

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 836 273**

(51) Int. Cl.:  
**A61K 39/00**  
(2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2016 PCT/EP2016/059401**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2016 WO16174085**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2016 E 16718705 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 3288581**

---

(54) Título: **Método para el tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

**27.04.2015 GB 201507100  
02.03.2016 GB 201603663  
03.03.2016 GB 201603731**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2021**

(73) Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED  
(100.0%)  
2 Redman Place  
London E20 1JQ, GB**

(72) Inventor/es:

**MCGRANAHAN, NICHOLAS;  
ROSENTHAL, RACHEL;  
SWANTON, CHARLES;  
PEGGS, KARL y  
QUEZADA, SERGIO**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 836 273 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento del cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones que son útiles para el tratamiento del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a una composición de células T para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto.

10 Antecedentes de la invención

Se sabe que la heterogeneidad intratumoral (ITH) y el panorama mutacional de un tumor pueden influir en la capacidad del sistema inmunológico para responder al cáncer.

15 Por ejemplo, la inestabilidad genética juega un papel principal en la capacidad de las células tumorales para desarrollar mutantes de escape que evaden la eliminación inmunitaria. Esta característica fundamental de las células tumorales es una de las principales razones por las que muchas inmunoterapias prometedoras diseñadas para provocar una potente inmunidad de células T específicas de antígenos tumorales finalmente fracasan, y plantea un desafío considerable en el desarrollo de estrategias exitosas de vacunas contra el cáncer. Como tal, las inmunoterapias diseñadas para establecer inmunidad de células T específicas de antígeno contra tumores presentan una paradoja en el sentido de que la inmunidad específica de tumores que elimina eficazmente el tumor también aplica presión selectiva que promueve el desarrollo de mutantes de escape de tumores que son resistentes a la eliminación de células T. Numerosos informes indican que los tumores escapan a la eliminación inmunitaria mediante el crecimiento selectivo de células tumorales que expresan mutaciones aleatorias que inician o silencian genes a través de mutaciones puntuales, mutaciones de cambio de marco, translocaciones genómicas, inserciones o eliminaciones.

20 La heterogeneidad tumoral describe la observación de que diferentes células tumorales pueden mostrar distintos perfiles morfológicos y fenotípicos, que incluyen diferencias en la morfología celular, expresión génica, mutaciones genéticas y epigenéticas, metabolismo, motilidad, proliferación y potencial metastásico. Este fenómeno ocurre tanto entre tumores (heterogeneidad entre tumores) como dentro de los tumores (heterogeneidad intratumoral o ITH). La heterogeneidad de las células cancerosas presenta importantes desafíos en el diseño de estrategias de tratamiento eficaces.

25 30 35 A modo de ejemplo, los tumores heterogéneos pueden exhibir diferentes sensibilidades a fármacos citotóxicos o dirigidos entre diferentes poblaciones clonales. Esto se atribuye a interacciones clonales que pueden inhibir o alterar la eficacia terapéutica, lo que plantea un desafío para terapias exitosas en tumores heterogéneos (y sus metástasis heterogéneas).

40 45 La administración de fármacos en tumores heterogéneos rara vez destruirá todas las células tumorales. La población tumoral heterogénea inicial puede producir un cuello de botella, de modo que sobrevivirán pocas células resistentes a los fármacos. Esto permite que las poblaciones de tumores resistentes se repliquen y vuelvan a hacer crecer el tumor a través de un mecanismo de evolución ramificada. El tumor repoblado resultante también puede ser heterogéneo y será resistente al tratamiento farmacológico inicial utilizado. El tumor repoblado también puede regresar de una manera más agresiva.

50 55 La administración de fármacos citotóxicos a menudo da como resultado una contracción inicial del tumor. Esto representa la destrucción de poblaciones subcloniales no resistentes iniciales dentro de un tumor heterogéneo, dejando solo clones resistentes. Estos clones resistentes ahora contienen una ventaja selectiva en presencia de quimioterapia y pueden replicarse para repoblar el tumor. La replicación probablemente ocurrirá a través de la evolución ramificada, contribuyendo a la heterogeneidad del tumor. El tumor repoblado puede parecer más agresivo. Esto se atribuye a la ventaja selectiva resistente a los fármacos de las células tumorales y a los cambios genéticos adicionales que se producen durante la terapia y el curso de la enfermedad.

60 65 El documento WO 2014/168874 describe un método para preparar una vacuna neoplásica personalizada para un sujeto diagnosticado con una neoplasia, que incluye identificar una pluralidad de mutaciones en la neoplasia, analizar la pluralidad de mutaciones para identificar un subconjunto de al menos cinco mutaciones neoantígenicas que se predice que codifican péptidos neoantígenos y que producen, según el subconjunto identificado, una vacuna de neoplasia personalizada.

El documento WO 2015/014375 describe métodos y medios para el tratamiento del cáncer que implican un conjunto específico de antígenos tumorales.

El documento WO 2014/012051 describe la identificación de mutaciones en genes expresados de células cancerosas de pacientes con cáncer y el uso de las mutaciones para preparar vacunas contra el cáncer y terapias con células inmunitarias adoptivas.

El documento WO 2012/159754 describe vacunas que son específicas para el tumor de un paciente y son potencialmente útiles para la inmunoterapia del tumor primario así como para las metástasis tumorales.

- 5 El documento US2002/022591 describe un método para expandir una población de células T, en el que la población de células T expandida se dirige a una proteína tumoral de ovario que comprende poner en contacto células T con una proteína tumoral y una célula presentadora de antígeno.

Por lo tanto, existe la necesidad de métodos alternativos para tratar el cáncer, en particular los tumores heterogéneos.

10 Resumen de aspectos de la invención

Los presentes inventores han determinado que las mutaciones troncales, es decir las mutaciones presentes en esencialmente todas las células tumorales en un tumor heterogéneo, pueden identificarse mediante muestreo multirregional del tumor o mediante enfoques para identificar mutaciones clonales en biopsias individuales. Por ejemplo, la fracción de células cancerosas, que describe la fracción de células cancerosas que albergan una mutación, se puede determinar para distinguir los neoantígenos que probablemente estén presentes en todas las células cancerosas del tumor (neoantígenos troncales) de los neoantígenos únicamente presentes en un subconjunto de células tumorales (rama neoantígenos). Como se usa en este documento, el término "mutaciones troncales" es sinónimo del término "mutaciones clonales". Ambos están destinados a definir mutaciones presentes en esencialmente todas las células tumorales en un tumor heterogéneo. Como se usa en el presente documento, el término "mutaciones ramificadas" es sinónimo del término "mutaciones subcloniales". Ambos están destinados a definir mutaciones presentes en un subconjunto de células tumorales. La administración de células T terapéuticas que se dirigen a neoantígenos troncales, en lugar de neoantígenos ramificados, o la administración de vacunas como se describe en este documento, permite montar una respuesta inmune eficaz contra todo el tumor y, por lo tanto, reduce el riesgo de repoblación del tumor por células resistentes.

La presente invención proporciona una composición de células T para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que comprende células T expandidas selectivamente para dirigirse a neoantígenos clonales característicos del cáncer del sujeto, en el que un neoantígeno clonal tiene una fracción de células cancerosas (CCF) con un intervalo de confianza del 95% mayor o igual a 0,75.

En el presente documento se describe un método para expandir una población de células T para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto en el que la población de células T expandida se dirige a un neoantígeno, comprendiendo el método las etapas de:

a) proporcionar una muestra que comprende una población de células T que es capaz de reconocer específicamente dicho neoantígeno; y

b) cultivar conjuntamente la población de células T con una composición que comprende el neoantígeno, o péptido neoantígeno, y una célula presentadora de antígeno;

en el que el neoantígeno se ha identificado en una muestra de un tumor de dicho sujeto como un neoantígeno clonal. También se describe en el presente documento una composición de células T que comprende células T expandidas selectivamente para dirigirse a uno o más neoantígenos clonales, y una composición de células T útil para el tratamiento de un cáncer en un sujeto que comprende células T expandidas selectivamente para dirigirse a neoantígenos clonales característicos del cáncer del sujeto.

También se describe en este documento una composición de células T que comprende una población de células T que se obtiene o se puede obtener mediante un método como se describe en este documento.

50 Un método para identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto puede comprender las etapas de:

i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y

ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y

55 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal.

Un método para identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto puede comprender las etapas de:

60 i) determinar mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas del tumor; y

ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras; y

iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal.

65 La mutación troncal puede ser una variante de un solo nucleótido o una inserción/eliminación o una mutación del sitio de empalme que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos (mutación codificante).

Las mutaciones pueden identificarse mediante secuenciación del Exoma, secuenciación de ARN, secuenciación del genoma completo y/o secuenciación dirigida a un panel de genes. Se conocen en la técnica métodos adecuados. Las descripciones de la secuenciación del Exoma y la secuenciación de ARN las proporcionan Boa et al., (Cancer Informatics. 2014; 13 (Suplemento 2): 67-82) y Ares et al.. (Cold Spring Harb. Protoc. 3 de noviembre de 2014; 2014 (11): 1139-48), respectivamente. Las descripciones de la secuenciación dirigida al panel de genes se puede encontrar, por ejemplo, en Kammermeier et al., (J Med Genet. Noviembre de 2014; 51 (11): 748-55) y Yap KL et al., (Clin Cancer Res. 2014. 20: 6605). Véase también Meyerson et al., Nat. Rev. Genetics, 2010 y Mardis, Annu Rev Anal Chem, 2013. Los paneles de secuenciación dirigida a genes también están disponibles comercialmente (por ejemplo, según lo resumido por Biocompare (<http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/161194-Build-Your-Own-Gene-Panels-with-These-Custom-NGS-Targeting-Tools>)).

El método puede comprender la etapa de evaluar el perfil de alelos del HLA del sujeto para determinar si un péptido de neoantígeno troncal se unirá a una molécula del MHC del sujeto. En la técnica se conocen métodos adecuados, por ejemplo, OptiType, Szolek et al., 2014.

Un método para proporcionar una población de células T que se dirige a un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto puede comprender las etapas de:

- 20 i) identificar una célula T de una muestra aislada del sujeto, que es capaz de reconocer específicamente un péptido neoantígeno troncal; y
- ii) expandir la célula T para proporcionar una población de células T que se dirige al neoantígeno troncal.

Un experto en la técnica apreciará que las referencias en el presente documento a una célula T que "reconoce" un neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal incluyen el reconocimiento en forma de un complejo péptido neoantígeno troncal: MHC.

Un método para identificar una célula T específica de neoantígeno troncal puede comprender las siguientes etapas:

- 30 i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y
- ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y
- iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

35 o

- i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;
- ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;
- iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y
- iv) identificar a partir de una muestra de dicho sujeto una célula T capaz de reconocer específicamente el neoantígeno troncal como una célula T específica de neoantígeno troncal.

La muestra a partir de la cual se identifica la célula T puede ser una muestra de sangre, una muestra de tumor, una muestra de ganglio linfático asociada a un tumor o una muestra de un sitio metastásico.

Un método para proporcionar una población de células T que se dirija a un neoantígeno troncal en un tumor puede comprender las etapas de:

- 50 (a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:
- i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y
- ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y
- iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

55 o

- i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;
- ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;
- iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y

- b) identificar una célula T de una muestra aislada de un sujeto que sea capaz de reconocer específicamente dicho neoantígeno troncal; y
- c) expandir la célula T para proporcionar una población de células T que se dirige al neoantígeno troncal.

Se puede obtener o ser obtenible una población de células T mediante un método que comprende las etapas de:

(a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:

- 5 i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y  
 ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

10 o

- i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;  
 ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;

15 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y

b) identificar una célula T de una muestra aislada de un sujeto que sea capaz de reconocer específicamente dicho neoantígeno troncal; y

20 c) expandir la célula T para proporcionar una población de células T que se dirige al neoantígeno troncal.

Por lo tanto, la población de células T resultante se enriquece con un número mayor de células T que se dirigen a neoantígenos troncales (por ejemplo, en comparación con la muestra aislada del sujeto).

25 La muestra puede ser un tumor, sangre, tejido o células mononucleares de sangre periférica del sujeto.

El neoantígeno troncal puede generarse mediante una mutación troncal identificada de acuerdo con el método descrito en el presente documento.

30 La población de células T puede comprender células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> o células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.

El método puede comprender proporcionar al menos una primera y una segunda célula T, en el que la primera célula T se dirige a un primer neoantígeno troncal generado por una primera mutación troncal y la segunda célula T se dirige a un segundo neoantígeno troncal generado por una segunda mutación troncal.

35 Una composición de células T puede comprender una célula T específica de neoantígeno troncal o una población de células T como se describe en el presente documento.

40 El neoantígeno troncal puede identificarse mediante el método descrito en este documento.

La célula T específica de neoantígeno troncal puede ser una célula T como se define en el presente documento.

45 La célula T específica de neoantígeno troncal puede expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR) o un receptor de células T de afinidad mejorada (TCR) que se une específicamente a un neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal (es decir, un péptido derivado del neoantígeno troncal), como se describe más adelante en el presente documento.

50 Se conocen en la técnica métodos para generar TCR y TCR mejorados por afinidad. Los TCR mejorados por afinidad son TCR con mayor afinidad por un complejo péptido-MHC. Los métodos incluyen, por ejemplo, el aislamiento de genes de TCR que codifican TCR de muestras de pacientes (por ejemplo, sangre periférica del paciente o TIL), y la mejora de la afinidad del TCR por un complejo péptido-MHC mediante la modificación de secuencias de TCR (por ejemplo, mediante mutagénesis *in vitro* y selección de TCR de afinidad mejorada (o afinidad madurada)). Se conocen en la técnica métodos para introducir tales genes de TCR en células T. Los métodos para identificar los TCR de afinidad óptima que implican la inmunización de ratones transgénicos humanizados negativos para que tienen un repertorio diverso de TCR humano (por ejemplo, ratones humanizados TCR/MHC tales como ratones ABabDII) con antígeno, y aislamiento de TCR específicos de antígeno de tales ratones transgénicos inmunizados también se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Obenaus M et al., Nat Biotechnol. 33 (4): 402-7, 2015).

60 Un multímero de MHC puede comprender un péptido neoantígeno troncal, en el que el neoantígeno troncal se identifica mediante el método que se describe en el presente documento. Los multímeros de MHC y los métodos para usarlos para aislar células T son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Hadrup, Nature Methods 6: 520-526 2009; y Andersen, Nature Protocol 7: 891-902, 2012.

65 Los multímeros de MHC como se describen en este documento pueden usarse en métodos como se describen en este documento, por ejemplo, en métodos para identificar células T NES. Los multímeros de MHC pueden usarse para identificar, expandir o enriquecer células T NES en métodos como se describe en este documento, por ejemplo

métodos para producir una célula T o una población o composición de células T como se describe en el presente documento.

5 Una vacuna puede comprender un péptido neoantígeno troncal de un neoantígeno troncal identificado mediante el método descrito anteriormente. Como se describe en el presente documento, una vacuna de neoantígeno troncal puede administrarse como una vacuna de células dendríticas pulsadas o cargadas con el neoantígeno troncal, o modificada genéticamente (mediante transferencia de ADN o ARN) para expresar uno, dos o más neoantígenos troncales.

10 La presente invención proporciona una composición de células T de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

Una célula T como se define en el presente documento se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

15 Un método para tratar el cáncer en un sujeto puede comprender administrar al sujeto una composición de células T de acuerdo con la invención.

20 El método puede comprender las siguientes etapas:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene células T del sujeto;  
(ii) identificación y expansión de una población de células T que se dirige al neoantígeno troncal; y  
(iii) administración de las células de (ii) al sujeto.

25 El método puede comprender las siguientes etapas:

- (i) aislamiento de una muestra que contiene células T;  
(ii) modificación de las célula T para que expresen un CAR o TCR que reconozca dicho neoantígeno troncal como se describe en el presente documento para proporcionar una población de células T que se dirija al neoantígeno troncal;  
30 y  
(iii) administración de las células de (ii) al sujeto.

En un aspecto, el método también abarca la etapa de identificar un neoantígeno troncal como se describe en el presente documento, es decir, un método para tratar el cáncer en un sujeto, en el que dicho método comprende;

35 (a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:

- i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
40 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

o

- 45 i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;  
iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y

50 b) identificar una célula T de una muestra aislada de un sujeto que sea capaz de reconocer específicamente dicho neoantígeno troncal;  
c) expandir las células T para proporcionar una población de células T que se dirige al neoantígeno troncal; y  
d) administrar dicha población de células T a dicho sujeto.

55 El método puede comprender las etapas de:

(a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:

- i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
60 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

o

- 65 i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;

- ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;
- iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y
- 5       (b) proporcionar una muestra que contiene células T;
- (c) modificar una célula T para que exprese un CAR o TCR que reconozca dicho neoantígeno troncal para proporcionar una población de células T que se dirija al neoantígeno troncal; y
- (d) administrar dicha población de células T al sujeto.
- 10 En un aspecto, las células T se modifican para expresar un CAR o TCR mejorado por afinidad como se describe en el presente documento.
- Un método para tratar a un paciente que tiene cáncer puede comprender:
- 15 (i) identificar a un paciente que tiene cáncer; y
- (ii) administrar a dicho paciente una célula T o una población de células T como se define en el presente documento.
- El neoantígeno troncal, la célula T o la población de células T pueden haberse identificado o producido como se describe en el presente documento.
- 20 La muestra puede ser una muestra de tumor, una muestra de sangre o una muestra de tejido o una muestra de células mononucleares de sangre periférica del sujeto.
- 25 Un método para tratar el cáncer en un sujeto puede comprender administrar una vacuna como se describe en el presente documento al sujeto.
- Descripción de las figuras
- 30 Figura 1 - Canalización para la predicción e identificación de células T reactivas con neoantígeno en muestras de NSCLC. La secuencia del Exoma y la secuencia del ARN se utilizan para definir neoepítopos de mutaciones troncales y ramificadas. Se predice la unión de péptidos mutantes o de tipo silvestre al HLA del paciente y se seleccionan los péptidos con alta afinidad predicha (verde) por HLA ( $IC_{50}$  baja) y aquellos con alta afinidad como mutante y baja como tipo silvestre (azul) para generar multímeros del MHC fluorescentes para su uso en la identificación de células T NES en muestras tumorales.
- 35 Figura 2 - Ilustración de la diferencia entre mutaciones troncales y mutaciones de rama en una muestra aislada de cáncer de pulmón, cáncer de cerebro y tejido normal de pulmón y cerebro.
- 40 Figura 3 - Ilustración de la canalización desde la identificación de mutaciones troncales en un tumor hasta la identificación de células T específicas del neoantígeno.
- Figura 4 - (A) Identificación de células T específicas del neoantígeno en cáncer de pulmón en estadio temprano. Se muestran las afinidades predichas del mutante (eje Y) frente al tipo silvestre (eje X) obtenidas a partir de los datos de secuenciación del exón. Los puntos rojos indican péptidos predictivos con una puntuación alta (baja afinidad) para el HLA del paciente en la forma de TS y una puntuación baja (alta afinidad) en la forma mutante. (B) Los TIL expandidos *in vitro* se tiñeron con tetrámeros fluorescentes cargados con los péptidos mutados predichos o los péptidos de citomegalovirus (CMV) de control y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células T reactivas al CMV se encuentran en frecuencias iguales (0,2-0,3%) en tumores y pulmones normales.
- 50 Figura 5 - (A) ratones retados con la mezcla de tumores heterogéneos (B16/B16-OVA) que contiene un neoantígeno clonal (tyrp1) y subclonal (OVA) y los tumores crecieron sin tratar y tuvieron que ser sacrificados entre los días 20 y 30 después del desafío tumoral. (B) ratones desafiados con la mezcla tumoral B16/B16-OVA pero tratados con células Tg TRP1 TCR dirigidas a un neoantígeno clonal fueron capaces de rechazar sus tumores. (C) los ratones fueron tratados con células T TCR Tg OTII dirigidas a un neoantígeno subclonal, ninguno de los ratones fue capaz de rechazar su tumor. (D) demuestra la capacidad de las células T TCR Tg OTII para rechazar tumores establecidos cuando todas las células del tumor expresan el neoantígeno OVA. Cada línea de cada gráfico representa un ratón independiente. Se utilizaron 6 ratones por grupo para estos experimentos. (E) muestra todos los grupos experimentales y el tamaño promedio del tumor en cada grupo.
- 55 Descripción detallada de la invención
- 60 Neoantígeno troncal
- 65 Un "neoantígeno" es un antígeno específico de tumor que surge como consecuencia de una mutación dentro de una célula cancerosa. Por lo tanto, las células sanas de un sujeto no expresan un neoantígeno. Como tal, una ventaja de dirigirse terapéuticamente a un neoantígeno troncal son niveles más bajos de toxicidad predicha porque las células sanas no son el blanco.

5 Muchos antígenos expresados por células cancerosas son autoantígenos que se expresan o sobreexpresan selectivamente en las células cancerosas. Estos autoantígenos son difíciles de atacar con immunoterapia celular porque requieren superar tanto la tolerancia central (mediante la cual las células T autorreactivas se eliminan en el timo durante el desarrollo) como la tolerancia periférica (mediante la cual las células T maduras son suprimidas por mecanismos reguladores).

10 Estos mecanismos de tolerancia pueden anularse mediante el direccionamiento de neoantígenos. En particular, las mutaciones no silenciosas que ocurren en las células cancerosas pueden dar como resultado la expresión de proteínas por parte de las células cancerosas que no son expresadas por células sanas. Estas proteínas alteradas no son reconocidas como "autoantígenos" por el sistema inmunológico.

15 Debido a que los neoantígenos no se reconocen como "autoantígenos", las células T que son capaces de dirigirse a neoantígenos no están sujetas a mecanismos de tolerancia centrales y periféricos en la misma medida que las células T que reconocen autoantígenos.

20 El neoantígeno descrito en el presente documento puede ser causado por cualquier mutación no silenciosa que altere una proteína expresada por una célula cancerosa en comparación con la proteína no mutada expresada por una célula sana de tipo silvestre.

25 Una "mutación" se refiere a una diferencia en una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, ADN o ARN) en una célula tumoral en comparación con una célula sana del mismo individuo. La diferencia en la secuencia de nucleótidos puede resultar en la expresión de una proteína que no es expresada por una célula sana del mismo individuo.

30 35 Por ejemplo, la mutación puede ser una variante de un solo nucleótido (SNV), variantes de múltiples nucleótidos, una mutación por eliminación, una mutación por inserción, una translocación, una mutación sin sentido o una mutación en el sitio de empalme que da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos (mutación codificante). Se sabe que la duplicación del genoma puede ocurrir en las células cancerosas. Por lo tanto, una mutación que se produce antes de un evento de duplicación del genoma estará presente en una célula cancerosa al doble del número relativo de copias de una mutación que se produjo después del evento de duplicación. Si el evento de duplicación del genoma es un evento troncal presente en cada célula, los neoantígenos que ocurren antes de la duplicación del genoma representarían un objetivo neoantigénico preferencial por las razones expuestas. En una realización preferida, el neoantígeno troncal de acuerdo con la invención es uno presente en una región del genoma que rara vez está sujeta a pérdida del número de copias.

35 En realizaciones particulares, la mutación que produce el neoantígeno es una SNV.

40 Diferentes regiones de tumores pueden ser morfológicamente distintas. Además, puede producirse heterogeneidad mutacional intratumoral y puede estar asociada con diferencias en el pronóstico del tumor y la capacidad potencial de las células tumorales para escapar de las terapias inmunes dirigidas a mutaciones que no están presentes en todas o en la mayoría de las células tumorales.

45 Los presentes inventores han determinado que la heterogeneidad intratumorales puede provocar variación entre los neoantígenos expresados en diferentes regiones de un tumor y entre diferentes células de un tumor. En particular, los inventores han determinado que, dentro de un tumor, ciertos neoantígenos se expresan en todas las regiones y esencialmente todas las células del tumor mientras que otros neoantígenos solo se expresan en un subconjunto de regiones y células tumorales.

50 Como tal, un neoantígeno "troncal" o "clonal" es un neoantígeno que se expresa eficazmente en todo un tumor y se codifica esencialmente dentro de cada célula tumoral. Un neoantígeno "ramificado" o "subclonal" es un neoantígeno que se expresa en un subconjunto o una proporción de células o regiones en un tumor.

55 "Presente en todo un tumor", "expresado eficazmente en todo un tumor" y "codificado esencialmente dentro de cada célula tumoral" pueden significar que el neoantígeno troncal se expresa en todas las regiones del tumor de las que se analizan las muestras.

60 Se apreciará que la determinación de que una mutación está "codificada esencialmente dentro de cada célula tumoral" se refiere a un cálculo estadístico y, por lo tanto, está sujeta a análisis y umbrales estadísticos. Asimismo, la determinación de que un neoantígeno troncal se 'expresa eficazmente en todo un tumor' se refiere a un cálculo estadístico y, por lo tanto, está sujeto a análisis y umbrales estadísticos.

65 Expresada de manera efectiva en esencialmente todas las células tumorales o esencialmente todas las células tumorales significa que la mutación está presente en todas las células tumorales analizadas en una muestra, según se determina usando métodos estadísticos apropiados.

A modo de ejemplo, la fracción de células cancerosas (CCF), que describe la proporción de células cancerosas que albergan una mutación, puede usarse para determinar si las mutaciones son troncales o ramificadas. Por ejemplo, la fracción de células cancerosas puede determinarse integrando frecuencias de alelos variantes con números de copias y estimaciones de pureza como describen Landau et al., (Cell. 14 de febrero de 2013; 152 (4): 714-26). La determinación de la CCF se demuestra en los ejemplos descritos en este documento.

En resumen, los valores de CCF se calculan para todas las mutaciones identificadas dentro de todas y cada una de las regiones tumorales analizadas. Si solo se usa una región (es decir, solamente una única muestra), solo se obtendrá un conjunto de valores de CCF. Esto proporcionará información sobre qué mutaciones están presentes en todas las células tumorales dentro de esa región tumoral y, por lo tanto, proporcionará una indicación de si la mutación es troncal o ramificada. Todas las mutaciones subcloniales (es decir, CCF <1) en una región tumoral se determinan como ramificadas, mientras que se determina que las mutaciones clonales con CCF = 1 son troncales.

Como se ha indicado, la determinación de una mutación troncal está sujeta a un análisis y un umbral estadísticos. Como tal, una mutación puede identificarse como troncal si se determina que tiene un intervalo de confianza del 95% de  $CCF \geq 0,75$ , por ejemplo, 0,80; 0,85; 0,90; 0,95; 1,00 o  $> 1,00$ . Por el contrario, una mutación puede identificarse como ramificada si se determina que tiene un intervalo de confianza del 95% de  $CCF \leq 0,75$ , por ejemplo, 0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10; 0,05; 0,01 en cualquier muestra analizada.

Se apreciará que la precisión de un método para identificar mutaciones troncales aumenta identificando mutaciones clonales para más de una muestra aislada del tumor.

En una realización, los métodos pueden implicar la identificación de una pluralidad, es decir, más de un neoantígeno clonal.

En una realización, el número de neoantígenos clonales es de 2-1000. Por ejemplo, el número de neoantígenos clonales puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000, por ejemplo, el número de neoantígenos clonales puede ser de 2 a 100.

En una realización preferida, el método puede proporcionar una pluralidad o población, es decir, más de una, de células T en la que la pluralidad de células T comprende una célula T que reconoce un neoantígeno clonal y una célula T que reconoce un neoantígeno clonal diferente. Como tal, el método proporciona una pluralidad de células T que reconocen diferentes neoantígenos clonales.

En una realización preferida, el número de neoantígenos clonales reconocidos por la pluralidad de células T es de 2-1000. Por ejemplo, el número de neoantígenos clonales reconocidos puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000, por ejemplo, el número de neoantígenos clonales reconocidos puede ser de 2 a 100.

En un aspecto, una pluralidad de células T reconoce el mismo neoantígeno troncal.

#### Muestras tumorales

Como se describe en el presente documento, las mutaciones clonales son aquellas presentes en esencialmente todas las células cancerosas aisladas de un tumor. Las referencias en el presente documento a "esencialmente todas" pretenden abarcar la mayoría de las células tumorales en un sujeto. Por ejemplo, esto puede comprender 60-100% de células, por ejemplo, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 80, 81, 82, 83, 84, 85 , 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100% de las células tumorales en un sujeto.

El aislamiento de biopsias y muestras de tumores es una práctica común en la técnica y se puede realizar de acuerdo con cualquier método adecuado y tales métodos serán conocidos por los expertos en la técnica.

El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido.

El método descrito en el presente documento puede comprender, por ejemplo, determinar las mutaciones presentes en las células cancerosas de una o más regiones tumorales aisladas de un tumor.

Por ejemplo, el método puede comprender determinar las mutaciones presentes en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o al menos diez o más biopsias aisladas de un tumor. El método también se puede utilizar para determinar mutaciones del tronco (troncal) en una biopsia.

Las muestras de tumor individuales pueden aislarse de diferentes regiones ubicadas a lo largo de un tumor dentro de un sitio primario o entre primario y metástasis o dentro de una metástasis o entre metástasis. Por ejemplo, la determinación de las mutaciones presentes en tumores que se sabe que presentan una histología morfológica dispar

en diferentes regiones puede implicar la determinación de las mutaciones presentes en varias muestras individuales aisladas de regiones morfológicamente dispares.

5 La muestra puede ser una muestra de sangre. Por ejemplo, la muestra de sangre puede comprender ADN tumoral circulante, células tumorales circulantes o exosomas que comprenden ADN tumoral.

10 La determinación de mutaciones presentes en una muestra de tumor se puede realizar comparando secuencias de ADN y/o ARN aisladas de muestras tumorales y muestras sanas comparativas del mismo sujeto mediante secuenciación del exoma, secuenciación del genoma completo, secuenciación del panel de genes dirigidos y/o secuenciación de ARN, por ejemplo. Las descripciones de la secuenciación del Exoma y la secuenciación del ARN, las proporcionan Boa et al., (Cancer Informatics. 2014; 13 (Supl. 2): 67-82) y Ares et al., (Cold Spring Harb. Protoc., 3 de noviembre de 2014; 2014 (11): 1139-48), respectivamente.

15 La alineación de secuencias para identificar diferencias de nucleótidos (por ejemplo, SNV) en el ADN y/o ARN de una muestra tumoral en comparación con el ADN y/o ARN de una muestra no tumoral se puede realizar usando métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las diferencias de nucleótidos en comparación con una muestra de referencia se pueden realizar usando el método descrito por Koboldt et al., (Genome Res.; 2012; 22: 568-576). La muestra de referencia puede ser la secuencia de ADN y/o ARN de línea germinal.

## 20 Alelos del HLA

Las células T que reconocen específicamente un neoantígeno se denominan en el presente documento células T específicas de neoantígeno (NES).

25 Los antígenos se presentan a las células T en el contexto de péptidos derivados de antígenos unidos por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

30 Por lo tanto, un neoantígeno troncal puede ser reconocido por una célula T NES como un péptido derivado de neoantígeno troncal (denominado en el presente documento como un "péptido neoantígeno troncal") presentado por una molécula del MHC.

35 Un péptido de neoantígeno troncal es un péptido que se deriva de la región de un polipéptido que comprende una mutación específica de una célula cancerosa. Como tales, los péptidos de neoantígeno troncal no deben derivarse de polipéptidos codificados por el genoma de células sanas.

40 Las proteínas del MHC de clase I forman un receptor funcional en la mayoría de las células nucleadas del cuerpo. Hay 3 genes principales del MHC de clase I en HLA: HLA-A, HLA-B, HLA-C y tres genes menores HLA-E, HLA-F y HLA-G. La β2-microglobulina se une a subunidades de genes mayores y menores para producir un heterodímero.

45 Los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase I tienen típicamente de 7 a 13, más habitualmente de 8 a 11 aminoácidos de longitud. La unión del péptido se estabiliza en sus dos extremos mediante contactos entre los átomos de la cadena principal del péptido y los sitios invariantes en el surco de unión del péptido de todas las moléculas del MHC de clase I. Hay sitios invariantes en ambos extremos del surco que se unen a los extremos terminales amino y carboxilo del péptido. Las variaciones en la longitud del péptido se acomodan mediante un retorcimiento en la estructura del péptido, a menudo en los residuos de prolina o glicina que permiten la flexibilidad requerida.

50 Hay 3 proteínas de MHC de clase II principales y 2 secundarias codificadas por el HLA. Los genes de la clase II se combinan para formar receptores proteicos heterodiméricos ( $\alpha\beta$ ) que se expresan típicamente en la superficie de las células presentadoras de antígenos.

55 Los péptidos que se unen a moléculas de MHC de clase II tienen típicamente entre 8 y 20 aminoácidos de longitud, más habitualmente entre 10 y 17 aminoácidos de longitud, y pueden ser más largos (por ejemplo, hasta 40 aminoácidos). Estos péptidos se encuentran en una conformación extendida a lo largo del surco de unión al péptido del MHC II que (a diferencia del surco de unión al péptido del MHC de clase I) está abierto en ambos extremos. El péptido se mantiene en su lugar principalmente por los contactos del átomo de la cadena principal con los residuos conservados que recubren el surco de unión del péptido.

60 Los métodos descritos en el presente documento pueden implicar la etapa de evaluar los alelos del HLA de un sujeto para determinar si un péptido de neoantígeno troncal se unirá a una molécula de MHC expresada por el sujeto.

65 El perfil de alelos del HLA de un individuo puede determinarse mediante métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, el perfil del HLA de un individuo puede determinarse mediante serotipificación del HLA y/o secuenciación del gen del HLA. El fenotipado del HLA con PCR de cebador específico único (SSP-PCR) es una estrategia alternativa para determinar el perfil del HLA de un individuo.

En los presentes ejemplos, el perfil del HLA de un individuo se determina mediante la secuenciación del locus del HLA y el procesamiento usando el algoritmo de predicción OptiType para determinar el tipo del HLA para cada individuo (Szolek et al.; Bioinformatics; 2014; 30 (23): 3310-3316).

- 5 La unión de un péptido a una molécula de MHC particular puede predecirse usando métodos que son conocidos en la técnica. Los ejemplos de métodos para predecir la unión de MHC incluyen los descritos por Lundegaard et al., (Nucleic Acids Res. 2008; W509-12.2008 & Bioinformatics. 1 de junio de 2008; 24 (11): 1397-8) y Shen et al., (Proteome Sci., 7 de noviembre de 2013; 11 (Supl. 1): S15).
- 10 Los métodos descritos en este documento pueden comprender la determinación de un péptido neoantígeno troncal que se predice que se une a una molécula de MHC expresada por el sujeto. En particular, los métodos pueden comprender la etapa de determinar y seleccionar un péptido de neoantígeno troncal que se predice que se une fuertemente a una molécula de MHC expresada por el sujeto. La definición exacta de 'unión fuerte' dependerá del método utilizado para predecir la interacción de unión del MHC (véase Lundegaard et al., (citado anteriormente), por ejemplo. Sin embargo, en todos los casos, se predecirá que el péptido neoantígeno troncal seleccionado será capaz de unirse a, y presentarse en el contexto de, una molécula de MHC expresada por el sujeto.

La afinidad de unión a un péptido de neoantígeno troncal puede ser inferior a 500 nM. Por "alta afinidad" puede significar una afinidad de unión de 0 a 50 nM. En otras realizaciones, el péptido neoantígeno troncal puede unirse a la molécula de MHC con una afinidad intermedia de afinidad de unión de 50 a 150 nM, o una afinidad baja de afinidad de unión de 150 a 500 nM.

En determinadas realizaciones, se puede predecir que el péptido neoantígeno troncal se une a la molécula de MHC con una alta afinidad mientras que un péptido de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, un péptido equivalente derivado de la misma región del polipéptido de tipo silvestre correspondiente) se predice que se une a la misma molécula de MHC con baja afinidad.

#### Población de células T

30 En el presente documento se describe un método para proporcionar una población de células T que se dirige a un neoantígeno troncal de un tumor.

La población de células T puede comprender células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> o células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.

35 Las células auxiliares T (células TH) ayudan a otros glóbulos blancos en los procesos inmunológicos, incluida la maduración de las células B en células plasmáticas y células B de memoria, y la activación de células T citotóxicas y macrófagos. Las células TH expresan CD4 en su superficie. Las células TH se activan cuando se les presentan antígenos peptídicos por moléculas MHC de clase II en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Estas células pueden diferenciarse en uno de varios subtipos, incluidos TH1, TH2, TH3, TH17, Th9 o TFH, que secretan diferentes citocinas para facilitar diferentes tipos de respuestas inmunitarias.

40 Las células T citotóxicas (células TC o CTL) destruyen las células infectadas por virus y las células tumorales, y también están implicadas en el rechazo de trasplantes. Las CTL expresan CD8 en su superficie. Estas células reconocen sus objetivos al unirse al antígeno asociado con el MHC de clase I, que está presente en la superficie de todas las células nucleadas. A través de IL-10, adenosina y otras moléculas secretadas por las células T reguladoras, las células CD8<sup>+</sup> pueden inactivarse, lo que previene enfermedades autoinmunes.

45 Las poblaciones de células T producidas de acuerdo con la presente invención pueden enriquecerse con células T que son específicas para, es decir, neoantígenos troncales objetivo. Es decir, la población de células T que se produce de acuerdo con la presente invención tendrá un mayor número de células T que se dirigen a uno o más neoantígenos troncales. Por ejemplo, la población de células T de la invención tendrá un mayor número de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal en comparación con las células T en la muestra aislada del sujeto. Es decir, la composición de la población de células T diferirá de la de una población de células T "nativas" (es decir, una población que no se ha sometido a las etapas de identificación y expansión descritos en el presente documento), en que el porcentaje o la proporción de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal aumentará.

50 Las poblaciones de células T producidas de acuerdo con la presente invención pueden enriquecerse con células T que son específicas de, es decir, neoantígenos troncales objetivo (es decir, neoantígenos clonales, como se usan en el presente documento los términos neoantígeno "troncal" y neoantígeno "clonal" son equivalentes, y los términos neoantígeno "ramificado" y neoantígeno "subclonal" son equivalentes), y pueden tener una proporción de células T que se dirigen a neoantígenos troncales con respecto a las células T que se dirigen a neoantígenos ramificados que serán más altos a favor de las células T que se dirigen a los neoantígenos troncales en comparación con las células T en la muestra aislada del sujeto.

55 Es decir, la población de células T que se produce de acuerdo con la presente invención tendrá un número mayor de células T que se dirigen a uno o más neoantígenos troncales. Por ejemplo, la población de células T de la invención

- 5 tendrá un mayor número de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal en comparación con las células T en la muestra aislada del sujeto. Es decir, la composición de la población de células T diferirá de la de una población de células T "nativas" (es decir, una población que no se ha sometido a las etapas de identificación y expansión descritas en el presente documento), en que el porcentaje o la proporción de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal aumentará, y la proporción de células T en la población que se dirigen a los neoantígenos troncales con respecto a las células T que se dirigen a los neoantígenos ramificados será mayor a favor de las células T que se dirigen a los neoantígenos troncales.
- 10 La población de células T de acuerdo con la invención puede tener al menos aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal. Por ejemplo, la población de células T puede tener aproximadamente 0,2%-5%, 5%-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-70% o 70-100% de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal. En un aspecto, la población de células T tiene al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5% de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal, por ejemplo, al menos aproximadamente 2% o al menos 2% de células T que se dirigen a un neoantígeno troncal.
- 15 En otras palabras, la población de células T puede tener no más de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4; 99,5; 99,6; 99,7; 99,8% de células T que no se dirigen a un neoantígeno troncal. Por ejemplo, la población de células T no puede tener más de aproximadamente 95%-99,8%, 90%-95%, 80-90%, 70-80%, 60-70%, 50-60%, 30-50% o 0-30% de células T que no se dirigen a un neoantígeno troncal. En un aspecto, la población de células T no tiene más de aproximadamente 99, 98, 97, 96 o 95% de células T que no se dirigen a un neoantígeno troncal, por ejemplo, no más de aproximadamente 98% o 95% de células T que no se dirigen a un neoantígeno troncal.
- 20 25 Una población expandida de células T reactivas con neoantígeno troncal puede tener una actividad más alta que una población de células T no expandidas, por ejemplo, usando un péptido neoantígeno troncal. La referencia a "actividad" puede representar la respuesta de la población de células T a la reestimulación con un péptido neoantígeno troncal, por ejemplo, un péptido correspondiente al péptido usado para la expansión, o una mezcla de péptidos de neoantígeno troncal. En la técnica se conocen métodos adecuados para analizar la respuesta. Por ejemplo, se puede medir la producción de citocinas (por ejemplo, se puede medir la producción de IL-2 o IFNy). La referencia a una "actividad superior" incluye, por ejemplo, un aumento de actividad de 1-5, 5-10, 10-20, 20-50, 50-100, 100-500, 500-1000 veces. En un aspecto, la actividad puede ser más de 1000 veces mayor.
- 30 35 En una realización preferida, la invención proporciona una pluralidad o población, es decir, más de una, de células T en las que la pluralidad de células T comprende una célula T que reconoce un neoantígeno clonal y una célula T que reconoce un neoantígeno clonal diferente. Como tal, la invención proporciona una pluralidad de células T que reconocen diferentes neoantígenos clonales. Diferentes células T en la pluralidad o población pueden tener alternativamente diferentes TCR que reconocen el mismo neoantígeno troncal.
- 40 45 50 En una realización preferida, el número de neoantígenos clonales reconocidos por la pluralidad de células T es de 2 a 1000. Por ejemplo, el número de neoantígenos clonales reconocidos puede ser 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000, preferiblemente de 2 a 100. Puede haber una pluralidad de células T con diferentes TCR pero que reconocen el mismo neoantígeno clonal.
- 55 60 65 La población de células T puede estar compuesta en su totalidad o principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, o todas o principalmente compuestas por una mezcla de células T CD8<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup> o todas o principalmente compuestas por células T CD4<sup>+</sup>.
- En realizaciones particulares, la población de células T se genera a partir de células T aisladas de un sujeto con un tumor.
- Por ejemplo, la población de células T puede generarse a partir de células T en una muestra aislada de un sujeto con un tumor. La muestra puede ser una muestra tumoral, una muestra de sangre periférica o una muestra de otros tejidos del sujeto.
- En una realización particular, la población de células T se genera a partir de una muestra del tumor en la que se identifica el neoantígeno troncal. En otras palabras, la población de células T se aísla de una muestra derivada del tumor de un paciente a tratar. Tales células T se denominan en el presente documento como "linfocitos infiltrantes de tumores" (TIL).
- Las células T pueden aislarse usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T pueden purificarse a partir de suspensiones de células individuales generadas a partir de muestras sobre la base de la expresión de CD3, CD4 o CD8. Las células T pueden enriquecerse a partir de muestras mediante el paso a través de un gradiente de Ficoll-Paque.

- La expansión de las células T NES se puede realizar usando métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, las células T NES pueden expandirse mediante cultivo *ex vivo* en condiciones que se sabe que proporcionan estímulos mitógenos para las células T. A modo de ejemplo, las células T NES pueden cultivarse con citoquinas tales como IL-2 o con anticuerpos mitógenos tales como anti-CD3 y/o CD28. Las células T NES también pueden cultivarse conjuntamente con células presentadoras de antígeno (APC) irradiadas, tales como células dendríticas pulsadas con péptidos que contienen las mutaciones troncales identificadas como estimulantes únicos o como agrupaciones de neoantígenos o péptidos troncales estimulantes.
- 5 La expansión de las células T NES se puede realizar usando métodos que son conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, el uso de células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC), por ejemplo que proporcionan señales coestimuladoras adicionales, y PBMC autólogas que presentan péptidos apropiados. A modo de ejemplo, las PBMC autólogas pueden pulsarse con péptidos que contienen mutaciones troncales como se describe en este documento como estimulantes únicos, o alternativamente como agrupaciones de péptidos estimulantes de neoantígeno troncal.
- 10 Un método puede producir una composición que comprende una célula presentadora de antígeno y un neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal. El neoantígeno troncal puede identificarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Dicho método puede comprender las siguientes etapas:
- 15 (a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:
- 20 i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;
- 25 o  
i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;  
iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y
- 30 b) producir una composición que comprende dicho neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal y una célula presentadora de antígeno.
- 35 Una composición puede comprender una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, una célula dendrítica y un neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal. El neoantígeno troncal puede identificarse de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento.
- 40 La composición se puede producir de acuerdo con un método como se describe en este documento. La composición también se puede usar en los métodos descritos en este documento, por ejemplo en métodos para producir una célula T o una población o composición de células T como se describe en este documento.
- 45 Las composiciones como se describen en el presente documento pueden ser una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.
- 50 Un método para proporcionar una población de células T que se dirija a un neoantígeno troncal en un tumor puede comprender las etapas de:
- 55 i) identificar una célula T de una muestra aislada de un sujeto que es capaz de reconocer específicamente dicho neoantígeno troncal; y  
ii) expandir la célula T para proporcionar una población de células T que se dirige al neoantígeno troncal, en el que dicha célula T se expande por cocultivo con células presentadoras de antígeno que presentan péptidos neoantígenos troncales derivados de dicho neoantígeno troncal.
- La población de células T resultante está enriquecida con células T que se dirigen a neoantígenos troncales.
- 60 En un aspecto, las células presentadoras de antígeno se han pulsado o cargado con dicho péptido.
- 65 Como se describe en el presente documento, una composición de células T puede comprender una población de células T específicas de neoantígeno troncal, en la que dicha población de células T específicas de neoantígeno troncal se produce mediante el cocultivo de células T con células presentadoras de antígeno que presentan péptidos neoantígenos.

En un aspecto, la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica. En un aspecto, se irradia la célula presentadora de antígeno.

En un aspecto, la célula presentadora de antígeno es una célula capaz de presentar el péptido relevante, por ejemplo, en el contexto del HLA correcto. Dicha célula puede ser una PBMC activada autóloga que expresa una molécula del HLA autóloga, o una célula no autóloga que expresa una serie del HLA coincidentes. En un aspecto, se irradia la célula presentadora de antígeno artificial.

Las células T NES también pueden enriquecerse mediante la estimulación inicial de TIL con neoantígenos troncales en presencia o ausencia de APC exógenas, seguida de estimulación policlonal y expansión con citocinas tales como IL-2 o con anticuerpos mitógenos tales como anti-CD3 y/o CD28. Tales métodos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase Forget et al., J Immunother. Nov-Dic de 2014; 37(9): 448-60, Donia et al., Cytotherapy. Agosto de 2014; 16(8): 1117-20, Donia et al., Scand J Immunol. Febrero de 2012; 75(2): 157-67 y Ye et al., J Transl Med. 9 de agosto de 2011; 9: 131.

La identificación de células T NES en una población inicial mixta de células T puede realizarse usando métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células T NES pueden identificarse usando multímeros de MHC que comprenden un péptido de neoantígeno troncal identificado por el método descrito en el presente documento.

Los multímeros de MHC son formas oligoméricas de moléculas de MHC, diseñadas para identificar y aislar células T con alta afinidad por antígenos específicos en medio de un gran grupo de células T no relacionadas. Se pueden usar multímeros para presentar MHC de clase 1, MHC de clase 2 o moléculas no clásicas (por ejemplo, CD1d).

Los multímeros de MHC más comúnmente usados son tetrámeros. Estos se producen típicamente biotinilando monómeros de MHC solubles, que normalmente se producen de forma recombinante en células eucariotas o bacterianas. Estos monómeros se unen luego a una cadena principal, tal como estreptavidina o avidina, creando una estructura tetravalente. Estas cadenas principales se conjugan con fluorocromos para aislar posteriormente las células T unidas mediante citometría de flujo, por ejemplo.

Un multímero de MHC puede comprender un péptido de neoantígeno troncal. El neoantígeno troncal puede identificarse mediante un método como se describe en este documento.

Un método para producir un multímero de MHC puede comprender las etapas de:

(a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:

i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y  
 ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

o

i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;  
 ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;  
 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y

(b) producir un péptido de neoantígeno troncal a partir de dicho neoantígeno troncal; y  
 (c) producir un multímero de MHC que comprende dicho péptido neoantígeno troncal.

Los multímeros de MHC se pueden usar en métodos para identificar, aislar, expandir o bien producir una célula T, una población de células T o una composición de acuerdo con la presente invención. Los péptidos de neoantígeno troncal se pueden sintetizar usando métodos que son conocidos en la técnica.

El término "péptido" se usa en el sentido normal para significar una serie de residuos, típicamente L-aminoácidos, conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos α-amino y carboxilo de aminoácidos adyacentes. El término incluye péptidos modificados y análogos de péptidos sintéticos.

El péptido se puede preparar usando métodos químicos (Peptide Chemistry, A Practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin). Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse mediante técnicas de fase sólida (Roberge JY et al., (1995) Science 269: 202-204), escindirse de la resina y purificarse mediante cromatografía líquida preparativa de alta resolución (por ejemplo, Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principle, WH Freeman and Co, Nueva York, NY). La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

El péptido puede obtenerse alternativamente por medios recombinantes o por escisión del polipéptido que es o comprende el neoantígeno. La composición de un péptido puede confirmarse mediante análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman).

5 El péptido neoantígeno troncal puede comprender la mutación específica/mutación troncal de células cancerosas (por ejemplo, la sustitución de aminoácidos no silenciosa codificada por un SNV) en cualquier posición de residuo dentro del péptido. A modo de ejemplo, un péptido que es capaz de unirse a una molécula de MHC de clase I tiene típicamente de 7 a 13 aminoácidos de longitud. Como tal, la sustitución de aminoácidos puede estar presente en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 en un péptido que comprende trece aminoácidos.

10 En un aspecto adicional, se pueden usar péptidos más largos, por ejemplo 27-31 mers, y la mutación puede estar en cualquier posición, por ejemplo en el centro del péptido, por ejemplo, en las posiciones 13, 14, 15 o 16 también se pueden usar para estimular tanto las células CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup> para que reconozcan neoantígenos clonales

15 Un multímero de MHC puede comprender un péptido neoantígeno troncal como se define en el presente documento.

#### Composición de la célula T

20 Como se describe en el presente documento, la presente divulgación se refiere a una composición de células T que comprende una célula T específica de neoantígeno troncal.

25 La composición de células T puede ser una composición farmacéutica que comprende una pluralidad de células T específicas de neoantígeno como se define en el presente documento. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa.

30 En una realización preferida de la presente invención, el sujeto descrito en el presente documento es un mamífero, preferiblemente un ser humano, gato, perro, caballo, burro, oveja, cerdo, cabra, vaca, ratón, rata, conejo o cobaya, pero lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

35 Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*, por ejemplo para el tratamiento *in situ* o para el tratamiento *ex vivo* seguido de la administración de las células tratadas al cuerpo.

40 45 En ciertos aspectos como se describe en el presente documento, la célula T o la población o composición de células T se reinfunde en un sujeto, por ejemplo, después del aislamiento y expansión de las células T como se describe en el presente documento. Los expertos en la técnica conocerán métodos adecuados para lograr esto. Por ejemplo, se conocen en la técnica métodos para generar, seleccionar y expandir células T, véase por ejemplo Dudley J. Immunother. 2003; 26 (4): 332-342 y Rosenberg et al., 2011, Clin Cancer Res: 17 (13): 4550-7. Los métodos para reinfundir células T se describen, por ejemplo, en Dudley et al., Clin Cancer Res. 15 de diciembre de 2010; 16 (24): 6122-6131. 2011 y Rooney et al., Blood. 1 de septiembre de 1998; 92 (5): 1549-5.

45 La célula T específica de neoantígeno troncal puede ser cualquier célula T que sea capaz de reconocer un neoantígeno troncal (es decir, una célula T NES).

50 55 Por ejemplo, la célula T NES puede ser una célula T proporcionada por un método como se describe en el presente documento.

55 La célula T NES puede ser una célula T modificada. Por ejemplo, la célula T NES puede expresar un receptor de antígeno químérico (CAR) o un receptor de célula T (TCR) que se une específicamente a un neoantígeno troncal o un péptido de neoantígeno troncal (por ejemplo, un receptor de células T con afinidad mejorada (TCR) que se une específicamente a un neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal).

60 65 Los CAR son proteínas que, en su formato habitual, injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal (mAb) a la función efectora de una célula T. Su forma habitual es la de una proteína de dominio transmembrana de tipo I con un extremo amino que reconoce un antígeno, un espaciador, un dominio transmembrana, todos conectados a un endodomino compuesto que transmite señales de activación y supervivencia de las células T.

65 La forma más común de estas moléculas usa fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) derivados de anticuerpos monoclonales para reconocer un antígeno objetivo. El scFv se fusiona mediante un espaciador y un dominio transmembrana a un endodomino de señalización. Tales moléculas dan como resultado la activación de la célula T en respuesta al reconocimiento por el scFv de su objetivo. Cuando las células T expresan dicho CAR, reconocen y destruyen las células objetivo que expresan el antígeno objetivo. Se han desarrollado varios CAR contra antígenos asociados a tumores, y los enfoques de transferencia adoptiva que utilizan tales células T que expresan CAR se encuentran actualmente en ensayo clínico para el tratamiento de varios cánceres.

- Los TCR potenciados por afinidad se generan identificando un clon de células T a partir del cual se clonian las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR con la especificidad objetivo deseada. El TCR candidato luego sufre mutagénesis dirigida por PCR en las regiones determinantes complementarias de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Las mutaciones en cada región CDR se criban para seleccionar mutantes con mayor afinidad sobre el TCR nativo. Una vez completados, los candidatos principales se clonian en vectores para permitir las pruebas funcionales en células T que expresan el TCR de afinidad mejorada.
- Las células T NES pueden portar TCR de alta afinidad y, por lo tanto, puede que no sea necesaria la mejora de la afinidad. Los TCR de alta afinidad pueden aislar las células T NES de un sujeto y pueden no requerir una mejora de la afinidad.
- Los clones de células T candidatos capaces de unirse a un péptido neoantígeno troncal pueden identificarse usando los multímeros de MHC que comprenden el péptido neoantígeno troncal como se describe en el presente documento, por ejemplo.
- Los TCR y/o CAR identificados que se dirigen específicamente a un péptido neoantígeno troncal o un neoantígeno troncal pueden expresarse en células T autólogas de un sujeto utilizando métodos que son conocidos en la técnica, por ejemplo, introduciendo ADN o ARN codificantes para el TCR o CAR por uno de los muchos medios que incluyen la transducción con un vector viral, la transfección con ADN o ARN.
- Las células T autólogas pueden ser de una muestra aislada de un sujeto como se describe en este documento. La divulgación abarca una célula T como se describe en el presente documento, por ejemplo, una célula T modificada.
- Vacuna
- Puede producirse una vacuna que comprende un neoantígeno troncal o un péptido de neoantígeno troncal. Por ejemplo, el neoantígeno troncal o el péptido neoantígeno troncal pueden identificarse mediante el método descrito en el presente documento. En un aspecto, la vacuna puede comprender más de un neoantígeno troncal o péptido neoantígeno troncal diferente, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 péptidos diferentes. El neoantígeno troncal también puede estar en forma de proteína.
- La vacuna puede comprender un polipéptido que comprende un neoantígeno troncal como se define en el presente documento. La vacuna puede comprender más de un polipéptido diferente, cada uno de los cuales comprende un neoantígeno troncal, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polipéptidos diferentes.
- La vacuna puede ser una composición farmacéutica que comprende adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Tal formulación puede, por ejemplo, estar en una forma adecuada para infusión intravenosa. Véase, por ejemplo, Butterfield, BMJ. 2015; 22; 350 para una discusión sobre las vacunas contra el cáncer.
- En particular, la vacuna puede comprender adicionalmente un adyuvante. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, emulsiones oleosas y componentes bacterianos (por ejemplo, LPS y liposomas).
- Las dosis adecuadas de péptidos en la vacuna pueden ser determinadas por un experto en la técnica. La dosis puede depender del péptido que se vaya a utilizar. Para el uso *in vivo* de un péptido, se puede emplear una dosis *in vivo* de 0,1-4000  $\mu$ g, por ejemplo, 0,1 a 2000  $\mu$ g, 0,1 a 1000  $\mu$ g o 0,1 a 500  $\mu$ g, por ejemplo 0,1 a 100  $\mu$ g.
- La vacuna como se analiza en este documento puede conducir a la generación de una respuesta inmune en el sujeto. Una "respuesta inmune" que puede generarse puede ser inmunidad humoral y/o mediada por células, por ejemplo, la estimulación de la producción de anticuerpos, o la estimulación de células citotóxicas o asesinas, que pueden reconocer y destruir (o eliminar) las células que expresan抗ígenos correspondiente a los抗ígenos de la vacuna en su superficie. El término "estimular una respuesta inmune" incluye, por lo tanto, todos los tipos de respuestas inmunes y mecanismos para estimularlas y abarca CTL estimulantes que forma un aspecto preferido de la divulgación.
- Preferiblemente, la respuesta inmune que se estimula son células T CD8 $^{+}$  citotóxicas y células T CD4 $^{+}$  auxiliares. El alcance de una respuesta inmune puede evaluarse mediante marcadores de una respuesta inmune, por ejemplo, moléculas secretadas tales como IL-2 o IFN $\gamma$  o la producción de células T específicas de抗ígeno.
- Además, se puede administrar una vacuna de neoantígeno troncal en forma de una célula, tal como una célula presentadora de抗ígeno, por ejemplo, como una vacuna de células dendríticas. La célula presentadora de抗ígenos, tal como una célula dendrítica, puede ser pulsada o cargada con el neoantígeno troncal o el péptido neoantígeno troncal o modificada genéticamente (mediante transferencia de ADN o ARN) para expresar uno, dos o más neoantígenos troncales o péptidos neoantígenos troncales (véase, por ejemplo, Butterfield, 2015 citado anteriormente; Palucka, 2013 citado anteriormente), por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 neoantígenos troncales o péptidos neoantígenos troncales. Los métodos para preparar vacunas de células dendríticas se conocen en la técnica.

Las vacunas adecuadas también pueden estar en forma de vacunas de ADN o ARN relacionadas con neoantígenos troncales o péptidos de neoantígenos troncales como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar como vacuna de ADN o ARN que codifica uno o más neoantígenos troncales, o péptidos o proteínas derivados del mismo, por ejemplo mediante inyección directa a un sujeto. Por ejemplo, ADN o ARN que codifica 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 neoantígenos troncales, o péptidos o proteínas derivados de los mismos. Uno o más neoantígenos troncales o péptidos neoantígenos troncales pueden administrarse mediante un vector bacteriano o viral que contiene secuencias de ADN o ARN que codifican uno o más neoantígenos troncales o péptidos neoantígenos troncales.

5 Las vacunas que se describen en el presente documento se pueden administrar de cualquier forma adecuada. Por 10 ejemplo, puede usarse cualquier mecanismo de administración adecuado conocido en la técnica. La vacuna puede implicar el uso de un sistema de administración de vectores, o puede que no sea necesario un sistema de administración de vectores. Los vectores pueden ser virales o bacterianos. Los liposomas pueden usarse como sistema de administración. También se pueden usar vacunas contra la listeria o electroporación.

15 Una célula que expresa un neoantígeno troncal o un péptido de neoantígeno troncal en su superficie (o intracelularmente), o una población de tales células, puede ser obtenida (u obtenerse) mediante métodos como se define en el presente documento. En una realización preferida, la célula es una célula presentadora de antígeno, tal como una célula dendrítica.

20 Para la administración *in vivo* de células como se describe en el presente documento, se puede usar cualquier modo 25 de administración de la población celular que sea común o estándar en la técnica, por ejemplo, inyección o infusión, por una vía adecuada. En un aspecto, se administran de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  células por kg de sujeto (por ejemplo, de  $1,4 \times 10^4$  a  $2,8 \times 10^6$  por kg en humanos). En un aspecto, se administran aproximadamente o no más de  $10^7$  células 30 por kg de sujeto. De este modo, por ejemplo, en un ser humano, se puede administrar una dosis de 0,1 a  $20 \times 10^7$  células por kg de sujeto en una dosis, es decir, por dosis, por ejemplo, como una dosis de células T o una dosis de vacunación. En un aspecto, se administran entre  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  células, entre  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células, entre  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células o entre  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  células por kg de sujeto. Para aplicaciones de vacunación, se pueden usar  $1-20 \times 10^6$  células por dosis. La dosis puede repetirse en momentos posteriores si es necesario.

35 La vacuna descrita en este documento se puede usar en el tratamiento del cáncer.

Un método para tratar el cáncer en un sujeto puede comprender administrar una vacuna como se describe en el presente documento a dicho sujeto. El método puede comprender adicionalmente la etapa de identificar a un sujeto que tiene cáncer.

35 Un método para producir una vacuna puede comprender un péptido neoantígeno troncal o un neoantígeno troncal, comprendiendo dicho método las etapas de:

40 (a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:

45 i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

45 o

i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;  
ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;  
50 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y

(b) producir un péptido neoantígeno troncal o un neoantígeno troncal a partir de dicho neoantígeno troncal; y  
(c) producir una vacuna con dicho péptido neoantígeno troncal o proteína neoantígeno troncal.

55 En un aspecto, producir la vacuna implica preparar una vacuna de células dendríticas, en la que dicha célula dendrítica presenta un neoantígeno troncal o un péptido neoantígeno troncal.

También se puede usar una proteína neoantígeno troncal en las vacunas y métodos relacionados con la vacunación.

60 Un método para producir una vacuna que comprende una molécula de ADN o ARN que codifica un péptido neoantígeno troncal o un neoantígeno troncal, puede comprender las etapas de:

65 (a) identificar un neoantígeno troncal en un tumor de un sujeto que comprende las etapas de:

i) determinar mutaciones presentes en una muestra aislada del tumor; y

ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en esencialmente todas las células tumorales; y  
 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal;

- 5 o  
 i) determinar las mutaciones presentes en una pluralidad de muestras aisladas de un tumor;  
 ii) identificar una mutación troncal que es una mutación presente en todas las muestras;  
 10 iii) identificar un neoantígeno troncal, que es un antígeno codificado por una secuencia que comprende la mutación troncal; y  
 (b) producir una molécula de ADN o ARN que codifica el péptido neoantígeno troncal o el neoantígeno troncal; y  
 (c) producir una vacuna con dicha molécula de ADN o ARN.

15 La vacuna se puede administrar mediante métodos adecuados como se describió anteriormente.

En un aspecto, la vacunación es una vacunación terapéutica. En este aspecto, la vacuna se administra a un sujeto que tiene cáncer para tratar el cáncer.

20 En un aspecto adicional, la vacunación es una vacunación profiláctica. En este aspecto, la vacuna se administra a un sujeto que puede tener riesgo de desarrollar cáncer.

En un aspecto, la vacuna se administra a un sujeto que ha tenido cáncer previamente y en el que existe el riesgo de que el cáncer reaparezca.

25 Una vacuna también puede estar en forma de ADN o ARN que codifica uno o varios de los péptidos o proteínas neoantígenos troncales y administrada mediante métodos adicionales que incluyen, entre otros, vectores virales, células presentadoras de antígeno y electroporación.

30 Cáncer

Las células T que se dirigen específicamente a un neoantígeno troncal se pueden usar para tratar el cáncer.

35 "Tratar" se refiere al uso terapéutico de la composición de células T de acuerdo con la presente invención. En este documento, la composición de células T puede administrarse a un sujeto que tiene una enfermedad o afección existente para disminuir, reducir o mejorar al menos un síntoma asociado con la enfermedad y/o ralentizar, reducir o bloquear la progresión de la enfermedad.

40 El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, esofágico, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pulmón (células pequeñas, células no pequeñas y mesotelioma), cáncer de cerebro (por ejemplo, gliomas, astrocitomas, glioblastomas), melanoma, linfoma, cánceres de intestino delgado (duodenal y yeyunal), leucemia, cáncer de páncreas, tumores hepatobiliares, cánceres de células germinales, cáncer de próstata, cánceres de cabeza y cuello, cáncer de tiroides y sarcomas. En un aspecto preferido de la invención, el cáncer es cáncer de pulmón, preferiblemente cáncer de pulmón de células no pequeñas. En otro aspecto de la invención, el cáncer es melanoma.

45 El tratamiento que utiliza las composiciones de la presente invención también puede abarcar el direccionamiento de células tumorales circulantes y/o metástasis derivadas del tumor.

50 El tratamiento con la composición de células T de la presente invención que se dirige a uno o más neoantígenos troncales puede ayudar a prevenir la evolución de células tumorales resistentes a la terapia, que a menudo ocurre con enfoques estándar.

55 Los usos para tratar el cáncer de acuerdo con la presente invención se pueden realizar en combinación con terapias contra el cáncer adicionales. En particular, las composiciones de células T de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en combinación con terapia de bloqueo de puntos de control, anticuerpos coestimuladores, quimioterapia y/o radioterapia, terapia dirigida o terapia con anticuerpos monoclonales.

60 Los inhibidores de punto de control incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de PD-1, inhibidores de PD-L1, inhibidores de Lag-3, inhibidores de Tim-3, inhibidores de TIGIT, inhibidores de BTLA e inhibidores de CTLA-4, por ejemplo. Los anticuerpos coestimuladores entregan señales positivas a través de receptores inmunorreguladores que incluyen, entre otros, ICOS, CD137, CD27 OX-40 y GITR. En una realización preferida, el inhibidor de punto de control es un inhibidor de CTLA-4.

65 Una entidad quimioterapéutica como se usa en este documento se refiere a una entidad que es destructiva para una célula, es decir, la entidad reduce la viabilidad de la célula. La entidad quimioterapéutica puede ser un fármaco citotóxico. Un agente quimioterapéutico contemplado incluye, sin limitación, agentes alquilantes, antraciclinas,

epotilonas, nitrosoureas, etileniminas/metilmelaminas, alquilsulfonatos, agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de pirimidina, epipodofilotoxinas, enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica tales como IFNa, IL-2, G-CSF y GM-CSF; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino, antracenodionas, urea sustituida tal como hidroxiurea, derivados de metilhidracina que incluyen N-metilhidracina (MIH) y procarbazina, supresores adrenocorticales tales como mitotano (o, p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas que incluyen antagonistas de adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestinas tales como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógenos tales como equivalentes de dietilestilbestrol y etinilestradiol; antiestrógeno tal como tamoxifeno; andrógenos que incluyen propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida.

"En combinación" puede referirse a la administración de la terapia adicional antes, al mismo tiempo o después de la administración de la composición de células T de acuerdo con la presente invención.

Además o como alternativa a la combinación con el bloqueo de puntos de control, la composición de células T de la presente invención también puede modificarse genéticamente para hacerlas resistentes a los puntos de control inmunitarios utilizando tecnologías de edición de genes que incluyen, entre otras, TALEN y Crispr./Cas. Tales métodos son conocidos en la técnica, véase por ejemplo, el documento US20140120622. Se pueden usar tecnologías de edición de genes para prevenir la expresión de puntos de control inmunitarios expresados por células T que incluyen, entre otros, PD-1, Lag-3, Tim-3, TIGIT, BTLA CTLA-4 y combinaciones de estos. La célula T como se describe en el presente puede modificarse mediante cualquiera de estos métodos.

La célula T de acuerdo con la presente invención también puede modificarse genéticamente para expresar moléculas que aumentan la localización en los tumores y/o para administrar mediadores inflamatorios en el microambiente del tumor, que incluyen, entre otros, citocinas, receptores solubles reguladores del sistema inmunológico y/o ligandos.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de Ejemplos, que están destinados a ayudar a un experto en la técnica a llevar a cabo la invención y no están destinados de ninguna manera a limitar el alcance de la invención.

### **Ejemplos**

Ejemplo 1 - Identificación de neoantígenos troncales en tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas

Las muestras tumorales de un tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se sometieron a un análisis de secuencia de exón profundo para determinar el grado de heterogeneidad intratumoral (ITH), la carga mutacional en cada región tumoral y para distinguir las mutaciones presentes en todas las células tumorales de aquellas presentes en solo un subconjunto. En paralelo, las suspensiones de células individuales generadas a partir de las mismas regiones tumorales se procesaron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron para su posterior análisis y expansión *in vitro*.

Identificación de variantes de un solo nucleótido a partir de datos de secuenciación del exoma

La secuenciación del exoma se realizó en muestras de múltiples regiones aisladas de tumores de NSCLC. Las lecturas finales emparejadas sin procesar (100 pb) en formato FastQ generadas por el conducto de Illumina se alinearon con el ensamblaje genómico completo de hg19 (incluidos los cíntigos desconocidos) obtenido del paquete GATK 2.8, utilizando bwa mem (bwa-0.7.7) (Li y Durbin; 2009 ; Bioinformatics; 25 (14): 1754-60). Luego, se aplicaron las herramientas de Picard v1.107 para limpiar, ordenar y fusionar archivos de la misma región del paciente y para eliminar lecturas duplicadas (<http://broadinstitute.github.io/picard>). Las métricas de control de calidad se obtuvieron utilizando una combinación de herramientas de Picard (1.107), GATK (2.8.1) y FastQC (0.10.1) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Se usó SAMtools mpileup (0.1.16) (Li et al.; Bioinformatics; 2009; 25 (16): 2078-2079) para ubicar posiciones de no referencia en muestras tumorales y de línea germinal. Se omitieron las bases con una puntuación phred de <20 o las lecturas con una calidad de mapeo <20. El cálculo de BAQ está deshabilitado y el coeficiente para degradar la calidad del mapeo se establece en 50.

Las variantes somáticas de un solo nucleótido (SNV) entre el tumor y la línea germinal emparejada se determinaron utilizando VarScan2 somatic (v2.3.6) (Koboldt et al.; Genome Res. 2012. 22: 568-576) utilizando la salida de SAMtools mpileup. Se utilizaron parámetros predeterminados con la excepción de la cobertura mínima para la muestra de línea germinal establecida en 10, la frecuencia de variante mínima es 0,01 y la pureza tumoral 0,5. A continuación, se utilizó VarScan2 processSomatic para extraer las variantes somáticas.

Las llamadas SNV resultantes se filtraron en busca de falsos positivos utilizando el guión fpfilter.pl asociado de VarScan2, habiendo procesado primero los datos a través de bam-readcount (0.5.1). Además, se aplicó un filtrado adicional mediante el cual las variantes solo se aceptaron si estaban presentes en ≥ 5 lecturas y ≥ 5% de frecuencia

de alelos variantes (VAF) en al menos una región tumoral con VAF de línea germinal  $\leq 1\%$ . Si se encontraba una variante que cumplía con estos criterios en una sola región, entonces el umbral de VAF se reducía a  $\geq 1\%$  para detectar variantes de baja frecuencia en otras regiones tumorales.

5 Análisis de número de copias

Se generaron datos procesados del SNP del exoma de la muestra y del número de copias del tumor normal emparejado usando VarScan2 (v2.3.6). El número de copia de VarScan2 se procesó utilizando parámetros predeterminados con la excepción de cobertura mínima (8) y relación de datos. La relación de datos se calculó por muestra como se describe en Koboldt et al., (Genome Res.; 2012; 22: 568-576). La salida de VarScan se procesó luego usando el paquete Sequenza R 2.1.1 para proporcionar datos de número de copias segmentados y estimaciones de celularidad y ploidía para todas las muestras basadas en los datos de la secuencia del exoma. Se utilizaron las siguientes configuraciones: breaks.method = 'full', gamma = 40, kmin = 5, gamma.pcf = 200, kmin.pcf = 200.

10 15 Análisis de secuenciación de ARN

Las lecturas de extremos emparejados sin procesar se recortan y alinean con el genoma y el transcriptoma de referencia humano usando TopHat (versión 1.3.3) (Trapnell et al.; 2009; Bioinformatics; 25 (9): 1105-11). Los valores de expresión se calcularon luego como fragmentos por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (FPKM) usando Cufflinks (Trapnell et al.; 2010; Nat Biotech; 28 (5): 511-5), con normalización del cuartil superior, corrección de sesgo de fragmentos y corrección de múltiples lecturas habilitada.

20 25 Identificación de SNV troncales

El conjunto de SNV identificado se clasificó como troncal o ramificado basándose en sus estimaciones de fracción de células cancerosas (CCF) en todas las regiones tumorales secuenciadas. En resumen, el CCF, que describe la proporción de células cancerosas que albergan una mutación, se calcula integrando el número de copias y las estimaciones de pureza con frecuencias de alelos variantes.

30 35 Para cada variante, la frecuencia alélica variante esperada (VAF), dada la CCF, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{VAF (CCF)} = p * \text{CCF} / \text{CPN}_{\text{norm}} (1 - p) + p * \text{CPN}_{\text{mut}}$$

En la que  $\text{CPN}_{\text{mut}}$  corresponde al número de copia local del tumor, y  $p$  es la pureza tumoral y  $\text{CPN}_{\text{norm}}$  el número de copia local de la muestra normal emparejada.

Para una mutación dada con lecturas alternativas 'a' y una profundidad de 'N', la probabilidad de una CCF dada se estimó usando una distribución binomial

40  $P(\text{CCF}) = \text{binom}(a|N, \text{VAF}(\text{CCF}))$ .

A continuación, se calcularon los valores de CCF sobre una cuadrícula uniforme de 100 valores de CCF (0,01,1) y se normalizaron posteriormente para obtener una distribución posterior.

45 Se consideró troncal cualquier SNV presente de forma clonal (intervalo de confianza del 95% de  $\text{CCF} >= 0,75$ ) en todas las regiones tumorales secuenciadas. Por el contrario, cualquier SNV presente solo en un subconjunto de regiones tumorales o con un intervalo de confianza del 95% de  $\text{CCF} <= 0,75$  en cualquier región se consideró ramificado (véase la Figura 2 para resumen).

50 Ejemplo 2 - Predicciones del tipo del HLA

Para cada sujeto, los archivos de FASTQ de secuenciación del exoma completo de la línea germinal se mapearon con un archivo FASTA de referencia que contenía las secuencias de los alelos del HLA conocidos. El mapeo se realizó utilizando Razors3 (Weese et al.; Bioinformatics; 2012; 28 (20): 2592-2599) con un umbral de identidad porcentual de 90, un máximo de un acierto y un intervalo de distancia de 0. Una vez mapeados, los archivos SAM generados se convirtieron con FASTQ y se utilizaron como entrada para el algoritmo de predicción Optitype (Szolek et al.; Bioinformatics; 2014; 30 (23): 3310-3316) con parámetros predeterminados. Optitype genera un tipo del HLA de resolución prevista de 4 dígitos para cada paciente, que se almacenó para su uso en la predicción de unión a HLA.

60 Predicciones de unión a HLA

Se usaron mutaciones codificantes llamadas a partir de los datos de secuenciación del exoma completo de múltiples regiones del tumor para generar todos los posibles péptidos mutantes de 9-11 mer posibles a partir del neoantígeno, capturando el aminoácido mutado en cada posición del n mer.

65

Por tanto, para una mutación de SNV dada, se produjeron en total 446 péptidos. Además, también se generaron los correspondientes péptidos de tipo silvestre.

El archivo fasta que contiene todas las secuencias de péptidos mutantes y de tipo silvestre y el tipo del HLA de 4 dígitos predicho se utilizaron luego como entrada para NetMHC (Lundsgaard et al.; 2008; Nucleic Acids Res; 36: W509-12), que predice la afinidad de unión de cada péptido para los alelos del HLA específicos del paciente. Los péptidos que se predice que se unen a < 500 nM se clasificaron como neoantígenos débiles putativos, mientras que los que se unen a < 50 nM se clasificaron como neoantígenos fuertes putativos. Además, para cada péptido se calculó una puntuación delta que refleja la diferencia en la unión entre los péptidos mutantes y de tipo silvestre (véase la Figura 3).

#### Ejemplo 3 - Identificación de neoantígenos troncales putativos

Todos los neoantígenos putativos se clasificaron como troncales o ramificados basándose en su fracción de células cancerosas en las regiones tumorales secuenciadas (como se describe en el Ejemplo 1). Los péptidos de unión que se derivan de una mutación encontrada en cada región del tumor secuenciada se identificaron como posibles neoantígenos troncales (como se describe en el Ejemplo 2).

#### Filtrado de neoantígenos troncales putativos utilizando datos de secuenciación de ARN

Todos los neoantígenos troncales putativos se filtraron adicionalmente usando datos de secuenciación de ARN. Específicamente, la longitud media de la transcripción se usó para convertir de la FPKM calculada a TPM (transcripciones por millón) e identificar el neoantígeno troncal putativo como aquellos que se expresan en una mediana superior a 10 TPM.

#### Ejemplo 4: Procesamiento y expansión de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de muestras de NSCLC

Los tumores se trituraron en condiciones estériles seguido de digestión enzimática (RPMI-1640 con Liberase TL grado investigación (Roche) y DNAsa I (Roche)) a 37 °C durante 30 minutos antes de la separación mecánica del tejido usando gentleMACS (Miltenyi Biotech). Las suspensiones de células individuales resultantes se enriquecieron en leucocitos mediante el paso a través de un gradiente de Ficoll-Paque. Se contaron las células vivas y se congelaron a -80 °C antes de transferirlas a nitrógeno líquido. Los TIL se expandieron usando un protocolo de expansión rápida (REP) en matraces T25 que contenían medio EX-VIVO suplementado con suero humano al 10%, anti-CD3 soluble (OKT3), 6000 IU/ml de IL-2 humano recombinante (rhIL-2) y 2 x 10<sup>7</sup> PBMC irradiadas agrupadas de 3 donantes sanos alogénicos. Una vez que la expansión fue evidente, se añadió cada tres días medio fresco que contenía rhIL-2 a razón de 3000 UI/ml. Después de 2 semanas de expansión, los TIL se contaron, se fenotiparon y se congelaron a -80 °C antes de su uso en ensayos relevantes o almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido.

#### Identificación de células T específicas de neoantígeno (NES) utilizando multímeros de péptido soluble/HLA

Se sintetizaron las secuencias de péptidos neoantígenos mejor clasificados ( $n = 240$ ) y se usaron para generar multímeros de MHC elaborados a medida marcados con fluorescencia para la identificación de células T NES dentro de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) expandidos. Los TIL expandidos *in vitro* se tiñeron con multímeros de MHC fluorescentes elaborados a medida cargados con los péptidos mutados predichos o los péptidos de citomegalovirus (CMV) de control y se analizaron mediante citometría de flujo multicolor (véase la Figura 4).

#### Ejemplo 5 - Actividad destructora *ex vivo* e *in vivo* de células T NES

Se utilizan líneas de células tumorales autólogas y células T NES expandidas para demostrar la capacidad de estas células T para destruir dianas tumorales *in vitro* e *in vivo*.

Se identifican líneas de células tumorales que portan mutaciones troncales y células T NES expandidas autólogas. Se siembra un número fijo de células tumorales en placas de 96 pozos con números variables de células T NES. La actividad destructora *in vitro* de las células T NES se evalúa en diferentes puntos de tiempo (4-16 horas más tarde después de los ensayos de citometría de flujo estándar). Para los ensayos *in vivo*, los ratones inmunodeficientes (NSG) se desafían subcutáneamente con líneas de células tumorales y después del injerto o bien se dejan sin tratar o reciben una infusión iv de 1-5 x 10<sup>6</sup> células T NES autólogas expandidas *in vitro*.

Se mide el crecimiento tumoral en los grupos tratados y no tratados a lo largo del tiempo (cada 3 días).

Ejemplo 6: las células T que se dirigen a un neoantígeno clonal promueven el rechazo de tumores heterogéneos establecidos, mientras que las células T que se dirigen a un neoantígeno subclonal no lo hacen

Para comparar la actividad antitumoral *in vivo* de las células T que se dirigen a neoantígenos clonales en comparación con las que se dirigen a neoantígenos subclonales, se utilizó un modelo de ratón de melanoma (línea B16) y células

T transgénicas del receptor de células T (TCR Tg) que reconocen un neoantígeno clonal (trp1) o un neoantígeno subclonal (OTII).

5 Células T específicas para neoantígenos: Las células TCR Tg CD4<sup>+</sup>Trp1 reconocen un péptido derivado de Tyrp1, un antígeno presente en todas las células de melanoma B16. Las células TCR Tg Trp1 se generan en ratones que carecen de Tyrp1, por lo que reconocen a Tyrp1 como un neoantígeno.

10 Las células TCR Tg CD4<sup>+</sup>OTII reconocen un péptido derivado de ovoalbúmina (OVA), un neoantígeno modelo que puede introducirse artificialmente mediante ingeniería genética en líneas de células tumorales B16.

15 Para modelar neoantígenos clonales y subcloniales se usan células de melanoma B16 de ratón (que expresan Tyrp1) y células B16-OVA que también expresan Tyrp1 pero además transducidas para expresar OVA. Al mezclar estas 2 líneas celulares, se generó un modelo en el que Tyrp1 representa un neoantígeno clonal (expresado por todas las células tumorales) y OVA un neoantígeno subclonal (expresado solo por algunas células tumorales).

15 En resumen, se inyectaron ratones B6 el día 0 con una mezcla de 12,5 x 10<sup>4</sup> células B16 y 12,5 x 10<sup>4</sup> células B16-OVA. En el día 8 después de la inoculación del tumor, y cuando los tumores eran palpables, los ratones se irradiaron subletalmente (5Gy) y recibieron una infusión intravenosa (iv) de 30 x 10<sup>4</sup> células CD4 OT-II (reactivas al neoantígeno subclonal) o 6 x 10<sup>4</sup> células CD4 Trp-1 (reactivas al neoantígeno clonal) y 0,2 mg de anticuerpo anti-CTLA-4 intraperitoneal (ip). Los ratones recibieron dos dosis adicionales de anticuerpos anti-CTLA-4 los días 11 y 14 (0,1 mg). Como control, se usó un grupo de ratones desafiados con tumor pero no tratados.

25 La capacidad de las células OTII para rechazar tumores B16-OVA establecidos se demostró en un grupo adicional de ratones inoculados solo con 25 x 10<sup>4</sup> células B16-OVA (en este caso, OVA se expresa en todas las células B16-OVA en la masa tumoral, por lo que representa un neoantígeno clonal). El día 8, los ratones se irradiaron subletalmente (5Gy) y se trajeron con 30 x 10<sup>4</sup> células CD4 OT-II en forma iv y 0,2 mg de anticuerpo anti-CTLA-4 en forma ip. Los ratones recibieron dos dosis adicionales de anticuerpos anti-CTLA-4 los días 11 y 14 (0,1 mg).

## Resultados

30 En el grupo de control, los ratones desafiados con la mezcla de tumores heterogéneos (B16/B16-OVA) que contenían un neoantígeno clonal (tyrp1) y subclonal (OVA) y dejados sin tratar, crecieron los tumores y tuvieron que ser sacrificados entre los días 20 y 30 después de la exposición al tumor (Figura 5A). Sorprendentemente, todos los ratones desafiados con la mezcla tumoral B16/B16-OVA pero tratados con células TCR Tg TRP1 dirigidas a un neoantígeno clonal fueron capaces de rechazar sus tumores (Figura 5B).

40 Por el contrario, cuando los ratones se trajeron con células T TCR Tg OTII dirigidas a un neoantígeno subclonal, ninguno de los ratones fue capaz de rechazar su tumor (Figura 1C). Se observó un ligero retraso en la progresión del tumor en este grupo, lo que sugiere un control potencial de las células B16-OVA que expresan el neoantígeno subclonal, con una eventual progresión debido a la imposibilidad de rechazar las células tumorales que no expresan OVA (el neoantígeno subclonal) (Figura 5C). Finalmente (Figura 5D) se demuestra la capacidad de las células T TCR Tg OTII para rechazar tumores establecidos cuando todas las células del tumor expresan el neoantígeno OVA. Cada línea de cada gráfico representa un ratón independiente. Se utilizaron 6 ratones por grupo para estos experimentos. (Figura 5E) muestra todos los grupos experimentales y el tamaño medio del tumor en cada grupo.

45 Los datos demuestran la capacidad superior de las células T que se dirigen a neoantígeno clonal para rechazar tumores establecidos en comparación con las células T que solo se dirigen a neoantígenos subcloniales no expresados por todas las células tumorales dentro de una masa tumoral heterogénea.

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Una composición de células T para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto que comprende células T expandidas selectivamente para dirigirse a neoantígenos clonales característicos del cáncer del sujeto, en la que un neoantígeno clonal tiene una fracción de células cancerosas (CCF) con un intervalo de confianza del 95% mayor o igual a 0,75.
- 10      2. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que está enriquecida con células T que son específicas para neoantígenos clonales.
- 15      3. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la población expandida de células T reactivas con neoantígeno clonal tiene una actividad más alta que la población de células T que no se han expandido, medida por la respuesta de la población de células T a la reestimulación con un péptido neoantígeno clonal.
- 20      4. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la actividad se mide mediante la producción de citocinas, y en la que una actividad más alta es un aumento de actividad de 5 a 10 veces o más.
- 25      5. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas células T se han expandido selectivamente mediante un método que comprende las etapas de:
- 25      a) proporcionar una muestra que comprende una población de células T que es capaz de reconocer específicamente dicho neoantígeno; y
- 25      b) cultivar conjuntamente la población de células T con una composición que comprende el neoantígeno, o péptido neoantígeno, y una célula presentadora de antígeno;
- 30      en el que el neoantígeno se ha identificado en una muestra de un tumor de dicho sujeto como un neoantígeno clonal.
- 30      6. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichas células T se expanden selectivamente usando una pluralidad de neoantígenos clonales o péptidos neoantígenos clonales, en la que cada uno de dichos péptidos comprende una mutación clonal diferente.
- 35      7. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicha pluralidad de péptidos comprende entre 2 y 100 péptidos.
- 35      8. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que dicha célula presentadora de antígeno se ha cargado o pulsado con un péptido derivado de dicho neoantígeno clonal.
- 40      9. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que dicha célula presentadora de antígenos es una célula dendrítica.
- 40      10. Una composición de células T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que la población de células T se cultiva con IL-2 o anticuerpos anti-CD3 y/o CD28.
- 45      11. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en la que la población de células T se aísla de una muestra del tumor del paciente que se va a tratar.
- 50      12. Una composición de células T para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la población de células T comprende linfocitos infiltrantes de tumores (TIL).
- 50      13. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en la que la población de células T comprende células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup> o células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>.
- 55      14. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en la que se proporciona al menos una primera y una segunda célula T, en la que la primera célula T se dirige a un primer neoantígeno clonal generado por una primera mutación clonal y la segunda célula T se dirige a un segundo neoantígeno clonal generado por una segunda mutación clonal.
- 60      15. Una composición de células T para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en la que dicha población de células T expandida está enriquecida con células T que se dirigen a neoantígenos clonales en relación con la muestra de partida.
- 65      16. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición de células T se usa en combinación con un inhibidor de punto de control.

## ES 2 836 273 T3

17. Una composición de células T para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o melanoma.

FIGURA 1

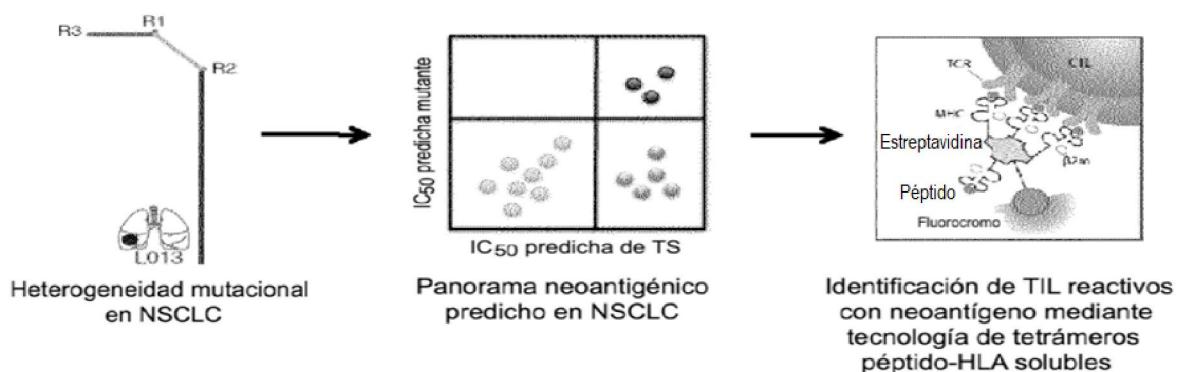


FIGURA 2

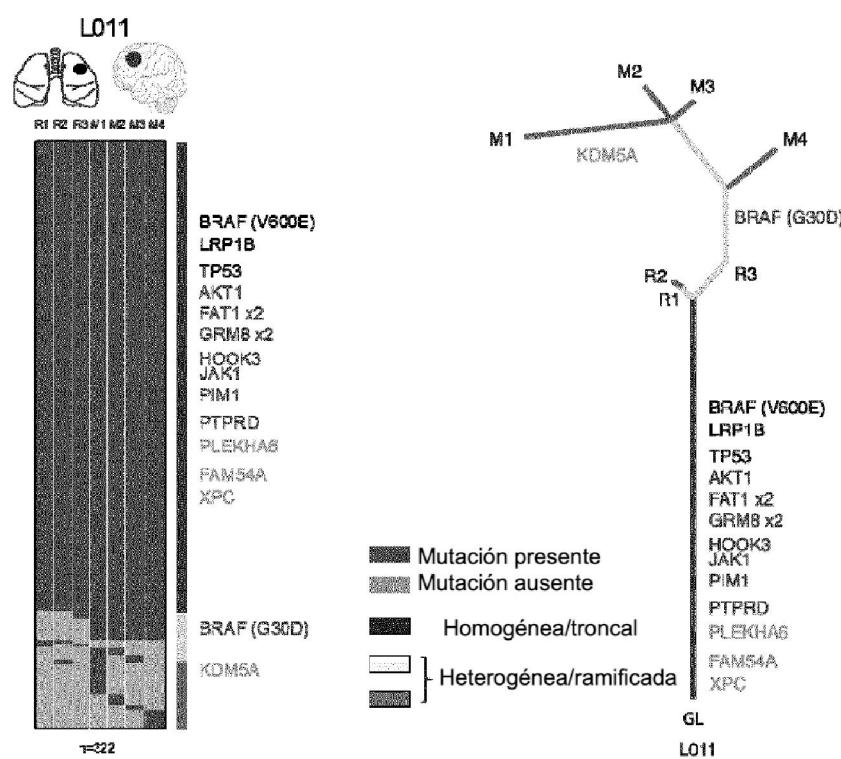


FIGURA 3

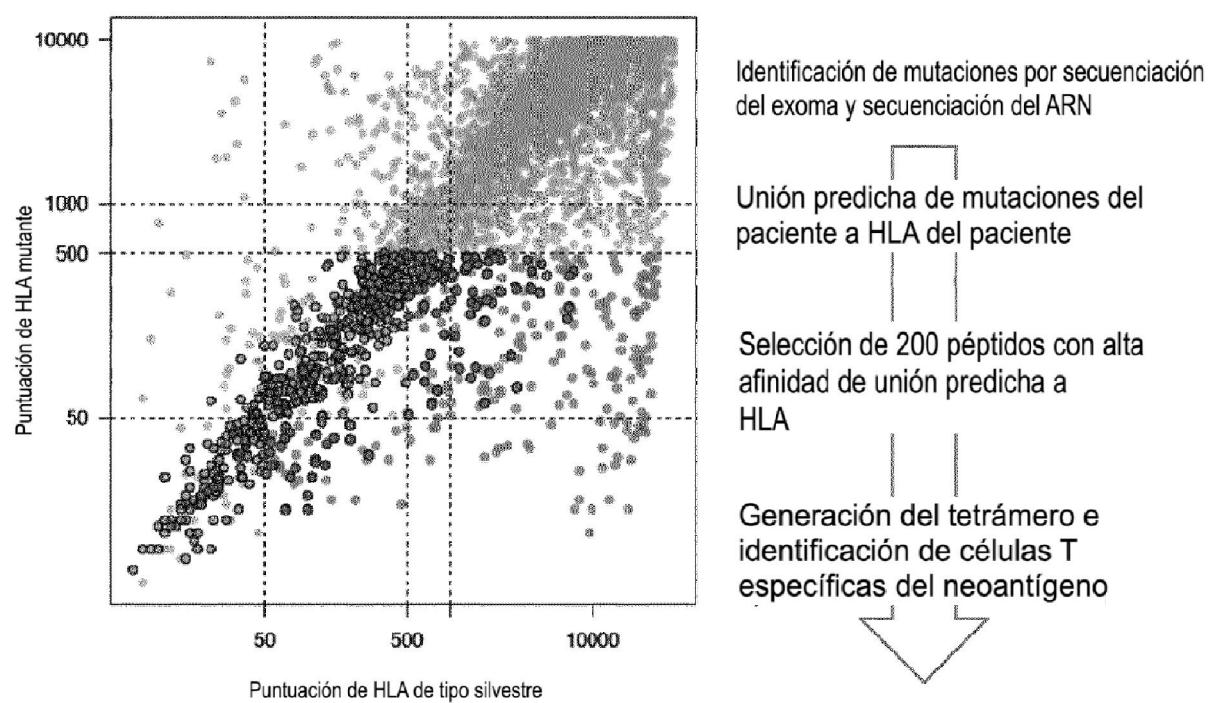


FIGURA 4

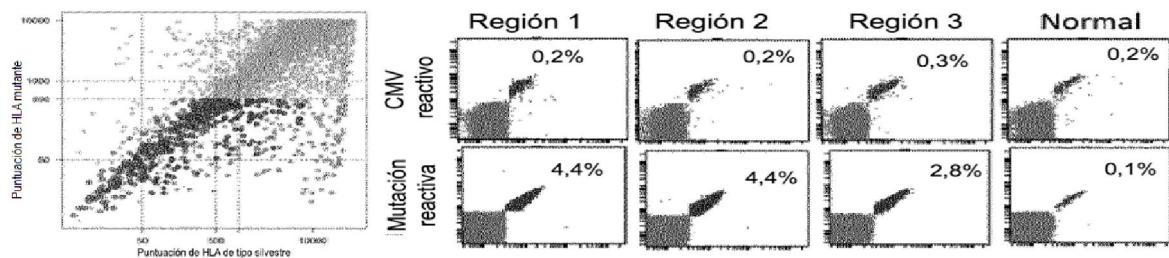


FIGURA 5

