

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 314**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2016 PCT/EP2016/066563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2016 E 16739451 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2023 EP 3322718**

54 Título: **Vacunas de histona contra el cáncer**

30 Prioridad:

**15.07.2015 EP 15176879**

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

**29.04.2024**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS  
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**PLATTEN, MICHAEL;  
OCHS, KATHARINA;  
OTT, MARTINA;  
BUNSE, THERESA;  
BUNSE, LUKAS y  
WICK, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

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

ES 2 967 314 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**

Vacunas de histona contra el cáncer

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

5 La presente invención se refiere a nuevas secuencias peptídicas inmunogénicas que pueden utilizarse como vacunas en el tratamiento de enfermedades oncológicas tales como los cánceres cerebrales y específicamente el glioma, en base a la variante mutada K27M de la Histona 3 humana. Se proporcionan otras proteínas de fusión que comprenden la secuencia del péptido, y ácidos nucleicos que codifican dicho péptido. Además, la invención se refiere a los receptores de células T que unen el péptido de la invención, preferentemente cuando lo presenta el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) humano. Los inmunógenos peptídicos de la invención provocan una respuesta inmunitaria restringida al HLA y, por lo tanto, son de utilidad en el tratamiento de enfermedades oncológicas, en particular el glioma. Otros aspectos de la invención se refieren a procedimientos de diagnóstico basados en la capacidad inmunogénica de los péptidos divulgados.

**DESCRIPCIÓN**

15 Los tumores cerebrales primarios constituyen un grupo diverso de neoplasias, derivadas de distintos linajes celulares. De acuerdo con una categorización de la Organización Mundial de la Salud, los tumores del sistema nervioso central se clasifican como astrocíticos, oligodendrogiales o mixtos (oligoastrocíticos). Estos tumores se clasifican a su vez por subtipos y se clasifican, en base a su histología, del I al IV, siendo el grado IV el más agresivo. Cada año se diagnostican 18.500 nuevos tumores cerebrales en Estados Unidos. De estos tumores, el 50% son gliomas; el 50% de estos gliomas son glioblastomas multiformes (GBM), con un pésimo pronóstico de supervivencia de 10-12 meses.

20 Los gliomas son heterogéneos en su contenido celular y pueden dividirse en grupos de astrocitomas, astrocitomas anaplásicos y glioblastomas multiformes. Los enfoques tradicionales de intervención terapéutica se han basado en la cirugía, la quimioterapia o la radioterapia. Los recientes avances en genética molecular han revelado numerosas mutaciones genéticas y vías de señalización asociadas que pueden desempeñar un papel causal en la generación de gliomas. Aunque estos avances han proporcionado numerosas vías candidatas que pueden utilizarse en el desarrollo de una terapia racional en base a la biología de la enfermedad, aún está por ver si tales enfoques llegarán a buen puerto. Por ello, existe una necesidad continua de terapias gliomales. Los glioblastomas (GBM) pediátricos son tumores muy agresivos y letales. Estudios recientes de secuenciación han demostrado que el ~30 % de los GBM pediátricos y el ~80 % de los gliomas pontinos intrínsecos difusos presentan mutaciones K27M en el gen H3F3A, una variante que codifica la histona H3.3. Las mutaciones H3F3A K27M conducen a una reducción global de H3K27me3 y la mutación se utiliza como marcador pronóstico que indica un mal pronóstico (Venneti S, *et al.* Acta Neuropathol, 2014 Nov. PMID 25200322).

35 La inmunidad antitumoral mediada por células T desempeña un papel en la regulación del crecimiento tumoral, ejerciendo una presión selectiva sobre la población de células cancerosas antigénicamente heterogénea a lo largo de la progresión de la enfermedad. La mayoría de los antígenos asociados a tumores (TAA) reconocidos por las células T son antígenos "propios" que pueden estar cuantitativamente sobreexpresados por las células tumorales o mutados selectivamente en células tumorales (TAA mutados) de uno o más tipos histológicos. Los ensayos clínicos con vacunas e inmunoterapias dirigidas a estos antígenos han conseguido aumentar el número de poblaciones específicas de células T CD4+ y/o CD8+ en la sangre periférica de los pacientes. Es necesario identificar antígenos asociados a tumores adicionales o combinaciones de antígenos que puedan utilizarse para la inmunoterapia del cáncer.

40 El documento US20140107039 desvela péptidos mutantes de histona H3 humana utilizados como inhibidores peptídicos del Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2) para tratar el cáncer.

45 Por lo tanto, existe una necesidad continua de proporcionar nuevos antígenos asociados a tumores, tales como péptidos o ácidos nucleicos, que puedan utilizarse como vacunas anticancerígenas para el tratamiento de enfermedades proliferativas. En particular, la presente invención pretende proporcionar nuevas terapias y diagnósticos complementarios para pacientes que padecen glioma asociado a la histona H3.3 K27M.

El problema anterior se resuelve en un primer aspecto por medio de un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. La secuencia de las primeras (TV-terminal) 1 a 66 posiciones de aminoácidos de la histona H3.3 de tipo salvaje (SEQ ID NO 1) y la variante K27M (SEQ ID NO 2) se proporcionan a continuación. Las secuencias de longitud completa de ambas versiones de Histona H3.3 son conocidas por los expertos en la técnica.

50 Una variante K27M de la Histona H3.3 humana en el contexto de la presente invención se referirá a una proteína Histona H3.3 humana que tiene una sustitución de aminoácidos de lisina a metionina en la posición 27 (K27M).

55 El péptido de la invención es un péptido inmunogénico. En el contexto de la presente invención, el término "péptido inmunogénico" se refiere a un péptido capaz de inducir una respuesta específica de linfocitos T citotóxicos (CTL) contra la variante K27M de la Histona H3.3 humana. El péptido de la invención puede tener la capacidad de unirse al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), preferentemente MHC Clase I. Por lo tanto, un péptido preferente de la invención es capaz de provocar una respuesta inmunitaria mediada por células T, preferentemente una respuesta

inmunitaria mediada por células T CD8 positivas.

El término "respuesta inmunitaria mediada por células T" se refiere a una respuesta inmunitaria en la que las células T median directa o indirectamente o contribuyen de otro modo a una respuesta inmunitaria en un mamífero. La respuesta inmunitaria mediada por células T puede estar asociada a efectos mediados por células, efectos mediados por citoquinas, etc., e incluso efectos asociados a las células B si éstas son estimuladas, por ejemplo, por las citoquinas secretadas por las células T.

En realizaciones preferentes de la invención, el péptido inmunogénico de la invención provoca una respuesta inmunitaria que es específica para la variante K27M de la Histona H3.3 humana. En este contexto, "específico" excluirá preferentemente los péptidos que provoquen una respuesta inmunitaria más fuerte o cualquier respuesta inmunitaria contra la versión de tipo salvaje de la Histona H3.3 humana.

El péptido de la invención puede ser preferentemente un péptido sintético, un péptido modificado químicamente, un péptido retroinverso o un péptido que comprenda al menos un enlace no peptídico. Tales variantes peptídicas son conocidas en la técnica.

Es importante señalar que la secuencia peptídica de la invención comprende la mutación K27M y, por lo tanto, no constituye un producto de la naturaleza, sino una versión mutada del epítipo natural de la Histona H3.3 humana. Sin embargo, en otra realización preferente el péptido de la invención es sintético y en forma de sal o sal farmacéuticamente aceptable.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el péptido inmunogénico de la invención tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, al igual que otros epítopos inmunogénicos, el péptido de la invención es presentado por una célula presentadora de antígenos, tal como una célula dendrítica o una célula tumoral, a través del CMH y luego, cuando se une al CMH, el péptido es capaz de unirse a un receptor de células T (TCR), para de este modo ser reconocido por el TCR. El TCR se expresa en la superficie de las células T y, al reconocer un péptido unido al CMH, inicia la señalización inmunitaria que finalmente da lugar a una respuesta inmunitaria completa. Preferentemente, el péptido provoca una respuesta inmunitaria restringida a HLA clase I en un mamífero. Por ejemplo, se prefiere que el péptido sea capaz de unirse al complejo HLA de clase I, preferentemente cuando el péptido es específico para el haplotipo A\*2 de HLA de clase I.

Los "derivados" de proteínas o péptidos incluyen aquellos análogos modificados resultantes de la glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, palmitoilación, miristoilación, isoprenilación, lipidación, alquilación, derivatización, introducción de grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica o unión a un anticuerpo o a otro ligando celular. El término "derivado" también se extiende a todos los equivalentes químicos funcionales de dichas proteínas y péptidos. Preferentemente, un péptido modificado tiene mayor estabilidad y/o mayor inmunogenicidad.

También se incluyen los miméticos de péptidos. Dichos miméticos pueden comprender aminoácidos unidos a uno o más aminoácidos miméticos (es decir, uno o más aminoácidos dentro del péptido pueden ser sustituidos por un aminoácido mimético) o pueden ser totalmente no péptidos miméticos. Un aminoácido mimético es un compuesto que es conformacionalmente similar a un aminoácido, por ejemplo, de forma que puede ser sustituido por un aminoácido sin disminuir sustancialmente la capacidad de reaccionar con las líneas o clones de células T.

Otro aspecto de la invención se refiere entonces a una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos compuesta por

- i. las secuencias de aminoácidos del péptido de acuerdo con la invención, y la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a la proteína de choque térmico (HSP), o bien
- ii. la secuencia de aminoácidos del péptido de acuerdo con la invención, y la secuencia de aminoácidos de una HSP.

Otro aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido de la invención, o que codifica para una fusión de la invención, en la que el ácido nucleico no codifica la variante K27M de longitud completa de la Histona H3.3 humana. Un ácido nucleico de acuerdo con la invención es preferentemente un ADN, ARN, PNA o LNA, y puede ser monocatenario o bicatenario.

Las realizaciones preferentes de la invención se refieren a ARN monocatenario o bicatenario, preferentemente un ARNm, que puede utilizarse como vacuna de ARN.

Por vacuna se entiende típicamente un material profiláctico o terapéutico que proporciona al menos un antígeno, preferentemente un inmunógeno tal como el inmunógeno peptídico o el inmunógeno ARN descritos en el presente documento. Por ejemplo, la vacuna puede comprender un ácido nucleico, tal como un ARN (por ejemplo, vacuna de ARN), que codifica para el péptido como se describe en el presente documento. El antígeno o inmunógeno estimula el sistema inmunitario adaptativo del organismo para que dé una respuesta inmunitaria adaptativa. Además, en el contexto del presente aspecto de los ácidos nucleicos, la vacuna es preferentemente una vacuna de ARN. Una vacuna de ARN se define en el presente documento como una vacuna que comprende al menos una molécula de ARN que

comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 13. En el contexto de la presente invención, la al menos una molécula de ARN que comprende la vacuna es preferentemente una molécula de ARN aislada. Este al menos un ARN es preferentemente ARN viral, ARN autorreplicante (replicón) o más preferentemente ARNm. También se incluyen aquí los híbridos de ARN/ADN, lo que significa que al menos una molécula de ARN de la vacuna de ARN está formada parcialmente por ribonucleótidos y parcialmente por desoxirribonucleótidos. En este contexto, el al menos un ARN de la vacuna de ARN consiste en al menos un 50% de ribonucleótidos, más preferentemente en al menos un 60%, 70%, 80%, 90% y más preferentemente en un 100%. En este contexto, el al menos un ARN de la vacuna de ARN también puede proporcionarse como ARN complejado o ARNm, como partícula de virus y como partícula de replicón, tal como se define en el presente documento.

Se divulga un procedimiento *in vitro* para producir un inmunógeno peptídico de la invención; el procedimiento comprende la expresión recombinante del péptido en una célula huésped, y el aislamiento del péptido a partir de la célula huésped o su medio de cultivo. En este aspecto, la célula huésped puede comprender preferentemente un ácido nucleico o un vector de expresión como los descritos anteriormente. Sin embargo, el péptido de la invención también puede obtenerse por cualquier otro procedimiento conocido por el experto, por ejemplo, expresando recombinantemente la variante K27M de longitud completa y su posterior fragmentación.

Algunos procedimientos terapéuticos se basan en una reacción del sistema inmunitario de un paciente, que da lugar a una lisis de las células enfermas que presentan un antígeno con MHC de clase I. A este respecto, por ejemplo, pueden administrarse linfocitos T citotóxicos autólogos específicos para un complejo de un péptido inmunogénico y una molécula MHC a un paciente que padezca una enfermedad, como un cáncer cerebral. Se conoce la producción de estos linfocitos T citotóxicos *in vitro*. Generalmente, se toma del paciente una muestra que contiene células, tales como células sanguíneas, y se pone en contacto a las células con una célula que presenta el complejo y que puede provocar la propagación de linfocitos T citotóxicos (por ejemplo, células dendríticas). La célula diana puede ser una célula transfectada, tal como una célula COS. Estas células transfectadas presentan el complejo deseado en su superficie y, al entrar en contacto con linfocitos T citotóxicos, estimulan la propagación de estos últimos. A continuación, se administran al paciente los linfocitos T citotóxicos autólogos expandidos clonalmente.

Además, las células que presentan el complejo deseado (por ejemplo, células dendríticas) pueden combinarse con linfocitos T citotóxicos de individuos sanos o de otra especie (por ejemplo, ratón), lo que puede dar lugar a la propagación de linfocitos T citotóxicos específicos con alta afinidad. El receptor de células T de alta afinidad de estos linfocitos T específicos propagados puede clonarse y opcionalmente humanizarse en distinta medida, y los receptores de células T obtenidos de este modo transducirse después por medio de transferencia génica, por ejemplo mediante el uso de vectores retrovirales, a células T de pacientes. La transferencia adoptiva puede llevarse a cabo mediante el uso de estos linfocitos T genéticamente alterados (Stanislowski *et al.*(2001), Nat. Immunol. 2:962-70; Kessels *et al.* (2001), Nat. Immunol. 2:957-61).

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para producir un linfocito T activado, que comprende la etapa de poner en contacto una célula T *in vitro* con una molécula MHC de clase I o II que se une a, y presenta, un péptido inmunogénico de la invención, en el que la molécula MHC de clase I o II que se une a, y presenta, el péptido, se expresa en una célula presentadora de antígeno adecuada, o está en forma de una construcción presentadora de antígeno adecuada. El contacto se realiza preferentemente durante el tiempo suficiente para que la célula T se active.

La célula T puede ser una célula T CD8 positiva y la molécula MHC es, en consecuencia, una molécula MHC de clase I, o bien, la célula T es una célula T CD4 positiva y la molécula MHC es una molécula MHC de clase II. Lo más preferente es que la célula T sea una célula T humana.

Tras activar el linfocito T, el procedimiento puede comprender la etapa adicional de propagar *in vitro* el linfocito T activado. Propagación significa en este contexto una expansión *in vitro* de las células T activadas a fin de obtener cantidades suficientes para fines terapéuticos.

El término "célula" o "célula huésped" se refiere preferentemente a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no ha liberado sus componentes intracelulares normales, tales como enzimas, orgánulos o material genético. Una célula intacta es preferentemente una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferentemente dicho término se refiere de acuerdo con la invención a cualquier célula que pueda ser transformada o transfectada con un ácido nucleico exógeno. El término "célula" incluye de acuerdo con la invención células procariontes (por ejemplo, *E. coli*) o células eucariotas (por ejemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células HEK293, células HELA, células de levadura y células de insecto). El ácido nucleico exógeno puede encontrarse dentro de la célula (i) libremente disperso como tal, (ii) incorporado en un vector recombinante, o (iii) integrado en el genoma de la célula huésped o en el ADN mitocondrial. Se prefieren especialmente las células de mamíferos, tales como las de humanos, ratones, hámsters, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de un gran número de tipos de tejidos e incluir células primarias y líneas celulares. Algunos ejemplos específicos son los queratinocitos, los leucocitos de sangre periférica, las células madre de médula ósea y las células madre embrionarias. En otras realizaciones, la célula es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica, un monocito o un macrófago.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento *in vitro* para producir un receptor de células T (TCR), que comprende aislar un receptor de células T de un linfocito T activado tal como se produce.

5 Alternativamente, un procedimiento no terapéutico para producir un TCR de la invención comprende las etapas de, inmunizar a un animal no humano, preferentemente un ratón o una rata, con un péptido de la invención, una proteína de fusión de la invención, o un ácido nucleico de la invención, para de este modo inducir una respuesta inmune adaptativa en dicho animal no humano, aislar de las células T del animal no humano inmunizado que son reactivas al péptido de la invención, y aislar de dichas células T el receptor de células T.

Además, se proporciona un receptor de células T aislado que se obtiene por medio de un procedimiento conforme a la presente divulgación.

10 También se proporciona un receptor de células T aislado, en el que el TCR se caracteriza porque comprende un dominio variable con una afinidad de unión específica a un péptido de la invención. Preferentemente, la afinidad de unión está mediada por el dominio variable, y en él por las Regiones Determinantes Complementarias (CDR). El TCR puede unirse al péptido preferentemente cuando está unido/presentado por el MHC.

15 Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden comprender un portador farmacéuticamente compatible. El término "soporte" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de naturaleza natural o sintética, en el que se combina el componente activo para facilitar la aplicación. De acuerdo con la invención, el término "portador farmacéuticamente compatible" incluye uno o más rellenos sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles, que son adecuados para la administración a un paciente. Los componentes de la composición farmacéutica divulgada suelen ser tales que no se produce ninguna interacción que afecte sustancialmente a la  
20 eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden contener sustancias tampón adecuadas, tales como ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener también, en su caso, conservantes adecuados tales como cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

25 Las composiciones farmacéuticas se suministran normalmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse de una manera conocida *per se*. Las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden presentarse en forma de cápsulas, comprimidos, pastillas, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires o en forma de emulsión, por ejemplo.

30 Las composiciones adecuadas para la administración parenteral suelen comprender una preparación acuosa o no acuosa estéril del compuesto activo, que es preferentemente isotónica para la sangre del receptor. Ejemplos de soportes y disolventes compatibles son la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, se suelen utilizar aceites fijos estériles como medio de solución o suspensión.

35 Los agentes descritos en la presente memoria se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que consigue una reacción deseada o un efecto deseado sola o junto con otras dosis. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se refiere preferentemente a la inhibición del curso de la enfermedad. Se trata de ralentizar el avance de la enfermedad y, en particular, de interrumpir o invertir su progresión. La reacción deseada en el tratamiento de una enfermedad o afección también puede ser el retraso o la prevención de la aparición de dicha enfermedad o afección.

40 La cantidad eficaz de un agente descrito en el presente documento dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, incluidos la edad, el estado fisiológico, el tamaño y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de terapia de acompañamiento (si existe), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de los agentes descritos en la presente memoria pueden depender de varios de dichos parámetros. En caso de que la reacción de un paciente sea insuficiente con una dosis inicial, pueden utilizarse dosis más altas (o dosis efectivamente más altas conseguidas por una vía de administración  
45 diferente y más localizada).

A continuación, otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer en un individuo, el procedimiento comprende

- i. Proporcionar una muestra biológica del individuo y sospechosa de contener anticuerpos,
- 50 ii. Detectar *in vitro* la presencia o ausencia de un anticuerpo específico para la variante K27M y no para la variante de tipo salvaje de la Histona H3.3 humana en la muestra biológica, en la que el anticuerpo se detecta mediante el uso de una biblioteca peptídica compuesta por al menos el péptido de acuerdo con la presente invención,

en la que la presencia de un anticuerpo específico para la variante K27M de la Histona H3.3 en la muestra biológica es indicativa de la presencia de un cáncer que expresa la variante K27M de la Histona H3.3 humana en el individuo.

El procedimiento se basa en la idea de que si un cáncer que expresa K27M está presente en un individuo a diagnosticar, este individuo producirá anticuerpos dirigidos contra este antígeno canceroso mutado. Por otra parte, un individuo sano no tendrá anticuerpos específicos para la variante Histona H3.3 K27M. De este modo, por medio del análisis de la ausencia o presencia de un anticuerpo específico para la mutación K27M en un individuo se puede diagnosticar la enfermedad cancerosa. La presencia de un anticuerpo que se une específicamente al menos a un péptido K27M en la biblioteca de péptidos indica, por tanto, la presencia de un anticuerpo que es específico para la variante K27M de la Histona H3.3 en la muestra biológica y, por tanto, indica la presencia de cáncer.

La unión a anticuerpos se comprueba preferentemente de forma inmunológica. Por ejemplo, después de poner en contacto la biblioteca peptídica con la muestra biológica, pueden eliminarse los anticuerpos no unidos o unidos de forma inespecífica, por ejemplo, por medio de una o más etapas de lavado. A partir de entonces, sólo quedan los anticuerpos que tienen una unión K27M específica y, por tanto, están unidos al péptido K27M dentro de la biblioteca de péptidos. El uso de un anticuerpo secundario antihumano acoplado a una etiqueta permite generar una señal detectable en función de la ausencia o presencia de cualquier anticuerpo unido.

El término "péptido K27M" en el contexto de la presente invención se referirá a un péptido inmunogénico como el descrito anteriormente.

En otra realización, la biblioteca peptídica se compone de una pluralidad de péptidos K27M no idénticos, siendo la pluralidad de péptidos K27M no idénticos al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, 100 o más péptidos K27M. Una pluralidad de péptidos K27M no idénticos será una colección de péptidos, cada uno de los cuales tendrá una secuencia diferente, pero que seguirá presentando la mutación K27M. Por lo tanto, la biblioteca de péptidos constituye una colección de posibles epítopos de la histona K27M. Preferentemente en algunas realizaciones la biblioteca comprende además como control al menos un péptido, preferentemente más, que en su secuencia no comprende la mutación K27M.

En este contexto, el individuo es preferentemente un ser humano, preferentemente un paciente humano no adulto.

En el contexto de la presente invención, el término "muestra biológica" se refiere a una muestra de sangre, preferentemente una muestra de suero. No obstante, cualquier muestra que pudiera contener anticuerpos contra la variante K27M de la Histona H3.3 humana podría utilizarse como muestra biológica.

El cáncer a diagnosticar es preferentemente un cáncer cerebral tal como un glioma, preferentemente un astrocitoma, más preferentemente un astrocitoma pediátrico.

El procedimiento de la invención descrito en la presente memoria puede comprender además la etapa de cuantificar la cantidad de anticuerpo en la muestra biológica que se une al menos a un péptido K27M.

El procedimiento de diagnóstico descrito en la presente memoria se basa preferentemente en un ensayo ELISA, tal como un ELISA de emparejado. Alternativamente, los péptidos K27M de la biblioteca peptídica pueden acoplarse directamente sobre un soporte sólido. Por ejemplo, los péptidos K27M pueden fijarse a un portaobjetos de vidrio. Para la biblioteca peptídica de la invención puede emplearse cualquier otra tecnología de matriz peptídica del estado de la técnica.

Preferentemente, los péptidos K27M de la biblioteca peptídica de la invención se proporcionan unidos a un soporte sólido, tal como un portaobjetos de vidrio o un chip peptídico.

La presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para monitorizar una enfermedad cancerosa en un individuo, el procedimiento comprende realizar el procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente, en el que un aumento del anticuerpo detectado a lo largo del tiempo indica un empeoramiento de la enfermedad cancerosa en el individuo, mientras que una disminución de la cantidad de anticuerpo detectado a lo largo del tiempo indica un alivio de la enfermedad.

La presente invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias que se acompañan, no obstante, sin limitarse a las mismas. En las figuras y secuencias:

**Figura 1: (A)** La vacunación con el péptido H3.3 K27M induce respuestas inmunitarias IFN $\gamma$  específicas de la mutación en ratones humanizados MHC: ELISpots de respuestas de IFN $\gamma$  de esplenocitos a H3.3K27M<sub>14-40</sub> (negro) o K27wt<sub>14-40</sub> (gris) tras la vacunación de ratones A2.DR1 con H3.3K27M<sub>14-40</sub> o control vehicular en Montanide®. Se restaron los números de manchas a MOG<sub>35-55</sub> como control negativo. Se muestra la media +/- p.e.m. de n=4 ratones por grupo y ELISpots representativos. \*\*p<0,01. **(B/C):** Las bibliotecas de péptidos H3.3 se utilizan para evaluar los epítopos de unión al MHC *in silico*. Predicciones de unión peptídica MHC para péptidos de 10-mer que contienen H3.3 K27M (rojo) y K27wt (azul) a HLA-A\*02:01 mediante el uso del algoritmo NetMHC (B) y análisis de unión peptídica MHC para H3.3K27M<sub>26-35</sub> (rojo) o K27wt<sub>26-35</sub> (azul) dependiendo del haplotipo MHC-clase-I (C). Los péptidos con una afinidad logscore >0,4 se definen como ligandos potenciales. **(D)** La vacunación con el péptido H3.3K27M<sub>26-35</sub> induce una respuesta de células T CD8 específica de la mutación en ratones humanizados con MHC: Citometría de flujo intracelular representativa de las respuestas IFN $\gamma$  de esplenocitos a H3.3K27M<sub>26-35</sub> o K27wt<sub>26-35</sub> tras

5 la vacunación de tres ratones A2.DR1 con H3.3K27M<sub>26-35</sub> en Montanide®. La reestimulación con el vehículo DMSO sirvió de control; cerrado en células CD45+ CD3+ CD8+. (E) Las células T CD8 positivas específicas para H3.3K27M<sub>26-35</sub> se detectan con multímeros HLA-A2: Citometría de flujo representativa de la proporción de células T CD4/CD8 de los esplenocitos y de las respuestas de las células T CD8 a los dextrámeros específicos H3.3K27M<sub>26-35</sub> o al control tras la vacunación de tres ratones A2.DR1 con H3.3K27M<sub>26-35</sub> en Montanide®; cerrado en células CD45+ CD3+.

**Figura 2: (A)** Generación de células de sarcoma A2.DR1 que expresan H3.3 K27M: H3.3 K27M

10 en células de sarcoma A2.DR1 transducidas o en células de tipo salvaje por medio de tinción inmunofluorescente mediante el uso de un anticuerpo específico de la mutación. **(B+C)** La vacunación con el péptido H3.3 K27M reduce el crecimiento tumoral H3.3K27M<sup>+</sup> en ratones humanizados MHC-. Crecimiento de tumores singénicos subcutáneos con sobreexpresión de H3.3 K27M preestablecidos en ratones A2.DR1 tras la vacunación peptídica con H3.3 K27M14-4Q (rojo) o control con vehículo (azul) en Montanide® los días 5 y 14 (flechas) (D) y ELISpots de respuestas de esplenocitos IFN $\gamma$  a H3.3K27M<sub>i14\_40</sub> (negro), K27wt<sub>i14-40</sub> (gris) o MOG<sub>35-55</sub> (blanco) tras la vacunación terapéutica de ratones portadores de tumores (E). Se muestra la media +/- p.e.m. de n=6 ratones por grupo. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

**SEQ ID NO 1** (aminoácidos 1 a 66 de la Histona H3.3 humana de tipo salvaje)

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQK STELLIRKLP

20 **SEQ ID NO 2** (aminoácidos 1 a 66 de la variante K27M de la histona humana H3.3.)

ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARMSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALREIRRYQK STELLIRKLP

**SEQ ID NO 3** (péptido correspondiente a los aminoácidos 18-27 de K27M Histona H3.3) KQLATKAARM

**SEQ ID NO 4** (péptido correspondiente a los aminoácidos 19-28 de K27M Histona H3.3) QLATKAARMS

**SEQ ID NO 5** (péptido correspondiente a los aminoácidos 20-29 de K27M Histona H3.3) LATKAARMSA

25 **SEQ ID NO 6** (péptido correspondiente a los aminoácidos 21-30 de K27M Histona H3.3) ATKAARMSAP

**SEQ ID NO 7** (péptido correspondiente a los aminoácidos 22-31 de K27M Histona H3.3)

TKAARMSAPS

**SEQ ID NO 8** (péptido correspondiente a los aminoácidos 23-32 de K27M Histona H3.3)

KAARMSAPST

30 **SEQ ID NO 9** (péptido correspondiente a los aminoácidos 24-33 de K27M Histona H3.3)

AARMSAPSTG

**SEQ ID NO 10** (péptido correspondiente a los aminoácidos 25-34 de K27M Histona H3.3)

ARMSAPSTGG

**SEQ ID NO 11** (péptido correspondiente a los aminoácidos 26-35 de K27M Histona H3.3)

35 RMSAPSTGGV

**SEQ ID NO 12** (péptido correspondiente a los aminoácidos 27-36 de K27M Histona H3.3)

MSAPSTGGVK

**SEQ ID NO 13** (péptido correspondiente a los aminoácidos 14-40 de K27M Histona H3.3)

KAPRKQLATKAARMSAPSTGGVKKPHR

40 EJEMPLOS

En el caso de los tumores cerebrales malignos, los avances en el diagnóstico molecular, incluida la secuenciación del genoma completo, permitieron identificar alteraciones genéticas distintivas que definen subgrupos. Dado que estas mutaciones impulsoras pueden dar lugar a neoantígenos tumorales específicos, representan dianas inmunoterapéuticas prometedoras. Una mutación que se produce con frecuencia en gliomas pediátricos de tronco

cerebral y adultos es una mutación puntual en el gen de la histona-3 (H3F3A) que da lugar a un intercambio de aminoácidos de lisina a arginina en la posición 27 (K27M).

5 La vacunación de ratones transgénicos MHC-humanizados HLA-A\*0201 HLA-DRA\*0101 HLA-DRB\*0101 (ratones A2.DR1) con un péptido 27-mer que contiene la mutación H3.3 K27M en la posición 14 (K27M<sub>14-40</sub>) dio lugar a una respuesta de células T IFN $\gamma$  robusta y específica de la mutación (Figura 1 A). Suponiendo una respuesta de células T CD8 positivas impulsada por el CMH de clase I, se utilizaron algoritmos de predicción de unión al CMH para localizar el epítipo CMH de clase I pertinente: los análisis *in silico* con una biblioteca de péptidos que contenía las secuencias mutadas y de tipo salvaje sugirieron un 10-mer que albergaba la mutación puntual en la posición 2 (K27M<sub>26-35</sub>) como posible ligando. Es importante destacar que la secuencia de tipo salvaje correspondiente tenía una afinidad de unión  
10 insignificante (Figura 1 B).

Dado que la presentación del antígeno y la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz dependen críticamente del haplotipo del CMH, se analizaron las afinidades de unión de K27M<sub>26-35</sub> a los haplotipos de clase I más frecuentes. Se predijo una unión relevante y específica de mutación especialmente para HLA- A\*02 (Figura 1 C). De hecho, la vacunación de ratones HLA-A2\* con el polímero I0mer predicho K27M<sub>26-35</sub> indujo respuestas de células T citotóxicas específicas de la mutación impulsadas por IFN $\gamma$ \*CD8<sup>+</sup>mostradas por citometría de flujo intracelular (Figura 1 D). Además, las células T CD8<sup>+</sup> específicas de K27M<sub>26-35</sub> pudieron detectarse directamente mediante el uso de un dextrámero HLA-A2\* (Figura 1 E). De este modo, se investigó más a fondo la eficacia antitumoral de la vacunación con el péptido H3.3 K27M en un modelo tumoral singénico HLA-A\*02.  
15

En el presente documento, la vacunación de ratones A2.DR1 portadores de tumores con una vacuna peptídica K27M<sub>14-40</sub> suprimió significativamente el crecimiento de tumores subcutáneos A2.DR1 sobreexpresantes de H3.3 K27M preestablecidos por medio de la inducción de respuestas inmunitarias IFN $\gamma$  específicas de la mutación (Figura 2).  
20

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
2. Una proteína de fusión formada por una secuencia de aminoácidos compuesta por
  - i. la secuencia de aminoácidos del péptido de acuerdo con la reivindicación 1, y la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a la proteína de choque térmico (HSP), o bien
  - ii. la secuencia de aminoácidos del péptido de acuerdo con la reivindicación 1, y la secuencia de aminoácidos de una HSP.
3. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, o que codifica para la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico no codifica la variante K27M de longitud completa de la Histona H3.3 humana.
4. Un procedimiento *in vitro* para producir un linfocito T activado, que comprende la etapa de poner en contacto una célula T *in vitro* con una molécula MHC de clase I o II que se une al péptido inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 1 y lo presenta, en el que la molécula MHC de clase I o II que se une al péptido inmunogénico y lo presenta se expresa en una célula presentadora de antígeno adecuada o está en forma de una construcción presentadora de antígeno adecuada.
5. Un procedimiento *in vitro* para producir un receptor de células T, comprendiendo el procedimiento aislar un receptor de células T de un linfocito T activado producido con el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Un procedimiento no terapéutico para producir un receptor de células T, el procedimiento comprende, inmunizar un animal no humano, preferentemente un ratón o una rata, con el péptido de acuerdo con la reivindicación 1, la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 2, o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, aislar de las células T del animal no humano inmunizado que son reactivas al péptido de acuerdo con la reivindicación 1, y aislar de dichas células T el receptor de células T.
7. Un receptor de células T aislado obtenido por el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6.
8. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar cáncer en un individuo, el procedimiento comprende
  - i. Proporcionar una muestra biológica del individuo y sospechosa de contener anticuerpos,
  - ii. Detectar *in vitro* la presencia o ausencia de un anticuerpo específico para K27M variante y no la variante de tipo salvaje de la Histona H3.3 humana en la muestra biológica, en la que el anticuerpo se detecta mediante el uso de una biblioteca de péptidos compuesta por al menos el péptido de acuerdo con la reivindicación 1,

en la que la presencia de un anticuerpo específico para la variante K27M de la Histona H3.3 en la muestra biológica es indicativa de la presencia de un cáncer que expresa la variante K27M de la Histona H3.3 humana en el individuo.
9. El procedimiento *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el cáncer es un glioma, preferentemente un astrocitoma, más preferentemente un astrocitoma pediátrico.
10. Un procedimiento *in vitro* para monitorizar una enfermedad cancerosa en un individuo, el procedimiento comprende realizar el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que un aumento del anticuerpo detectado a lo largo del tiempo indica un empeoramiento de la enfermedad cancerosa en el individuo, mientras que una disminución de la cantidad de anticuerpo detectado a lo largo del tiempo indica un alivio de la enfermedad.

Figura 1:

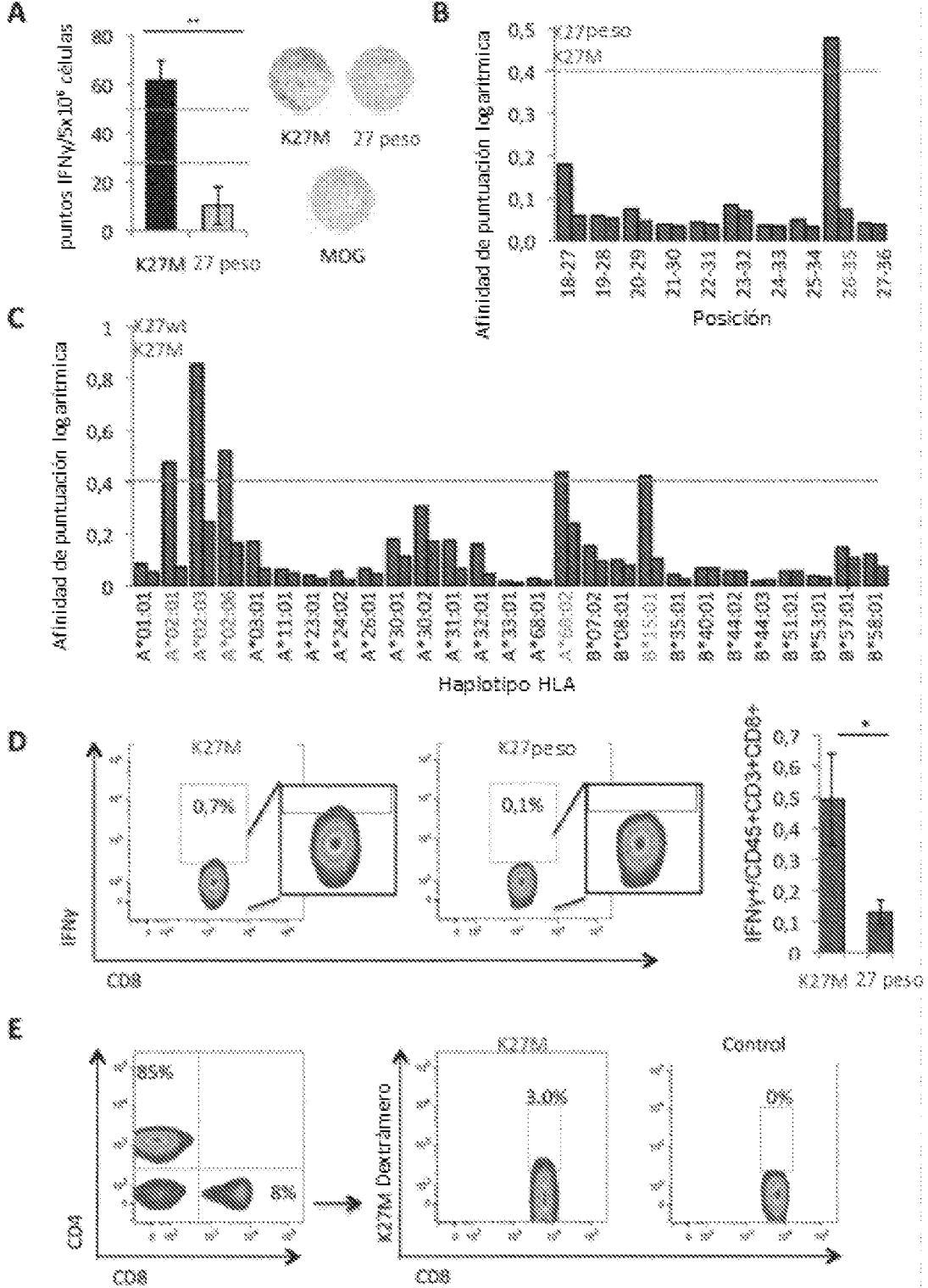
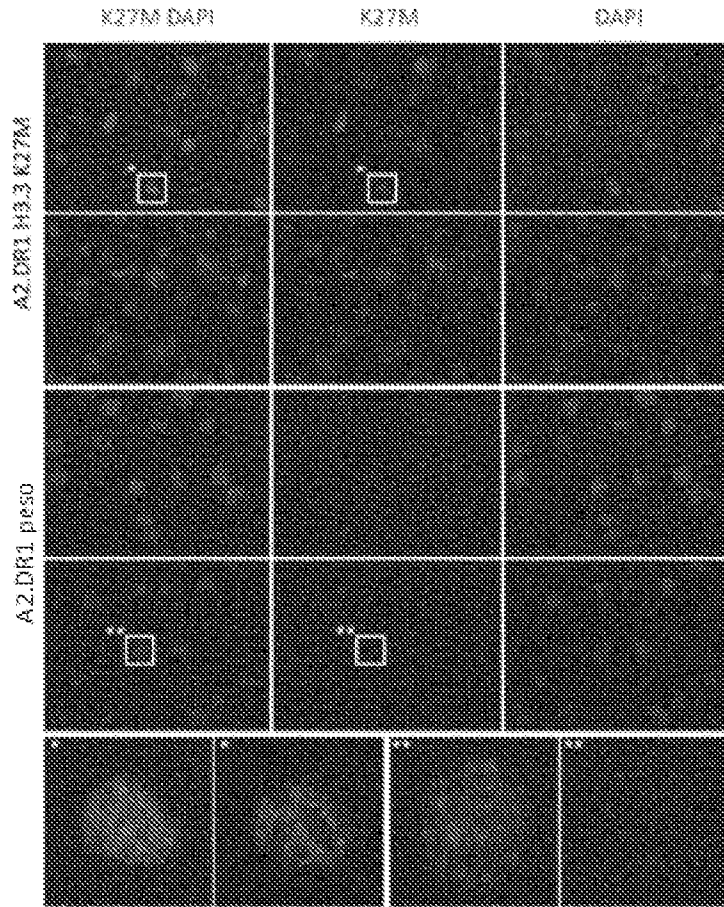
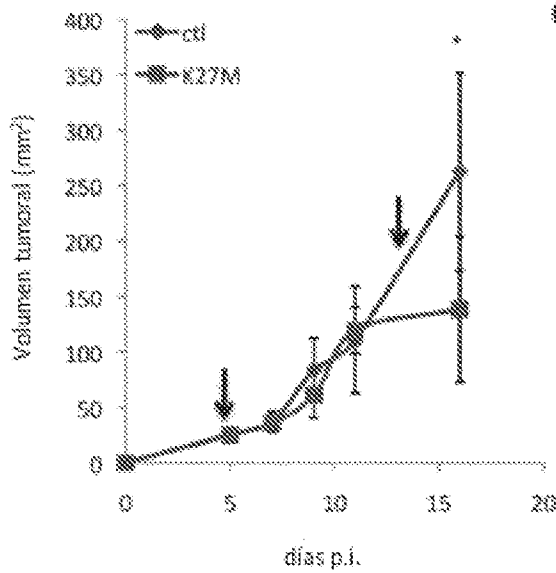


Figura 2:

**A**



**B**



**C**

