK (SEC ID NO: 19)	23 (HLA-DRB1*0101) 26 (HLA-DRB1*0401) 22 (HLA-DRB1*0701)
KCIMKEKKSLVRLSS (SEC ID NO: 20)	24 (HLA-DRB1*1501)
CVPVALMSAMTTSSS (SEC ID NO: 21)	23 (HLA-DRB1*0101) 24 (HLA-DRB1*1501)
LVRLSSCPVALMSA (SEC ID NO: 22)	22 (HLA-DRB1*0101) 21 (HLA-DRB1*0301) 24 (HLA-DRB1*1501)
MKEKKSLVRLSSCPV (SEC ID NO: 23)	22 (HLA-DRB1*1101)
KSLVRLSSCPVALM (SEC ID NO: 24)	20 (HLA-DRB1*0701) 20 (HLA-DRB1*1501)
SSCPVALMSAMTTS (SEC ID NO: 25)	20 (HLA-DRB1*0401) 22 (HLA-DRB1*0701)

Como resultado, SYFPEITHI predijo la secuencia de consenso: KCIMKEKKSLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQKN (SEC ID NO: 3).

Ejemplo 3

Se compararon las secuencias de consenso de los ejemplos 1 y 2 y se produjo una secuencia de consenso optimizada.

Tabla 3: Comparación de las secuencias de consenso predichas

Péptido de consenso predicho del ejemplo 1	SPKCIMKEKKSLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQ (SEC ID NO: 16)
Péptido de consenso predicho del ejemplo 2	KCIMKEKKSLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQKN (SEC ID NO: 3)
Péptido de consenso optimizado	KCIMKEKKSLVRLSSCVPVALMSAMTTSSSQKN (SEC ID NO: 3)

Ejemplo 4

El péptido de consenso optimizado (SEC ID NO: 3) se modificó para superar las dificultades predichas con la producción sintética y el uso como una vacuna. En particular, la secuencia de consenso optimizada (SEC ID NO: 3) tiene 33 aminoácidos de longitud, y los péptidos de esta longitud son difíciles de producir sintéticamente con la calidad y el rendimiento apropiados. Los dos residuos de cisteína en el mismo péptido crean problemas con la estabilidad y la calidad del péptido debido a la ciclación del péptido por la formación de enlaces de disulfuro intra e intermoleculares. Esta ciclación del péptido también puede reducir la potencia

inmunológica del péptido, por ejemplo, al alterar el procesamiento efectivo del antígeno. Esto puede provocar potencialmente el procesamiento de epítomos de linfocitos T no relacionados. Además, la ciclación del péptido puede inducir efectos secundarios inflamatorios no deseados, por ejemplo, la formación de anticuerpos o reacciones alérgicas. Además, los ocho aminoácidos en el extremo N-terminal de la secuencia de consenso optimizada (SEC ID NO: 3) corresponden a TGF β R2 de tipo salvaje, de tal modo que existe el riesgo de activar los linfocitos T con reactividad cruzada de tipo salvaje. En consecuencia, la secuencia de consenso optimizada (SEC ID NO: 3) se modificó adicionalmente para superar estos problemas y se diseñaron los péptidos que se muestran en la tabla 4. La figura 1 muestra cómo los péptidos diseñados se relacionan entre sí, así como con las secuencias de consenso predichas y optimizadas que se muestran en la tabla 3.

Tabla 4: Péptidos optimizados modificados

Nombre del péptido	Secuencia
Fsp1 (SEC ID NO: 4)	KCIMKEKKSLVRLSSCVPALMSA
Fsp2 (SEC ID NO: 5)	KGIMKEKKSLVRLSSCVPALMSA
Fsp3 (SEC ID NO: 6)	SSCVPALMSAMTTSSSQKN
Fsp4 (SEC ID NO: 7)	SSGVPALMSAMTTSSSQKN
Fsp5 (SEC ID NO: 3)	KCIMKEKKSLVRLSSCVPALMSAMTTSSSQKN

Ejemplo 5

i) Síntesis del péptido

Se preparó un lote de fsp5 (SEC ID NO: 3) por medio

de la síntesis del péptido en fase sólida (SPPS) usando la química de FMOC y el sintetizador Prelude (Gyros Protein Technologies Inc., EE. UU.). El péptido crudo se analizó por UPLC y MS. El péptido deseado se observó por MS, y UPLC mostró una pureza de alrededor de 75% como se demuestra en la figura 2. Sistema de UPLC: Columna; Acquity UPLC BEH C18 1.7 mm, 21x150 mm, detección; PDA 210-500 nm, disolvente A); TFA al 0.1% en agua, disolvente B; TFA al 0.1% en MeCN, gradiente: 20-70% B (2-10 minutos, lineal).

10 **ii) Solubilidad y purificación del péptido**

El péptido fue difícil de disolver y se intentó disolver el fsp5 crudo (SEC ID NO: 3) (~150 mg) en aproximadamente 4 ml de MeCN al 50% en agua bajo calentamiento suave. Sin embargo, no se pudo obtener una solución clara. No obstante, se intentó purificar la solución cruda por HPLC preparativa (MeCN al 15-40% en agua) después de la filtración de la suspensión cruda, lo que condujo a grandes pérdidas de material. Solamente se obtuvieron cantidades muy pequeñas del péptido deseado, y el análisis por UPLC encontró que el péptido fue impuro.

Se preparó otro lote de fsp5 (SEC ID NO: 3), se disolvió en DMSO puro bajo calentamiento suave y se purificó por HPLC preparativa. La pureza del péptido se midió por UPLC, y se encontró que fue de aproximadamente 90%, como se muestra en la figura 3. De nuevo, solamente se obtuvieron cantidades

muy pequeñas de fsp5 purificado (SEC ID NO: 3). Se señaló que la adición de incluso pequeñas cantidades de agua condujo a la precipitación del péptido en la solución de DMSO cruda, por lo que es muy probable que fsp5 (SEC ID NO: 3) se precipite en la
5 columna durante la purificación por HPLC.

iii) Pureza y estabilidad del péptido

Cuando la pureza de la pequeña cantidad de fsp5 purificado (SEC ID NO: 3) fue evaluada nuevamente por UPLC después de la liofilización, la pureza había caído de alrededor
10 de 90% a menos de 50% como se muestra en la figura 4. Se observó la misma tendencia cuando la pureza de fsp5 crudo (SEC ID NO: 3) fue evaluada nuevamente después de un breve almacenamiento (3 días) a temperatura ambiente seguido por la liofilización, como se demuestra en la figura 5.

15 En resumen, el ejemplo 5 muestra que fsp5 (SEC ID NO: 3) puede ser sintetizado, pero es muy difícil de producir en cantidades suficientes para cualquier propósito práctico, y con una calidad necesaria para su uso en la medicina, por ejemplo, como un componente de una posible vacuna contra el cáncer.

20 Ejemplo 6

Los péptidos fsp1 (SEC ID NO: 4), fsp2 (SEC ID NO: 5), fsp3 (SEC ID NO: 6) y fsp4 (SEC ID NO: 7), se sintetizaron usando SPPS y se purificaron por HPLC como se describió anteriormente. Los péptidos se liofilizaron después de la
25 purificación. La pureza de cada uno de los péptidos se midió

por UPLC y las trazas de UPLC se describen en las figuras 6-9.
 Sistema de UPLC: Columna; Acquity UPLC BEH C18 1.7 mm, 21x150
 mm, detección; PDA 210-500 nm, disolvente A); TFA al 0.1% en
 agua, disolvente B; TFA al 0.1% en MeCN, gradiente para fsp1 y
 5 fsp2: 5-50% B (0-10 minutos, lineal), gradiente para fsp3 y
 fsp4: 20-70% B (2-10 minutos, lineal).

- La figura 6 muestra que la pureza obtenida para fsp1 purificado y liofilizado (SEC ID NO: 4) fue de 96%.

- La figura 7 muestra que la pureza obtenida para
 10 fsp2 purificado y liofilizado (SEC ID NO: 5) fue de 97%.

- La figura 8 muestra que la pureza obtenida para fsp3 purificado y liofilizado (SEC ID NO: 6) fue de 94.8%.

- La figura 9 muestra que la pureza obtenida para fsp4 purificado y liofilizado (SEC ID NO: 7) fue de 91.9%.

15 Se confirmó el peso molecular correcto (MW) para los
 cuatro péptidos por ESI-QTOF-MS (tabla 5, ejemplo 7).

En resumen, el ejemplo 6 demuestra que los péptidos
 fsp1 (SEC ID NO: 4), fsp2 (SEC ID NO: 5), fsp3 (SEC ID NO: 6)
 y fsp4 (SEC ID NO: 7) pueden ser producidos sin los problemas
 20 químicos observados con fsp5 (SEC ID NO: 3). Por lo tanto, es
 factible producir estos péptidos más cortos para su uso
 potencial como vacunas para inducir los linfocitos T
 específicas del péptido.

Ejemplo 7

25 Se probó la inmunogenicidad de cada uno de los

péptidos de la tabla 4.

i) Materiales

Tabla 5: Materiales

5	Péptido	Pureza	Secuencia	MW	Sal	MW incl. sal
	fsp1	96%	KCIMKEKKSLVRLSSCVP VALMSA (SEC ID NO: 4)	2622.34	6TFA	3306.46
	fsp2	97%	KGIMKEKKSLVRLSSCVP VALMSA (SEC ID NO: 5)	2576.25	6TFA	3260.37
	fsp3	94.8%	SSCVPVALMSAMTTSSS QKN (SEC ID NO: 6)	2029.36	2TFA	2257.40
10	fsp4	91.9%	SSGVPVALMSAMTTSSS QKN (SEC ID NO: 7)	1983.27	2TFA	2211.38
	fsp5	~ 50%	KCIMKEKKSLVRLSSCVP VALMSAMTTSSSQKN (SEC ID NO: 3)	3571.21	7TFA	4369.39

Se obtuvieron capas leucocitarias frescas de cuatro
donadores sanos de un banco de sangre.

ii) Primera estimulación *in vitro* de PBMC y proliferación de los linfocitos T

Día 1:

PBMC:

Se contaron las células mononucleares de la sangre
periférica (PBMC) aisladas de las capas leucocitarias frescas
de cuatro donadores sanos y se suspendieron en un medio de DC
hasta 15×10^6 células/ml, y subsiguientemente se diluyeron con
un medio de DC hasta 4×10^6 células/ml (tabla 6).

Tabla 6: Suspensión y dilución de las células

Donador	Células contadas (*10 ⁶)	% de viabilidad	Dilución	Suspensión de las células hasta 15*10 ⁶ células/ml		Dilución hasta 4*10 ⁶ células/ml	
				Células totales (*10 ⁶)	Medio de DC	Suspensión de las células	Medio de DC
1	1.85	96	5x	462	30.8 ml	6.7 ml	18.3 ml
2	2.49	78	5x	622	41.4 ml	6.7 ml	18.3 ml
3	2.24	94	5x	560	37.3 ml	6.7 ml	18.3 ml
4	2.25	93	5x	563	37.5 ml	6.7 ml	18.3 ml

Medio de DC: 500 ml de un medio de DC CellGro (CellGenix) + 0.63 ml de 40 mg/ml de gensumicina + 5 ml de una solución amortiguadora de HEPES 1M + 4 ml de 200 mg/ml de Mucomyst/NAC

Estimulación *in vitro*:

Se usaron cuatro placas de 24 cavidades para cada donador, con 4*10⁶ células por cavidad (cada cavidad tiene un volumen de 1 ml).

Cóctel de péptidos: Solución de péptidos fsp2+fsp4, que contiene 10 µM de cada péptido. Se agregaron 40 µl de una solución del péptido a cada cavidad.

Las placas se incubaron en una incubadora de células durante 14 días (37 °C, 5% de CO₂). Se agregaron IL-2 e IL-7 el día 3. Las células se inspeccionaron diariamente.

Día 14 - Proliferación de los linfocitos T:

Péptidos de prueba: fsp2+fsp4 (SEC ID NO: 5 y 7), fsp1 (SEC ID NO: 4), fsp2 (SEC ID NO: 5), fsp3 (SEC ID NO: 6), fsp4 (SEC ID NO: 7), fsp5 (SEC ID NO: 3).

Control positivo: SEC3

Controles negativos: linfocitos T, linfocitos T+APC
(sin adición de péptidos de prueba)

Simulación: DMSO en PBS.

5 Configuración de la placa para la proliferación de los linfocitos T:

Se agregaron células y reactivos a las cavidades de la placa (por triplicado) como se describirá en las tablas 7 y 8 posteriormente. El volumen total agregado a cada cavidad fue
10 de 0.20 ml.

- Linfocitos T (PBMC): 50,000 células/cavidad (0.25×10^6 células/ml)
- APC: células alimentadoras autólogas irradiadas (30 Gy, 8 minutos): 50,000 células/cavidad
- 15 • Péptido (fspx): péptido 0.2 nmol/cavidad (cada péptido), concentración: péptido 10 μ M (fsp se disolvió en DMSO antes de la dilución hasta la concentración correcta).

Tabla 7: Configuración de la placa 1 (96 cavidades):

20

Filas A-H	Cavidades 1-3	Cavidades 4-6	Cavidades 7-9	Cavidades 10-12
A	medio de DC	medio de DC	medio de DC	medio de DC
B (donador 1)	células T	células T + APC	células T+ APC+fsp1	células T+ APC+fsp2
C (donador 1)	células T+ APC+fsp3	células T+ APC+fsp4	células T+ APC+fsp5	células T+ APC+fsp2+fsp4
D (donador 1)	células T+ APC+ simulación	células T+ APC+SEC3	medio	medio

25

5

E (donador 2)	células T	células T + APC	células T+ APC+fsp1	células T+ APC+fsp2
F (donador 2)	células T+ APC+fsp3	células T+ APC+fsp4	células T+ APC+fsp5	células T+ APC+fsp2+fsp4
G (donador 2)	células T+ APC+ simulación	células T+ APC+SEC3	medio	medio
H	medio	medio	medio	medio

Tabla 8: Configuración de la placa 2 (96 cavidades) :

10

15

Filas A-H	Cavidades 1-3	Cavidades 4-6	Cavidades 7-9	Cavidades 10-12
A	medio de DC	medio de DC	medio de DC	medio de DC
B (donador 3)	células T	células T + APC	células T+ APC+fsp1	células T+ APC+fsp2
C (donador 3)	células T+ APC+fsp3	células T+ APC+fsp4	células T+ APC+fsp5	células T+ APC+fsp2+fsp4
D (donador 3)	células T+ APC+ simulación	células T+ APC+SEC3	medio	medio
E (donador 4)	células T	células T + APC	células T+ APC+fsp1	células T+ APC+fsp2
F (donador 4)	células T+ APC+fsp3	células T+ APC+fsp4	células T+ APC+fsp5	células T+ APC+fsp2+fsp4
G (donador 4)	células T+ APC+ simulación	células T+ APC+SEC3	medio	medio
H	medio	medio	medio	medio

20

Las placas se incubaron en una incubadora de células durante 48 horas (37 °C, 5% de CO₂).

Día 16

25

Después de la incubación durante 48 horas, se agregaron 20 µl de una solución de 3H-timidina (5µCi/ml) a cada cavidad y las placas se incubaron durante aproximadamente 17

horas (37 °C, 5% de CO₂).

Día 17

Después de 17 horas, las células se recolectaron (Unifilters) y se secaron sobre los filtros a 45 °C hasta que
 5 se secaron completamente. Después de cubrir la parte inferior de los aparatos de Unifilters con cubiertas adhesivas (suministradas con los aparatos de Unifilters), se agregaron 25 µl de un líquido de microcentelleos a cada cavidad, la placa se cubrió con TopSeal y se midió la absorción de 3H-timidina
 10 como conteos por minuto (CPM) usando un contador de centelleos de la microplaca.

Resultados de la proliferación:

Los resultados de la proliferación de los linfocitos T después de la primera ronda de estimulación *in vitro* con el
 15 cóctel de péptidos fsp2 y fsp4, se presentaron como un índice de estimulación (SI) en la figura 10. SI = CPM promedio (triplicados) de (linfocitos T+APC+péptido(s) de prueba) dividido entre CPM promedio (triplicados) de (linfocitos T+APC). SI $\geq$ 2 es una clara señal de inmunogenicidad.

20 iii) Re-estimulación *in vitro* de PBMC y proliferación de los linfocitos T

Las PBMC recolectadas después de la primera estimulación *in vitro* fueron estimuladas nuevamente *in vitro* de acuerdo con el protocolo establecido anteriormente, con
 25 2×10^6 células por cavidad. La proliferación de los linfocitos

T se probó de acuerdo con el protocolo establecido anteriormente.

Resultados de la proliferación:

Los resultados de la proliferación de los linfocitos T después de una segunda ronda de estimulación *in vitro* con el cóctel de péptidos fsp2 y fsp4, se presentaron como un índice de estimulación (SI) en la figura 11.

Por consiguiente, las figuras 10 y 11 muestran que los péptidos fsp2 y fsp4, que tienen una sustitución de aminoácidos, son inmunogénicos y pueden activar los linfocitos T, y que los linfocitos T activadas tienen reactividad cruzada para los péptidos de la proteína de TGF β R2 con desplazamiento del marco de lectura de -1a que está presente de manera natural. Además, las figuras 10-12 muestran que fsp1 y fsp5, que son péptidos de la proteína de TGF β R2 con desplazamiento del marco de lectura de -1a que está presente de manera natural, estimularon los linfocitos T inducidas a partir de PMBC y, por lo tanto, son inmunogénicos. En consecuencia, los péptidos modificados fsp2 (SEC ID NO. 5) y fsp4 (SEC ID NO. 7), así como los péptidos no modificados fsp1 (SEC ID NO: 4) y fsp5 (SEC ID NO: 3), pueden ser usados para estimular la inducción de los linfocitos T específicas del mutante con desplazamiento del marco de lectura de TGF β R2.

Ejemplo 8

Se usó el mismo protocolo que aquel establecido en

el ejemplo 7 para probar la inmunogenicidad de fsp6 y fsp7 (SEC ID NO: 26 y SEC ID NO: 27, respectivamente), excepto por la mezcla de péptidos usada para inducir los linfocitos T a partir de PMBC de las capas leucocitarias frescas de cuatro donadores sanos. La mezcla de péptidos usada en este ejemplo para inducir los linfocitos T a partir de PMBC estuvo compuesta por fsp2 (SEC ID NO: 5; 10 μ M), fsp8 (SEC ID NO: 31; 10 μ M) y fsp9 (SEC ID NO: 32; 10 μ M). Fsp8 (SEC ID NO: 31; RNRIPAVLRTEGEPLHTPSVGMRET) es un péptido de ASTE1 que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a, y fsp9 (SEC ID NO: 32; KTILKKAGIGMCVKVSSIFFINKQK) es un péptido de TAF1 β que tiene una mutación por desplazamiento del marco de lectura de -1a.

El día 14 después de la inducción, se llevó a cabo un ensayo de proliferación de los linfocitos T como en el ejemplo 7, usando fsp2 (SEC ID NO: 5), fsp6 (SEC ID NO: 26) y fsp7 (SEC ID NO: 27) como los péptidos de prueba. Como fsp8 y fsp9 tienen secuencias de aminoácidos muy diferentes de fsp2, solamente fsp2 podría ser capaz de inducir los linfocitos T que son capaces de reconocer y ser estimuladas por fsp2, fsp6 y fsp7. En particular, como se muestra en la figura 11, fsp6 y fsp7 son las versiones truncadas de fsp2. También se llevaron a cabo dos rondas adicionales de estimulación de los linfocitos T, con un ensayo de proliferación de los linfocitos T que se llevó a cabo 14 días después de cada estimulación.

Los resultados de la proliferación de los linfocitos T después de la primera ronda de estimulación *in vitro* se presentaron como un índice de estimulación (SI) en la figura 13. En particular, la figura 13 muestra que fsp6 es capaz de
5 activar los linfocitos T, de tal modo que fsp6 es inmunogénico y puede ser usado como una vacuna o tratamiento contra el cáncer. La figura 13 también muestra que los linfocitos T inducidas por fsp2 (SEC ID NO: 5) tienen reactividad cruzada para los péptidos de la proteína con desplazamiento del marco
10 de lectura de -1a que está presente de manera natural, que son más cortos que fsp2 (SEC ID NO: 5), es decir, fsp6 (SEC ID NO: 26). También se espera, en vista de los resultados mostrados en las figuras 11 y 12, que un péptido que tiene la secuencia de fsp6 (SEC ID NO: 26), pero que tiene una sustitución de
15 aminoácidos que corresponde a aquella en fsp2, y particularmente una sustitución de aminoácidos de C a G como en fsp2, también sea inmunogénico y sea útil como una vacuna o tratamiento contra el cáncer. En particular, como se mencionó en el ejemplo 7, la figura 11 muestra que los linfocitos T
20 inducidas por fsp2 (SEC ID NO: 5), que tiene una sustitución de aminoácidos de C a G, tienen una reactividad cruzada para los péptidos de la proteína con desplazamiento del marco de lectura de -1a que está presente de manera natural, de tal modo que la sustitución de aminoácidos de C a G es inmunológicamente
25 aceptable. Por consiguiente, se espera que fsp6a (SEC ID NO:

28), que es idéntico a fsp6 (SEC ID NO: 26) excepto por la misma sustitución de aminoácidos de C a G que fsp2 (SEC ID NO: 5), también sea inmunogénico.

Además, la figura 13 muestra que fsp6 (SEC ID NO: 5 26) es menos inmunogénico que fsp2 (SEC ID NO: 5), pero que tanto fsp6 como fsp2 son mucho más inmunogénicos que fsp7 (SEC ID NO: 27). Fsp6 tiene la misma secuencia de aminoácidos que fsp2, excepto que fsp6 está truncado en el extremo C-terminal en comparación con fsp2 y no tiene una sustitución de aminoácidos de C a G. Fsp7 tiene la misma secuencia de aminoácidos que fsp2, pero está truncado en el extremo N-terminal en comparación con fsp2. En vista de la diferencia en la inmunogenicidad entre estos tres péptidos, mostrados en la figura 13, se espera que la adición de al menos un aminoácido adicional en el extremo C-terminal de fsp6, hasta la longitud completa de fsp2, proporcione la misma actividad inmunogénica de fsp2. Además, se espera que se requiera al menos un aminoácido adicional en el extremo N-terminal de fsp7 para aumentar su inmunogenicidad y para que el péptido comprenda epítomos inmunológicamente efectivos. En consecuencia, se espera que el péptido de 9-mer LVRLSSCVP (fsp1a; SEC ID NO: 29) sea inmunogénico, ya que este péptido comprende una secuencia compartida por fsp6 y fsp7, con la adición de un aminoácido en el extremo C-terminal en comparación con fsp6 y un aminoácido en el extremo N-terminal en comparación con fsp7.

Además, como se ha demostrado que la sustitución de aminoácidos de C a G es inmunológicamente aceptable, se espera que el péptido de 9-mer que tiene una sustitución de aminoácidos de C a G (fsp1b; SEC ID NO: 30) también sea inmunogénico.

5

10

15

20

25