

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3455625

DAL TITOLO:

“Metodi per prevedere l'utilità di neo-antigeni per immunoterapia”

Depositata il:

**** *
**** *
**** *

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per prevedere se un neo-antigene o suo neo-epitopo associati al tumore, comprendente una o più modifiche di aminoacidi specifiche per il tumore, siano utili per una terapia anti-tumore.

STATO DELLA TECNICA

L'evoluzione del sistema immunitario ha portato i vertebrati in una rete altamente efficace basata su due tipi di difesa: l'immunità innata e quella adattativa. In contrasto con l'antico sistema immunitario innato evolutivo che si basa su recettori invariati che riconoscono modelli molecolari comuni associati a patogeni, l'immunità adattativa si basa su recettori antigenici altamente specifici su cellule B (linfociti B) e cellule T (linfociti T) e selezione clonale. Mentre le cellule B aumentano le risposte immunitarie umorali tramite la secrezione di anticorpi, le cellule T mediano le risposte immunitarie cellulari portando alla distruzione delle cellule riconosciute.

Le cellule T svolgono un ruolo centrale nell'immunità cellulo-mediata negli esseri umani e negli animali. Il riconoscimento e il legame di un particolare antigene è mediato dai recettori dei linfociti T espressi sulla superficie dei linfociti T. Il recettore delle cellule T (TCR) di una cellula T è in grado di interagire con i peptidi immunogenici (epitopi) legati alle principali molecole del complesso di istocompatibilità (MHC) e presentati sulla superficie delle cellule bersaglio. Il legame specifico del TCR innesca una cascata di segnali all'interno della cellula T che porta alla proliferazione e differenziazione in una cellula T effettrice matura. Per essere in grado di indirizzare una vasta gamma di antigeni, i recettori delle cellule T devono avere una grande diversità.

L'immunoterapia antigene-specifica mira a migliorare o indurre risposte immunitarie specifiche nei pazienti per controllare malattie infettive o maligne. L'identificazione di un numero crescente di antigeni associati a patogeni e tumori ha portato a un'ampia raccolta di bersagli idonei per l'immunoterapia. Le cellule che presentano peptidi immunogenici (epitopi) derivati da questi antigeni possono essere specificamente mirati mediante strategie di immunizzazione attiva o passiva. L'immunizzazione attiva tende a indurre ed espandere le cellule T antigene-specifiche nel

paziente, che sono in grado di riconoscere e uccidere specificamente le cellule malate. Al contrario, l'immunizzazione passiva si basa sul trasferimento adottivo delle cellule T, che sono state espanse e geneticamente modificate in vitro (terapia adottiva delle cellule T; ACT).

I vaccini antitumorali mirano a indurre risposte immunitarie specifiche del tumore endogeno mediante l'immunizzazione attiva. Diversi formati di antigeni possono essere utilizzati per la vaccinazione contro il tumore, comprese intere cellule malate, proteine, peptidi o vettori immunizzanti come RNA, DNA o vettori virali che possono essere applicati direttamente in vivo o in vitro pulsando di DC dopo il trasferimento nel paziente.

L'immunoterapia basata su ACT può essere ampiamente definita come una forma di immunizzazione passiva con cellule T precedentemente sensibilizzate che vengono trasferite a riceventi non immuni o all'ospite autologo dopo l'espansione ex vivo da basse frequenze precursori a numeri cellulari clinicamente rilevanti. Un approccio che supera i limiti dell'ACT è il trasferimento adottivo di cellule T autologhe riprogrammate per esprimere un TCR reattivo al tumore di specificità definita durante una coltura ex vivo di breve durata seguita da reinfusione nel paziente.

La scoperta di più antigeni associati a patogeni e tumori ha fornito la base per concetti di immunoterapia antigene-specifici. Gli antigeni associati al tumore (TAA) sono proteine insolite espresse sulle cellule tumorali a causa della loro instabilità genetica, che non hanno espressione o hanno un'espressione limitata nelle cellule normali. Questi TAA possono portare al riconoscimento specifico delle cellule maligne da parte del sistema immunitario.

I tumori possono derivare dall'accumulo di mutazioni genomiche e cambiamenti epigenetici, di cui una frazione può avere un ruolo causale. Oltre agli antigeni associati al tumore, i tumori umani portano in media 100-120 mutazioni non sinonimi, molte delle quali sono bersagliabili dai vaccini. Più del 95% delle mutazioni in un tumore sono uniche e specifiche per il paziente. Il numero di mutazioni somatiche che modificano le proteine, che possono provocare epitopi delle cellule T specifiche del tumore, è compreso tra 30 e 400. Le mutazioni sono considerate obiettivi ideali per l'immunoterapia contro il cancro. In quanto neoepitopi con una rigorosa mancanza di espressione in qualsiasi tessuto sano, ci si aspetta che siano sicuri e potrebbero aggirare i meccanismi di tolleranza centrale. Abbiamo recentemente proposto un approccio immunoterapico personalizzato mirato allo spettro delle mutazioni individuali (Castle, J. C, et al, Cancer Res 72, 1081 (2012)).

Nonostante il numero crescente di strutture bersaglio attraenti per approcci immunoterapeutici, la definizione di epitopi adatti per l'immunoterapia rimane una sfida. Pertanto, è necessario un modello per prevedere se un epitopo, in particolare un neoepitopo, indurrà un'immunità efficiente e, quindi, sarà utile nell'immunoterapia. Qui mostriamo che gli antigeni immunogenici e gli epitopi sono fortemente rappresentati in alcuni

compartimenti subcellulari.

È noto che una risposta immunitaria contro antigeni tumorali, in particolare antigeni tumorali mutati, non è effettuata dalle cellule tumorali stesse ma piuttosto da cellule presentanti l'antigene, in particolare cellule dendritiche, che ricevono l'antigene tumorale rilasciato dalle cellule tumorali. È anche noto che per ottenere una risposta immunitaria efficace, l'antigene tumorale rilasciato che viene assorbito dalle cellule presentanti l'antigene deve essere elaborato e presentato dall'MHC classe II per l'induzione di una risposta immunitaria CD4 (presentazione esogena) o dall'MHC classe I per l'induzione di una risposta immunitaria CD8 (presentazione incrociata). Per quest'ultima risposta immunitaria è richiesta l'esistenza di una risposta immunitaria CD4 contro lo stesso o un diverso antigene tumorale fornito alla stessa cellula presentante l'antigene (Bennett et al., J. Exp. Med. 186, 65-70 (1997)).

Senza voler essere vincolati a una particolare teoria, si ritiene che la localizzazione cellulare di un antigene in cellule malate come le cellule tumorali determini se l'antigene sarà assorbito e presentato dalle cellule presentanti l'antigene. Gli esosomi rilasciati da cellule malate come le cellule tumorali contengono mRNA, proteine e complessi peptidici MHC e, quindi, possono trasferire questi componenti alle cellule che presentano l'antigene. Gli esosomi sono prodotti per invaginazione e quindi contengono oltre a molecole di membrana endocitica principalmente componenti citosoliche. Pertanto, si ritiene che i componenti citosolici come le proteine siano arricchiti negli esosomi e possano essere trasferiti alle cellule che presentano l'antigene. Gli esosomi possono anche trasferire in modo produttivo mRNA, che può essere tradotto nelle cellule che assorbono l'RNA. Pertanto, senza voler essere vincolati a una particolare teoria, si ritiene che peptidi o polipeptidi inclusi negli esosomi, in particolare peptidi o proteine citosoliche, o peptidi o polipeptidi il cui RNA codificante è incluso negli esosomi secondo l'invenzione siano particolarmente utile per l'immunoterapia perché gli esosomi sono assorbiti dalle cellule che presentano l'antigene e i peptidi e le proteine (opzionalmente in seguito alla traduzione dell'RNA codificante) sono presentati dalle cellule che presentano l'antigene. Gli esosomi sono quindi veicoli di trasporto per i peptidi, le proteine o l'RNA verso le cellule che presentano l'antigene e proteggono i peptidi, le proteine o l'RNA dalla degradazione da parte di proteasi e ribonucleasi. In alternativa, è possibile che i peptidi e le proteine siano assorbiti dalle cellule che presentano l'antigene come complessi con altre molecole come gli anticorpi attraverso un meccanismo dipendente dal recettore.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

L'INVENZIONE

L'invenzione è relativa ad un metodo per prevedere l'utilità di un neo-antigene o suo neoepitopo associato al cancro comprendente una o più modifiche di aminoacidi specifiche del cancro per l'immunoterapia anti-cancro, il metodo comprendendo le fasi di

accertare la distribuzione o la localizzazione del neo-antigene comprendente l'accertamento in un database computazionale se il neo-antigene è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno di esosomi *in vivo*,

in cui la localizzazione o l'abbondanza del neo-antigene o di un acido nucleico che lo codifica, o un neoepitopo del neo-antigene nel citosol e/o all'interno degli esosomi *in vivo* indica che il neo-antigene o il neoepitopo è utile per immunoterapia anti-cancro,

in cui l'elaborazione e la presentazione del neo-antigene nella via MHC I dà come risultato il riconoscimento di complessi formati da MHC I e neo-epitopi del neo-antigene da parte delle cellule T CD8 +.

In modo opzionale, l'una o più modifiche di aminoacidi sono dovute a mutazioni somatiche specifiche del cancro.

RIEPILOGO DI ALTRI ASPETTI DELL'INVENZIONE

In un aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per prevedere l'utilità di una proteina o di un suo frammento espresso da cellule malate per l'immunoterapia, il metodo comprendente l'accertamento della distribuzione o della localizzazione della proteina o di un acido nucleico che codifica per essa, o di un frammento della proteina.

In modo opzionale, il metodo comprende l'accertamento se la proteina o un acido nucleico che lo codifica, o un frammento della proteina è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno di esosomi *in vivo*.

In modo opzionale, la localizzazione o l'abbondanza della proteina o di un acido nucleico che la codifica, o di un frammento della proteina nel citosol e/o all'interno degli esosomi indica che la proteina o un suo frammento è utile per l'immunoterapia.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per prevedere l'utilità di una proteina o di un suo frammento espresso da cellule malate per l'immunoterapia, il metodo comprendendo l'accertamento se la proteina o un suo frammento è presentato incrociato da cellule presentanti l'antigene, preferibilmente cellule presentanti l'antigene professionale.

In modo opzionale, la presentazione incrociata della proteina o di un suo frammento da parte delle cellule presentanti l'antigene indica che la proteina o il suo frammento è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, accertare se la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene comprende l'accertamento se la proteina o un acido nucleico che lo codifica, o un frammento della proteina è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno degli esosomi *in vivo*.

In modo opzionale, la localizzazione o l'abbondanza della proteina o di un acido nucleico che la codifica, o di un frammento della proteina nel citosol e/o all'interno degli esosomi indica che la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene.

In modo opzionale, accertare se la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene comprende l'accertamento di una risposta anticorpale esistente alla proteina o un suo frammento.

In modo opzionale, una risposta anticorpale esistente alla proteina o un suo frammento indica che la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene.

In modo opzionale, accertare se la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene comprende l'accertamento se la proteina o un suo frammento si lega all'actina F.

In modo opzionale, il legame della proteina o di un suo frammento all'actina F indica che la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene.

In modo opzionale, accertare se la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene comprende l'accertamento se la proteina o un suo frammento si lega all'RNA.

In modo opzionale, il legame della proteina o di un suo frammento all'RNA indica che la proteina o un suo frammento è presentato in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene.

In modo opzionale di tutti gli aspetti dell'invenzione, il frammento proteico è presente all'interno degli esosomi come complesso peptidico MHC, preferibilmente sulla superficie degli esosomi.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti qui descritti, la localizzazione o l'abbondanza della proteina o di un acido nucleico che la codifica, o di un frammento della proteina nel citosol indica l'elaborazione e la presentazione della proteina nella via MHC I, preferibilmente delle cellule malate. In modo opzionale, l'elaborazione e la presentazione della proteina nella via MHC I risulta nel riconoscimento di complessi formati da MHC I e frammenti della proteina da parte delle cellule T CD8 +.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti dell'invenzione, la localizzazione o l'abbondanza della proteina o di un acido nucleico che lo codifica, o di un frammento della proteina all'interno degli esosomi indica l'accumulo della proteina o di un acido nucleico che lo codifica, o di un frammento della proteina in cellule presentanti l'antigene, preferibilmente cellule presentanti l'antigene professionale. In modo opzionale, l'accumulo della proteina o di un acido nucleico che lo codifica, o di un frammento della proteina nelle cellule che presentano l'antigene indica l'elaborazione e la presentazione della proteina nella via MHC I e/o MHC II, preferibilmente delle cellule che presentano l'antigene. In modo opzionale, l'elaborazione e la presentazione della proteina nella via MHC I risulta nel riconoscimento di complessi formati da MHC I e frammenti della proteina da parte delle cellule T CD8 +.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per prevedere l'utilità di una proteina o di un suo frammento espresso da cellule malate per l'immunoterapia, il metodo comprendendo l'accertamento di uno o più dei seguenti:

- (a) accertare una risposta anticorpale esistente alla proteina o a un suo frammento,
- (b) accertare se la proteina o un suo frammento si lega all'actina F, e/o
- (c) accertare se la proteina o un suo frammento si lega all'RNA.

In modo opzionale, una risposta anticorpale esistente alla proteina o un suo frammento indica che la proteina o un suo frammento è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, il legame della proteina o di un suo frammento all'actina F indica che la proteina o un suo frammento è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, il legame della proteina o di un suo frammento all'RNA indica che la proteina o un suo frammento è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti dell'invenzione, la proteina o un suo frammento comprende una modifica amminoacidica specifica per la malattia. In modo opzionale, la modifica dell'amminoacido è dovuta a una mutazione somatica specifica della malattia.

In modo opzionale di tutti gli aspetti dell'invenzione, la malattia è il cancro e l'immunoterapia è l'immunoterapia anti-cancro.

In modo opzionale di tutti gli aspetti dell'invenzione, il frammento proteico è un peptide legante MHC o un potenziale peptide legante MHC.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per selezionare e/o classificare modifiche amminoacidiche specifiche della malattia per la loro utilità nell'immunoterapia, il metodo comprendendo le fasi di:

(i) identificare le proteine espresse dalle cellule malate ciascuna proteina comprendente almeno una modifica amminoacidica specifica della malattia, e

(ii) accertare la distribuzione o la localizzazione di una proteina identificata in (i) o di un acido nucleico che la codifica, o di un frammento di la proteina e

(iii) ripetere il passaggio (ii) per almeno un'ulteriore proteina identificata in (i).

In modo opzionale, la fase (ii) comprende l'accertamento se la proteina o un acido nucleico che lo codifica, o un frammento della proteina è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno di esosomi in vivo.

In modo opzionale, la localizzazione o l'abbondanza della proteina o di un acido nucleico che la codifica, o di un frammento della proteina nel citosol e/o all'interno degli esosomi indica che la modifica amminoacidica specifica della malattia è utile per l'immunoterapia.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per selezionare e/o classificare modifiche amminoacidiche specifiche per la malattia per la loro utilità nell'immunoterapia, il metodo comprendendo le fasi di:

(i) identificare le proteine espresse dalle cellule malate ciascuna proteina comprendente almeno una modifica amminoacidica specifica della malattia, e

(ii) accertare se una proteina identificata in (i) o un frammento della proteina è presentata in modo incrociato da cellule presentanti l'antigene, preferibilmente cellule presentanti l'antigene professionale, e

(iii) ripetere il passaggio (ii) per almeno un'ulteriore proteina identificata in (i).

In modo opzionale, la presentazione incrociata della proteina o di un suo frammento da parte delle cellule presentanti l'antigene indica che la modifica amminoacidica specifica della malattia è utile per l'immunoterapia.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per selezionare e/o classificare modifiche amminoacidiche specifiche per la malattia per la loro utilità nell'immunoterapia, il metodo comprendendo le fasi di:

(i) identificare le proteine espresse dalle cellule malate ciascuna proteina comprendente almeno una modifica amminoacidica specifica della malattia, e

(ii) accertare per una proteina identificata in (i) o un frammento della proteina uno o più dei seguenti:

(a) accertare una risposta anticorpale esistente alla proteina o un suo frammento,

(b) accertare se la proteina o un suo frammento si lega all'actina F, e/o

(c) accertare se la proteina o un suo frammento si lega all'RNA, e

(iii) ripetere il passaggio (ii) per almeno un'ulteriore proteina identificata in (i).

In modo opzionale, una risposta anticorpale esistente alla proteina o un suo frammento indica che la modifica amminoacidica specifica per la malattia è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, il legame della proteina o di un suo frammento all'actina F indica che la modifica amminoacidica specifica della malattia è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, il legame della proteina o di un suo frammento all'RNA indica che la modifica amminoacidica specifica della malattia

è utile per l'immunoterapia.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti dell'invenzione, la modificazione amminoacidica specifica per la malattia è costituita da un frammento proteico che è un peptide legante MHC o un potenziale peptide legante MHC.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti dell'invenzione, il metodo viene utilizzato nella produzione di un vaccino. In modo opzionale, il vaccino è derivato da una o più proteine o loro frammenti o da una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia che si prevede siano utili per l'immunoterapia.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un metodo per fornire un vaccino comprendente la fase: identificare una o più proteine o loro frammenti o una o più modificazioni amminoacidiche specifiche per la malattia che si prevede siano utili per l'immunoterapia mediante il metodo di uno qualsiasi di gli aspetti qui descritti. In modo opzionale, il metodo comprende inoltre la fase: fornire un vaccino comprendente un peptide o polipeptide comprendente una o più proteine o suoi frammenti o una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia che si prevede siano utili per l'immunoterapia, o una codifica di acido nucleico il peptide o polipeptide.

In un ulteriore aspetto, l'invenzione si riferisce a un vaccino prodotto secondo il metodo di uno qualsiasi degli aspetti qui descritti.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti dell'invenzione, l'indicazione di un'utilità di una proteina o di un suo frammento espressa da cellule malate per l'immunoterapia indica che la proteina o un suo frammento dopo la somministrazione (opzionalmente nel formato dell'acido nucleico codificante) sarà immunogenico.

In modo opzionale, in tutti gli aspetti dell'invenzione, un frammento proteico qui descritto è un peptide legante MHC o un potenziale peptide legante MHC (ad es. La previsione del legame MHC indica che il frammento proteico si legherà a MHC). In modo opzionale, il peptide legante MHC è un peptide modificato che è un frammento di una proteina modificata.

In modo opzionale, le modificazioni amminoacidiche nelle proteine o nei peptidi vengono identificate identificando mutazioni non sinonime in una o più regioni codificanti proteine.

In modo opzionale, le modifiche degli amminoacidi sono identificate sequenziando parzialmente o completamente il genoma o il trascrittoma di una o più cellule come una o più cellule tumorali e, facoltativamente, una o più cellule non cancerose e identificando mutazioni in una o più regioni codificanti proteine. In modo opzionale, dette mutazioni sono mutazioni somatiche. In modo opzionale, dette mutazioni sono mutazioni cancerose.

In modo opzionale, in particolare al fine di fornire un vaccino personalizzato per un paziente come un malato di cancro, le modifiche sono

presenti in detto paziente e i metodi dell'invenzione vengono eseguiti per detto paziente. In un ulteriore aspetto, la presente invenzione fornisce un vaccino che è ottenibile utilizzando i metodi secondo l'invenzione. Le forme di realizzazione preferite di tali vaccini sono qui descritte.

Un vaccino previsto secondo l'invenzione può comprendere un veicolo farmaceuticamente accettabile e può facoltativamente comprendere uno o più adiuvanti, stabilizzanti ecc. Il vaccino può essere sotto forma di vaccino terapeutico o profilattico.

Un altro aspetto riguarda un metodo per indurre una risposta immunitaria in un paziente, comprendente la somministrazione al paziente di un vaccino fornito secondo l'invenzione.

Un altro aspetto riguarda un metodo di trattamento di un paziente comprendente le fasi di:

(a) fornire un agente immunoterapeutico qui descritto come un vaccino utilizzando i metodi secondo l'invenzione; e

(b) somministrare detto agente immunoterapeutico al paziente. Un altro aspetto riguarda un metodo di trattamento di un paziente comprendente la somministrazione al paziente di un agente immunoterapeutico qui descritto come un vaccino.

In modo opzionale, il paziente è un malato di cancro e il vaccino è un vaccino anti-cancro come un vaccino la cui somministrazione fornisce neoepitopi specifici del cancro.

In ulteriori aspetti, l'invenzione fornisce i vaccini qui descritti per l'uso nei metodi di trattamento qui descritti, in particolare per l'uso nel trattamento o nella prevenzione del cancro.

I trattamenti contro il cancro qui descritti possono essere combinati con resezione chirurgica e/o radioterapia e/o chemioterapia tradizionale.

Altre caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dalla descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni seguenti.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

A meno di definizioni contrarie, tutti i termini tecnici e scientifici qui utilizzati hanno gli stessi significati comunemente compresi da un comune esperto nel ramo.

Preferibilmente, i termini qui utilizzati sono definiti come descritti in "Un glossario multilingue di termini biotecnologici: (Raccomandazioni IUPAC)", HGW Leuenberger, B. Nagel e H. Kolbl, Eds., (1995) Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Svizzera.

La pratica della presente invenzione impiegherà, se non diversamente indicato, metodi convenzionali di biochimica, biologia cellulare, immunologia e tecniche di DNA ricombinante che sono spiegati nella letteratura nel campo (cfr., Ad esempio, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Edizione, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

In tutta questa descrizione e le rivendicazioni che seguono, a meno che il contesto non richieda diversamente, la parola "comprende" e le variazioni come "comprende" e "comprende" implicheranno l'inclusione di un membro, numero intero o fase o gruppo dichiarato di membri, numeri interi o fasi ma non l'esclusione di qualsiasi altro membro, numero intero o fase o gruppo di membri, numeri interi o fasi sebbene in modo opzionale tale altro membro, numero intero o fase o gruppo di membri, numeri interi o fasi possa essere esclusa, vale a dire l'oggetto consiste nell'inclusione di un membro dichiarato, intero o gradino o gruppo di membri, numeri interi o gradini. Gli articoli determinativi e indeterminativi e riferimenti simili utilizzati nel contesto della descrizione dell'invenzione (specialmente nel contesto delle rivendicazioni) devono essere interpretati in modo da coprire sia il singolare che il plurale, a meno che non sia diversamente indicato nel presente documento o chiaramente contraddetto dal contesto. La recitazione di intervalli di valori nel presente contesto è destinata semplicemente a servire come metodo abbreviato per riferirsi individualmente a ciascun valore separato che rientra nell'intervallo. A meno che non sia diversamente indicato nel presente documento, ogni singolo valore è incorporato nella specifica come se venisse qui recitato individualmente.

Tutti i metodi qui descritti possono essere eseguiti in qualsiasi ordine adatto a meno che non sia diversamente indicato nel presente documento o altrimenti chiaramente contraddetto dal contesto. L'uso di uno qualsiasi e di tutti gli esempi, o di un linguaggio esemplificativo (ad esempio, "come"), fornito nel presente documento è inteso semplicemente per illustrare meglio l'invenzione e non pone una limitazione all'ambito dell'invenzione altrimenti rivendicata. Nessun linguaggio nella descrizione deve essere interpretato come indicativo di qualsiasi elemento non rivendicato essenziale per la pratica dell'invenzione.

Diversi documenti sono citati nel testo di questa specifica. Ciascuno dei documenti qui citati (inclusi tutti i brevetti, le domande di brevetto, le pubblicazioni scientifiche, le specifiche del produttore, le istruzioni, ecc.), Sia supra che infra, sono qui incorporati per riferimento nella loro interezza. Nulla qui deve essere interpretato come un'ammissione che l'invenzione non ha il diritto di anticipare tale divulgazione in virtù della precedente invenzione

La presente invenzione prevede l'immunoterapia di malattie, in particolare malattie del cancro utilizzando una proteina o un frammento proteico presente nelle cellule malate come etichetta e mirando alle cellule malate. In particolare, le cellule malate possono essere mirate prendendo di mira un frammento di una proteina presentata sulla superficie delle cellule malate nel contesto dell'MHC. L'immunoterapia secondo la presente invenzione deve essere effettuata mediante approcci immunoterapici attivi e/o passivi.

In particolare, la presente invenzione mira a definire proteine o loro frammenti adatti per l'immunoterapia. Una volta che una proteina adatta è stata identificata, questa proteina o un suo frammento (facoltativamente come parte di un polipeptide più grande) o un acido nucleico che

codifica per la proteina o il frammento (opzionalmente come parte di un polipeptide più grande) può essere usato come vaccino per migliorare o indurre una risposta immunitaria contro la proteina o un suo frammento, in particolare inducendo e/o attivando cellule effettrici appropriate come i linfociti T che riconoscono la proteina o un suo frammento (in particolare se presentata nel contesto di MHC) attraverso un recettore appropriato (come il recettore delle cellule T o il recettore artificiale delle cellule T). In alternativa o in aggiunta, possono essere somministrate cellule effettrici come le cellule T che riconoscono la proteina o un suo frammento (in particolare quando presentato nel contesto di MHC) attraverso un recettore appropriato (come un recettore delle cellule T o un recettore artificiale delle cellule T).

Senza voler essere vincolati a una particolare teoria, si ritiene che la proteina o un suo frammento che è previsto come utile in immunoterapia dalla presente invenzione abbia un'alta probabilità di essere assorbita dalle cellule presentanti l'antigene e di essere presentata dall'antigene presentando cellule, in particolare mediante presentazione incrociata, risultando così in definitiva in una risposta immunitaria efficiente contro le cellule malate che esprimono la proteina o un suo frammento.

Le proteine definite secondo l'invenzione come utili o adatte all'immunoterapia sono anche qui chiamate "antigeni". I frammenti di proteine definiti secondo l'invenzione come utili o adatti per l'immunoterapia sono anche qui definiti "epitopi".

Gli approcci immunoterapeutici secondo l'invenzione includono l'immunizzazione con:

i) proteina o peptide (nativo o modificato), ii) acido nucleico che codifica per proteina o peptide, iii) cellule ricombinanti che codificano per proteina o peptide, iv) virus ricombinanti che codificano per proteina o peptide ev) cellule presentanti l'antigene pulsate con proteina o peptide (nativo o modificato) o trasfettato con acidi nucleici che codificano per proteine o peptidi.

Gli approcci immunoterapeutici secondo l'invenzione includono anche il trasferimento di:

vi) recettori delle cellule T che riconoscono proteine o peptidi e vii) cellule effettrici (come le cellule T) che codificano i recettori che riconoscono proteine o peptidi, in particolare quando presentati nel contesto di MHC.

Le proteine e i frammenti preferiti secondo l'invenzione sono espressi in un modo specifico della malattia, per es. sono antigeni o epitopi associati alla malattia (ad esempio la presenza di una proteina o di cellule che esprimono una proteina è caratteristica della malattia) e/o comprendono una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia, ad esempio sono neo-antigeni o neoepitopi associati alla malattia. Preferibilmente, una modifica amminoacidica specifica della malattia è dovuta a una o più mutazioni somatiche specifiche della malattia. Preferibilmente, una modifica amminoacidica specifica per malattia è una modifica amminoacidica specifica per cancro e una mutazione somatica specifica per malattia è una mutazione somatica specifica per cancro. Pertanto, secondo l'invenzione, un vaccino presenta preferibilmente modificazioni amminoacidiche

specifiche della malattia/mutazioni somatiche specifiche della malattia di un paziente e preferibilmente dopo somministrazione fornisce uno o più neoepitopi basati sulla mutazione. Pertanto, il vaccino può comprendere un peptide o polipeptide comprendente uno o più neoepitopi basati su mutazioni, o un acido nucleico codificante detto peptide o polipeptide.

Preferibilmente, le modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia vengono identificate identificando mutazioni somatiche specifiche della malattia, per es. sequenziando DNA genomico e/o RNA di tessuto malato o una o più cellule malate.

Secondo l'invenzione, la fase di identificazione delle modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia e/o dell'identificazione delle mutazioni somatiche specifiche della malattia può essere eseguita prima o dopo i metodi dell'invenzione per prevedere l'utilità di una proteina o di un suo frammento espresso da cellule malate per l'immunoterapia. Preferibilmente dell'invenzione, le modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia e/o le mutazioni somatiche specifiche della malattia vengono determinate prima in un campione malato di un paziente e questo è seguito da una previsione dell'utilità della proteina comprendente uno o più amminoacidi specifici della malattia modificazioni acide o di un suo frammento comprendente una o più modificazioni amminoacidiche specifiche per la malattia per immunoterapia secondo i metodi dell'invenzione. Una volta identificate, le modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia (rispettivamente proteine che comprendono una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia o loro frammenti comprendenti una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia) possono anche essere selezionate e/o classificate per la loro utilità nell'immunoterapia secondo metodi di l'invenzione.

Il termine "esosomi" si riferisce a vescicole derivate da cellule che sono presenti nei fluidi biologici, inclusi sangue, urina e mezzo di coltura di colture cellulari. Gli esosomi vengono rilasciati dalla cellula quando i corpi multivesicolari si fondono con la membrana plasmatica oppure vengono rilasciati direttamente dalla membrana plasmatica. Gli esosomi contengono vari costituenti molecolari della loro cellula di origine, comprese le proteine e l'RNA. Sebbene la composizione della proteina esosomiale vari con la cellula e il tessuto di origine, la maggior parte degli esosomi contiene un insieme comune di molecole proteiche conservato in modo evolutivo. Gli esosomi possono trasferire molecole da una cellula all'altra tramite il traffico delle vescicole di membrana, influenzando così il sistema immunitario, come le cellule dendritiche e le cellule B, e possono svolgere un ruolo funzionale nel mediare le risposte immunitarie adattative a patogeni e tumori.

Come qui utilizzato, il termine "citosol" si riferisce alla porzione del citoplasma non all'interno delle sottostrutture legate alla membrana della cellula.

Secondo la presente invenzione, il termine "peptide" si riferisce a sostanze comprendenti due o più, preferibilmente 3 o più, preferibilmente 4 o più, preferibilmente 6 o più, preferibilmente 8 o più, preferibilmente 10 o più, preferibilmente 13 o più, preferibilmente 16 in più, preferibilmente 21 o più

e preferibilmente fino a 8, 10, 20, 30, 40 o 50, in particolare 100 amminoacidi uniti covalentemente da legami peptidici. Il termine "polipeptide" o "proteina" si riferisce a grandi peptidi, preferibilmente a peptidi con più di 100 residui di amminoacidi, ma in generale i termini "peptide", "polipeptide" e "proteina" sono sinonimi e vengono qui usati in modo intercambiabile.

Secondo l'invenzione, il termine "modifica" rispetto a peptidi, polipeptidi o proteine si riferisce a un cambiamento di sequenza in un peptide, polipeptide o proteina rispetto a una sequenza parentale come la sequenza di un peptide, polipeptide o proteina di tipo selvatico. Il termine include varianti di inserimento di amminoacidi, varianti di aggiunta di amminoacidi, varianti di delezione di amminoacidi e varianti di sostituzione di amminoacidi, preferibilmente varianti di sostituzione di amminoacido. Tutti questi cambiamenti di sequenza secondo l'invenzione possono potenzialmente creare nuovi epitopi.

Le varianti di inserzione di amminoacidi comprendono inserzioni di uno o due o più amminoacidi in una particolare sequenza di amminoacidi.

Le varianti di addizione di amminoacidi comprendono fusioni ammino- e/o carbossi-terminali di uno o più amminoacidi, come 1, 2, 3, 4 o 5 o più amminoacidi.

Le varianti di cancellazione di amminoacidi sono caratterizzate dalla rimozione di uno o più amminoacidi dalla sequenza, ad esempio dalla rimozione di 1, 2, 3, 4 o 5 o più amminoacidi.

Le varianti di sostituzione degli amminoacidi sono caratterizzate dal fatto che almeno un residuo nella sequenza viene rimosso e un altro residuo viene inserito al suo posto.

Secondo l'invenzione, una modifica o un peptide modificato può essere derivato da una proteina comprendente una modifica.

Il termine "derivato" significa secondo l'invenzione che una particolare entità, in particolare una particolare sequenza peptidica, è presente nell'oggetto da cui è derivata. Nel caso di sequenze amminoacidiche, in particolare regioni di sequenza particolari, "derivato" in particolare significa che la sequenza amminoacidica rilevante è derivata da una sequenza amminoacidica in cui è presente.

Secondo l'invenzione, le proteine qui descritte preferibilmente comprendono una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia. Preferibilmente, queste una o più modificazioni amminoacidiche specifiche per la malattia si trovano all'interno di epitopi o potenziali epitopi della proteina. Pertanto, le proteine preferite qui descritte sono neo-antigeni comprendenti preferibilmente uno o più neopitopi. Allo stesso modo, un frammento proteico preferito qui descritto è un frammento di una proteina comprendente una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia, in cui preferibilmente una o più modificazioni amminoacidiche specifiche della malattia sono situate all'interno del

frammento della proteina. Pertanto, un frammento proteico preferito qui descritto è un neoepitopo.

Secondo l'invenzione, il termine "neo-antigene" si riferisce a un peptide o proteina che include una o più modifiche amminoacidiche rispetto al peptide o alla proteina parentale. Ad esempio, il neo-antigene può essere un neo-antigene associato al tumore, in cui il termine "neo-antigene associato al tumore" include un peptide o una proteina comprese le modifiche degli amminoacidi dovute a mutazioni specifiche del tumore.

Secondo l'invenzione, il termine "mutazione di malattia specifica" si riferisce a una mutazione somatica che è presente nell'acido nucleico di una cellula malata ma assente nell'acido nucleico di una corrispondente cellula normale, cioè non malata. Secondo l'invenzione, il termine "mutazione specifica del tumore" o "mutazione specifica del cancro" si riferisce a una mutazione somatica che è presente nell'acido nucleico di un tumore o di una cellula cancerosa ma assente nell'acido nucleico di un corrispondente normale, cioè non cellule tumorali o non cancerose. I termini "mutazione specifica del tumore" e "mutazione tumorale" e i termini "mutazione specifica del cancro" e "mutazione del cancro" sono qui usati in modo intercambiabile.

Il termine "risposta immunitaria" si riferisce a una reazione del sistema immunitario come ad organismi immunogenici, come batteri o virus, cellule o sostanze. Il termine "risposta immunitaria" include la risposta immunitaria innata e la risposta immunitaria adattativa. Preferibilmente, la risposta immunitaria è correlata ad un'attivazione delle cellule immunitarie, un'induzione della biosintesi delle citochine e/o della produzione di anticorpi.

È preferibile che la risposta immunitaria indotta dalle composizioni qui descritte comprenda le fasi di attivazione di cellule presentanti l'antigene, come cellule dendritiche e/o macrofagi, presentazione di un antigene o un suo frammento da parte di dette cellule presentanti l'antigene e attivazione di cellule T citotossiche a causa di questa presentazione.

"Indurre una risposta immunitaria" può significare che non c'era risposta immunitaria prima dell'induzione, ma può anche significare che c'era un certo livello di risposta immunitaria prima dell'induzione e dopo l'induzione detta risposta immunitaria è migliorata. Pertanto, "indurre una risposta immunitaria" include anche "potenziare una risposta immunitaria". Preferibilmente, dopo aver indotto una risposta immunitaria in un soggetto, detto soggetto è protetto dallo sviluppo di una malattia come un cancro o la condizione della malattia è migliorata inducendo una risposta immunitaria. Ad esempio, una risposta immunitaria contro un antigene espresso dal tumore può essere indotta in un paziente con una malattia cancerosa o in un soggetto a rischio di sviluppare una malattia tumorale. Indurre una risposta immunitaria in questo caso può significare che la condizione della malattia del soggetto è migliorata, che il soggetto non sviluppa metastasi o che il soggetto a rischio di sviluppare una malattia tumorale non sviluppa una malattia tumorale.

I termini "risposta immunitaria cellulare" e "risposta cellulare" o termini simili si riferiscono a una risposta immunitaria diretta a cellule caratterizzate dalla presentazione di un antigene con MHC di classe I o II che coinvolge cellule T o linfociti T che agiscono come "aiutanti" o "assassini". Le cellule T helper (chiamate anche cellule T CD4 <+>) svolgono un ruolo centrale regolando la risposta immunitaria e le cellule killer (chiamate anche cellule T citotossiche, cellule T citolitiche, cellule T CD8 <+> o CTL) uccidono le cellule malate come le cellule tumorali, impedendo la produzione di più cellule malate. In forme di realizzazione preferite, la presente invenzione implica la stimolazione di una risposta CTL anti-malattia contro cellule malate che esprimono uno o più antigeni associati alla malattia e preferibilmente presentando tali antigeni associati alla malattia con MHC di classe I, in particolare una risposta CTL anti-tumorale contro il tumore cellule che esprimono uno o più antigeni espressi dal tumore e preferibilmente che presentano tali antigeni espressi dal tumore con MHC di classe I.

Secondo l'invenzione, il termine "antigene" o "immunogeno" copre qualsiasi sostanza, preferibilmente un peptide o una proteina, che è un bersaglio di una risposta immunitaria e/o che susciterà una risposta immunitaria. In particolare, un "antigene" si riferisce a qualsiasi sostanza che reagisce in modo specifico con anticorpi o linfociti T (cellule T). Secondo la presente invenzione, il termine "antigene" comprende qualsiasi molecola che comprende almeno un epitopo come un epitopo di cellule T. Preferibilmente, un antigene nel contesto della presente invenzione è una molecola che, facoltativamente dopo l'elaborazione, induce una reazione immunitaria, che è preferibilmente specifica per l'antigene o le cellule che esprimono l'antigene. Secondo la presente invenzione, può essere utilizzato qualsiasi antigene adatto, che è un candidato per una reazione immunitaria, in cui la reazione immunitaria è preferibilmente una reazione immunitaria cellulare. Nel contesto delle forme di realizzazione della presente invenzione, l'antigene è preferibilmente presentato da una cellula, preferibilmente da una cellula presentante l'antigene, nel contesto delle molecole MHC, che si traduce in una reazione immunitaria contro l'antigene.

Un antigene è preferibilmente un prodotto che corrisponde o è derivato da un antigene presente in natura. Tali antigeni presenti in natura possono includere o possono essere derivati da allergeni, virus, batteri, funghi, parassiti e altri agenti infettivi e patogeni oppure un antigene può anche essere un antigene tumorale. Secondo la presente invenzione, un antigene può corrispondere a un prodotto presente in natura, ad esempio, una proteina virale o una sua parte. Nelle forme di realizzazione preferite, l'antigene è un polipeptide di superficie, cioè un polipeptide naturalmente visualizzato sulla superficie di una cellula, un agente patogeno, un batterio, un virus, un fungo, un parassita, un allergene o un tumore. L'antigene può provocare una risposta immunitaria contro una cellula, un agente patogeno, un batterio, un virus, un fungo, un parassita, un allergene o un tumore.

Il termine "antigene associato alla malattia" viene utilizzato nel senso più ampio per riferirsi a qualsiasi antigene associato a una malattia. Un antigene associato alla malattia è una molecola che contiene epitopi che stimoleranno il sistema immunitario di un ospite a produrre una risposta

immunitaria specifica dell'antigene cellulare e/o una risposta anticorpale umorale contro la malattia. L'antigene associato alla malattia può quindi essere utilizzato a scopo terapeutico. Gli antigeni associati alla malattia sono preferibilmente associati all'infezione da microbi, tipicamente antigeni microbici, o associati al cancro, tipicamente tumori.

Il termine "patogeno" si riferisce a materiale biologico patogeno in grado di provocare malattie in un organismo, preferibilmente un organismo vertebrato. Gli agenti patogeni includono microrganismi come batteri, organismi eucarioti unicellulari (protozoi), funghi e virus.

I termini "epitopo", "peptide antigenico", "epitopo antigene", "peptide immunogenico" e "peptide legante MHC" sono usati in modo intercambiabile nel presente documento e si riferiscono a un determinante antigenico in una molecola come un antigene, cioè a una parte in un frammento di un composto immunologicamente attivo che è riconosciuto dal sistema immunitario, ad esempio, che è riconosciuto da una cellula T, in particolare quando presentato nel contesto di molecole MHC. Un epitopo di una proteina comprende preferibilmente una porzione continua o discontinua di detta proteina ed è preferibilmente tra 5 e 100, preferibilmente tra 5 e 50, più preferibilmente tra 8 e 30, più preferibilmente tra 10 e 25 amminoacidi di lunghezza, per esempio, l'epitopo può essere preferibilmente di lunghezza 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 amminoacidi. Secondo l'invenzione un epitopo può legarsi a molecole MHC come molecole MHC sulla superficie di una cellula e quindi, può essere un "peptide legante MHC" o "peptide antigene".

Il termine "complesso maggiore di istocompatibilità" e l'abbreviazione "MHC" includono molecole MHC di classe I e MHC di classe II e si riferiscono a un complesso di geni che è presente in tutti i vertebrati. Le proteine o le molecole MHC sono importanti per la segnalazione tra i linfociti e le cellule che presentano l'antigene o le cellule malate nelle reazioni immunitarie, in cui le proteine o le molecole MHC si legano ai peptidi e le presentano per il riconoscimento da parte dei recettori delle cellule T. Le proteine codificate dall'MHC sono espresse sulla superficie delle cellule e mostrano sia antigeni auto (frammenti peptidici dalla cellula stessa) che antigeni non auto (ad esempio, frammenti di microrganismi invasori) a una cellula T. Tali porzioni immunogeniche preferite si legano a una molecola MHC di classe I o di classe II. Come qui utilizzato, si dice che una porzione immunogenica "si lega a" una molecola MHC di classe I o di classe II se tale legame è rilevabile usando qualsiasi saggio noto nell'arte. Il termine "peptide legante MHC" si riferisce a un peptide che si lega a una molecola MHC di classe I e/o MHC di classe II.

Nel caso dei complessi MHC/peptide di classe I, i peptidi leganti sono tipicamente lunghi 8-10 amminoacidi sebbene peptidi più lunghi o più corti possano essere efficaci. Nel caso dei complessi MHC/peptide di classe II, i peptidi leganti sono tipicamente lunghi 10-25 amminoacidi e sono in particolare lunghi 13-18 amminoacidi, mentre i peptidi più lunghi e più corti possono essere efficaci. Preferibilmente di tutti gli aspetti dell'invenzione, una molecola MHC è una molecola HLA.

Se un peptide fa parte di un'entità più grande comprendente sequenze aggiuntive, ad es. di una sequenza vaccinale o polipeptide, e deve essere presentato dopo l'elaborazione, in particolare dopo la scissione, il peptide prodotto dalla lavorazione ha una lunghezza che è adatta per legarsi a una molecola MHC, in particolare una molecola MHC di classe I, e preferibilmente è 7-30 amminoacidi di lunghezza come 7-20 amminoacidi di lunghezza, più preferibilmente 7-12 amminoacidi di lunghezza, più preferibilmente 8-11 amminoacidi di lunghezza, in particolare 9 o 10 amminoacidi di lunghezza. Preferibilmente, la sequenza del peptide che deve essere presentata dopo l'elaborazione è derivata dalla sequenza amminoacidica di un antigene o polipeptide utilizzato per la vaccinazione, vale a dire, la sua sequenza corrisponde sostanzialmente ed è preferibilmente completamente identica a un frammento dell'antigene o del polipeptide.

Pertanto, un peptide legante MHC in modo opzionale comprende una sequenza che corrisponde sostanzialmente ed è preferibilmente completamente identica a un frammento di un antigene.

Come usato nel presente documento, il termine "neo-epitopo" si riferisce a un epitopo che non è presente in un riferimento come una cellula germinale o normale non malata (ad esempio non cancerosa) ma si trova in cellule malate (ad esempio cellule cancerose). Ciò include, in particolare, le situazioni in cui in una normale cellula non malata o germinale si trova un epitopo corrispondente, tuttavia, a causa di una o più mutazioni in una cellula malata la sequenza dell'epitopo viene modificata in modo da risultare nella neo-epitopo. Come qui utilizzato, il termine "epitopo delle cellule T" si riferisce a un peptide che si lega a una molecola MHC in una configurazione riconosciuta da un recettore delle cellule T. Tipicamente, gli epitopi delle cellule T sono presentati sulla superficie di una cellula che presenta l'antigene.

L'epitopo cellulare AT secondo l'invenzione si riferisce preferibilmente a una porzione o un frammento di un antigene che è in grado di stimolare una risposta immunitaria, preferibilmente una risposta cellulare contro l'antigene o le cellule caratterizzate dall'espressione dell'antigene e preferibilmente dalla presentazione dell'antigene come cellule malate, in particolare cellule cancerose. Preferibilmente, un epitopo di cellule T è in grado di stimolare una risposta cellulare contro una cellula caratterizzata dalla presentazione di un antigene con MHC di classe I e preferibilmente è in grado di stimolare un linfocita T citotossico che risponde agli antigeni (CTL).

In modo opzionale, un vaccino secondo la presente invenzione comprende un epitopo adatto per la vaccinazione di un organismo bersaglio. Una persona esperta nel settore saprà che uno dei principi dell'immunobiologia e della vaccinazione si basa sul fatto che una reazione immunoprotettiva a una malattia viene prodotta immunizzando un organismo con un vaccino, che è immunologicamente rilevante rispetto alla malattia da trattata. Secondo la presente invenzione, un antigene è selezionato dal gruppo comprendente un antigene auto e un antigene non auto. Un antigene non auto è preferibilmente un antigene batterico, un antigene virale, un antigene fungo, un allergene o un antigene parassita. È preferibile

che l'antigene comprenda un epitopo che è in grado di suscitare una risposta immunitaria in un organismo bersaglio. Ad esempio, l'epitopo può suscitare una risposta immunitaria contro un batterio, un virus, un fungo, un parassita, un allergene o un tumore.

In modo opzionale l'antigene non auto è un antigene batterico. In modo opzionale, l'antigene provoca una risposta immunitaria contro un batterio che infetta animali, inclusi uccelli, pesci e mammiferi, inclusi animali domestici. Preferibilmente, il batterio contro il quale viene stimolata la risposta immunitaria è un batterio patogeno.

In modo opzionale l'antigene non auto è un antigene virale. Un antigene virale può per esempio essere un peptide da una proteina di superficie del virus, per es. un polipeptide capsidico o un polipeptide spike. In modo opzionale, l'antigene provoca una risposta immunitaria contro un virus che infetta gli animali, inclusi uccelli, pesci e mammiferi, inclusi gli animali domestici. Preferibilmente, il virus contro il quale viene suscitata la risposta immunitaria è un virus patogeno.

In modo opzionale l'antigene non auto è un polipeptide o una proteina di un fungo. In modo opzionale, l'antigene provoca una risposta immunitaria contro un fungo che infetta animali, inclusi uccelli, pesci e mammiferi, inclusi animali domestici. Preferibilmente, il fungo contro il quale viene stimolata la risposta immunitaria è un fungo patogeno.

In modo opzionale l'antigene non auto è un polipeptide o una proteina di un parassita eucariotico unicellulare. In modo opzionale, l'antigene suscita una risposta immunitaria contro un parassita eucariotico unicellulare, preferibilmente un parassita eucariotico unicellulare patogeno. I parassiti eucariotici unicellulari patogeni possono essere ad es. dal genere Plasmodium, ad es. P. falciparum, P. vivax, P. malariae o P. ovale, dal genere Leishmania, o dal genere Trypanosoma, ad es. T. cruzi o T. brucei.

In modo opzionale l'antigene non auto è un polipeptide allergenico o una proteina allergenica. Una proteina allergenica o un polipeptide allergenico è adatto per l'immunoterapia con allergeni, nota anche come ipo-sensibilizzazione.

In modo opzionale l'antigene è un auto-antigene, in particolare un antigene tumorale. Gli antigeni tumorali e la loro determinazione sono noti alla persona esperta.

Nel contesto della presente invenzione, il termine "antigene tumorale" o "antigene associato al tumore" si riferisce a proteine che sono in condizioni normali espresse in modo specifico in un numero limitato di tessuti e/o organi o in specifici stadi di sviluppo, per esempio, l'antigene tumorale può essere in condizioni normali espresse in modo specifico nel tessuto dello stomaco, preferibilmente nella mucosa gastrica, negli organi riproduttivi, p. es., nel testicolo, nel tessuto trofoblastico, p. es., nella placenta, o nelle cellule della linea germinale, e sono espressi o espressi in modo aberrante in uno o più tessuti tumorali o cancerosi. In questo contesto, "un numero limitato" significa preferibilmente non più di 3, più

preferibilmente non più di 2. Gli antigeni tumorali nel contesto della presente invenzione includono, ad esempio, antigeni di differenziazione, preferibilmente antigeni di differenziazione specifici del tipo cellulare, cioè proteine che sono in condizioni normali espresse in modo specifico in un certo tipo di cellula in un certo stadio di differenziazione, antigeni cancro/testicolo, cioè proteine che in condizioni normali sono espresse specificamente nel testicolo e talvolta nella placenta e antigeni specifici della linea germinale.

Nel contesto della presente invenzione, l'antigene tumorale è preferibilmente associato alla superficie cellulare di una cellula cancerosa e preferibilmente non è espresso o è solo raramente espresso nei tessuti normali. Preferibilmente, l'antigene tumorale o l'espressione aberrante dell'antigene tumorale identifica le cellule tumorali. Nel contesto della presente invenzione, l'antigene tumorale che è espresso da una cellula cancerosa in un soggetto, ad esempio un paziente affetto da una malattia tumorale, è preferibilmente un'auto-proteina in detto soggetto. In forme di realizzazione preferite, l'antigene tumorale nel contesto della presente invenzione è espresso in condizioni normali specificamente in un tessuto o organo che non è essenziale, cioè tessuti o organi che quando danneggiati dal sistema immunitario non portano alla morte del soggetto, o in organi o strutture del corpo che non sono o solo difficilmente accessibili dal sistema immunitario. Preferibilmente, la sequenza amminoacidica dell'antigene tumorale è identica tra l'antigene tumorale che è espresso nei tessuti normali e l'antigene tumorale che è espresso nei tessuti cancerogeni.

Esempi di antigeni tumorali che possono essere utili nella presente invenzione sono p53, ART-4, BAGE, beta-catenina/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, le proteine di superficie cellulare della famiglia delle claudine, come CLAUDIN-6, CLAUDIN-18.2 e CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (o hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, preferibilmente MAGE-A 1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 o MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART-1/Melan-A, MC1R, Miosina/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 minor BCR-abl, Pml/RARa, PRAME, proteinasi 3, PSA, PSM, RAGE, RU1 o RU2, SAGE, SART-1 o SART-3, SCGB3A2, SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE e WT. Gli antigeni tumorali particolarmente preferiti includono CLAUDIN-18.2 (CLDN18.2) e CLAUDIN-6 (CLDN6).

Il termine "immunogenicità" si riferisce alla relativa efficacia nell'indurre una risposta immunitaria che è preferibilmente associata a trattamenti terapeutici, come trattamenti contro i tumori. Come qui utilizzato, il termine "immunogenico" si riferisce alla proprietà di avere immunogenicità. Ad esempio, il termine "modifica immunogenica" quando utilizzato nel contesto di un peptide, polipeptide o proteina si riferisce all'efficacia di detto peptide, polipeptide o proteina per indurre una risposta immunitaria che è causata da e/o diretta contro detta modifica. Preferibilmente, il peptide, il polipeptide o la proteina non modificati non induce una risposta immunitaria, induce una risposta immunitaria diversa o

induce un livello diverso, preferibilmente un livello inferiore, di risposta immunitaria.

Secondo l'invenzione, il termine "immunogenicità" o "immunogenico" si riferisce preferibilmente all'efficacia relativa per indurre una risposta immunitaria biologicamente rilevante, in particolare una risposta immunitaria che è utile per la vaccinazione. Pertanto, Preferibilmente, una modifica dell'amminoacido o un peptide modificato è immunogenico se induce una risposta immunitaria contro la modifica del bersaglio in un soggetto, la cui risposta immunitaria può essere vantaggiosa per scopi terapeutici o profilattici.

Come usato nel presente documento, il termine "prevedere l'utilità di una proteina o di un suo frammento per l'immunoterapia" si riferisce a una previsione se la proteina o uno o più suoi frammenti come gli epitopi, in particolare gli epitopi delle cellule T, saranno utili per indurre un sistema immunitario risposta o mirare a una risposta immunitaria. Se si prevede che una proteina come un antigene associato a malattia sia utile per l'immunoterapia, ad esempio, per la vaccinazione possono essere utilizzati epitopi di detta proteina come qui descritto o possono essere somministrate cellule effettrici mirate a un epitopo di detta proteina. Preferibilmente, una proteina la cui utilità per l'immunoterapia deve essere prevista secondo l'invenzione è espressa nelle cellule malate di un paziente.

Secondo l'invenzione, un epitopo di cellule T può essere presente in un vaccino come parte di un'entità più grande come una sequenza di vaccino e/o un polipeptide comprendente più di un epitopo di cellule T. Il peptide presentato o l'epitopo delle cellule T viene prodotto dopo un'adeguata elaborazione. Inoltre, gli epitopi dei linfociti T possono essere modificati in uno o più residui che non sono essenziali per il riconoscimento del TCR o per il legame con MHC. Tali epitopi delle cellule T modificati possono essere considerati immunologicamente equivalenti. Preferibilmente un epitopo di cellule T quando presentato da MHC e riconosciuto da un recettore di cellule T è in grado di indurre in presenza di segnali co-stimolatori appropriati, l'espansione clonale della cellula T che porta il recettore delle cellule T che riconosce specificamente il complesso peptide/MHC. Preferibilmente, un epitopo di cellule T comprende una sequenza amminoacidica sostanzialmente corrispondente alla sequenza amminoacidica di un frammento di un antigene. Preferibilmente, detto frammento di un antigene è un peptide presentato di classe I e/o di classe II MHC.

"Elaborazione dell'antigene" o "elaborazione" si riferisce alla degradazione di un peptide, polipeptide o proteina in prodotti di processione, che sono frammenti di detto peptide, polipeptide o proteina (ad esempio, la degradazione di un polipeptide in peptidi) e l'associazione di uno o più di questi frammenti (ad esempio, tramite legame) con molecole MHC per la presentazione da parte delle cellule, preferibilmente cellule presentanti l'antigene, a cellule T specifiche.

Gli antigeni di classe II sono in gran parte derivati da proteine esogene che entrano nelle cellule presentanti l'antigene attraverso la via

endocitica e vengono processate nel compartimento endosomiale. Al contrario, gli antigeni riconosciuti dal CTL effettore di classe I limitato sono solitamente derivati da proteine sintetizzate endogenamente. Pertanto, le proteine esogene non possono fornire determinanti antigenici per CTL effettore di classe I a meno che non vengano introdotte direttamente nel citoplasma delle cellule bersaglio.

Il termine "presentazione incrociata" si riferisce alla capacità delle cellule che presentano l'antigene di assorbire, elaborare e presentare antigeni extracellulari con molecole MHC di classe I alle cellule T CD8 (cellule T citotossiche). Il cross-priming descrive la stimolazione delle cellule T CD8 + citotossiche ingenua da questo processo. Le cellule presentanti l'antigene capaci di presentazione incrociata sono principalmente cellule dendritiche, ma è stato dimostrato che anche i macrofagi, i linfociti B e le cellule endoteliali sinusoidali sono in grado di farlo.

È stato dimostrato che il cross-priming si verifica per proteine virali e antigeni tumorali. Ciò ha portato alla proposta che il cross-priming possa fornire al sistema immunitario un meccanismo mediante il quale può rilevare e rispondere ai virus tissutali tropici che non infettano l'APC professionale. In assenza di un tale meccanismo, i virus potrebbero sfuggire all'immunosorveglianza evitando l'APC professionale. Questo meccanismo fornisce anche al sistema immunitario un mezzo per esaminare i neo-antigeni espressi dalle cellule tumorali di nuova insorgenza. Come gli antigeni estranei esogeni, gli antigeni del sé esogeni possono entrare nel percorso di presentazione di classe I.

Le "cellule presentanti l'antigene" (APC) sono cellule che presentano frammenti peptidici di antigeni proteici in associazione con molecole MHC sulla loro superficie cellulare. Alcuni APC possono attivare le cellule T specifiche dell'antigene.

Le cellule professionali che presentano l'antigene sono molto efficienti nell'internalizzare l'antigene, sia per fagocitosi che per endocitosi mediata dal recettore, e quindi visualizzare un frammento dell'antigene, legato a una molecola MHC di classe II, sulla loro membrana. La cellula T riconosce e interagisce con il complesso molecolare MHC di classe II dell'antigene sulla membrana della cellula che presenta l'antigene. Un ulteriore segnale co-stimolatorio viene quindi prodotto dalla cellula che presenta l'antigene, portando all'attivazione della cellula T. L'espressione di molecole co-stimolatorie è una caratteristica distintiva delle cellule presentatrici di antigeni professionali.

I principali tipi di cellule presentanti l'antigene professionale sono le cellule dendritiche, che hanno la più ampia gamma di presentazione dell'antigene e sono probabilmente le cellule presentanti l'antigene più importanti, i macrofagi, le cellule B e alcune cellule epiteliali attivate. Le cellule dendritiche (DC) sono popolazioni di leucociti che presentano antigeni catturati nei tessuti periferici ai linfociti T tramite le vie di presentazione dell'antigene MHC di classe II e I. È ben noto che le cellule dendritiche sono potenti induttori delle risposte immunitarie e l'attivazione di queste cellule è un passaggio fondamentale per l'induzione dell'immunità antitumorale. Le cellule dendritiche sono opportunamente classificate come cellule "immature" e "mature", che possono essere utilizzate come un modo semplice per discriminare tra due fenotipi ben caratterizzati.

Tuttavia, questa nomenclatura non dovrebbe essere interpretata per escludere tutte le possibili fasi intermedie di differenziazione. Le cellule dendritiche immature sono caratterizzate come cellule presentanti l'antigene con un'elevata capacità di assorbimento e elaborazione dell'antigene, che è correlata con l'alta espressione del recettore Fey e del recettore del mannosio.

Il fenotipo maturo è tipicamente caratterizzato da una minore espressione di questi marcatori, ma un'alta espressione di molecole di superficie cellulare responsabili dell'attivazione dei linfociti T come MHC di classe I e II, molecole di adesione (ad es. CD54 e CD11) e molecole costimolatorie (ad esempio, CD40, CD80, CD86 e 4-1 BB). La maturazione delle cellule dendritiche è indicata come lo stato di attivazione delle cellule dendritiche in cui tali cellule dendritiche presentanti l'antigene portano all'innescamento delle cellule T, mentre la presentazione da parte delle cellule dendritiche immature risulta in tolleranza. La maturazione delle cellule dendritiche è principalmente causata da biomolecole con caratteristiche microbiche rilevate da recettori innati (DNA batterico, RNA virale, endotossina, ecc.), Citochine pro-infiammatorie (TNF, IL-1, IFN), legatura di CD40 sulla superficie delle cellule dendritiche da CD40L e sostanze rilasciate da cellule sottoposte a morte cellulare stressante. Le cellule dendritiche possono essere derivate coltivando cellule del midollo osseo in vitro con citochine, come il fattore stimolante le colonie granulociti-macrofagi (GM-CSF) e il fattore di necrosi tumorale alfa.

Le cellule presentanti l'antigene non professionali non esprimono costitutivamente le proteine MHC di classe II richieste per l'interazione con le cellule T naive; questi sono espressi solo su stimolazione delle cellule presentanti l'antigene non professionale da parte di alcune citochine come IFN γ .

Per "cellula caratterizzata dalla presentazione di un antigene" o "cellula che presenta un antigene" o espressioni simili si intende una cellula come una cellula malata, ad es. una cellula cancerosa, o una cellula che presenta l'antigene che presenta un antigene o un frammento derivato da detto antigene, per es. mediante elaborazione dell'antigene, nel contesto di molecole MHC, in particolare molecole MHC di Classe I. Allo stesso modo, il termine "malattia caratterizzata dalla presentazione di un antigene" denota una malattia che coinvolge cellule caratterizzate dalla presentazione di un antigene, in particolare con MHC di classe I. La presentazione di un antigene da parte di una cellula può essere effettuata trasferendo la cellula con un acido nucleico come l'RNA che codifica l'antigene.

Per "frammento di un antigene che viene presentato" o espressioni simili si intende che il frammento può essere presentato da MHC classe I o classe II, preferibilmente MHC classe I, ad es. quando aggiunto direttamente alle cellule che presentano l'antigene. In modo opzionale, il frammento è un frammento che è naturalmente presentato dalle cellule che esprimono un antigene.

"Cellula bersaglio" indica una cellula che è l'obiettivo di una risposta immunitaria come una risposta immunitaria cellulare. Le cellule

bersaglio includono cellule che presentano un antigene, cioè un frammento di peptide derivato da un antigene, e includono qualsiasi cellula indesiderabile come una cellula cancerosa. In forme di realizzazione preferite, la cellula bersaglio è una cellula che esprime un antigene come qui descritto e preferibilmente presenta detto antigene con MHC di classe I. Il termine "porzione" si riferisce a una frazione. Rispetto a una struttura particolare come una sequenza amminoacidica o una proteina, il termine "porzione" di essa può designare una frazione continua o discontinua di detta struttura. Preferibilmente, una porzione di una sequenza di amminoacidi comprende almeno l'1%, almeno il 5%, almeno il 10%, almeno il 20%, almeno il 30%, preferibilmente almeno il 40%, preferibilmente almeno il 50%, più preferibilmente a almeno il 60%, più preferibilmente almeno il 70%, ancora più preferibilmente almeno l'80% e più preferibilmente almeno il 90% degli amminoacidi di detta sequenza amminoacidica.

Preferibilmente, se la porzione è una frazione discontinua, detta frazione discontinua è composta da 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o più parti di una struttura, ciascuna parte essendo un elemento continuo della struttura. Ad esempio, una frazione discontinua di una sequenza di amminoacidi può essere composta da 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o più, preferibilmente non più di 4 parti di detta sequenza di amminoacidi, in cui ciascuna parte comprende preferibilmente a almeno 5 amminoacidi continui, almeno 10 amminoacidi continui, preferibilmente almeno 20 amminoacidi continui, preferibilmente almeno 30 amminoacidi continui della sequenza amminoacidica.

I termini "parte" e "frammento" sono qui usati in modo intercambiabile e si riferiscono a un elemento continuo. Ad esempio, una parte di una struttura come una sequenza di amminoacidi o una proteina si riferisce a un elemento continuo di detta struttura. Una porzione, una parte o un frammento di una struttura comprende preferibilmente una o più proprietà funzionali di detta struttura. Ad esempio, una porzione, una parte o un frammento di un epitopo, peptide o proteina è preferibilmente immunologicamente equivalente all'epitopo, peptide o proteina da cui è derivato. Nel contesto della presente invenzione, una "parte" di una struttura come una sequenza di amminoacidi comprende preferibilmente, preferibilmente consiste di almeno il 10%, almeno il 20%, almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50 %, almeno 60%, almeno 70%, almeno 80%), almeno 85%, almeno 90%, almeno 92%, almeno 94%, almeno 96%, almeno 98%, almeno 99% dell'intera struttura o sequenza di amminoacidi.

Il termine "cellula effettrice", "cellula effettrice immunitaria" o "cellula immunoreattiva" nel contesto della presente invenzione si riferisce a una cellula che esercita funzioni effettrici durante una reazione immunitaria. Una "cellula immunoreattiva" preferibilmente è in grado di legare un antigene o una cellula caratterizzata dalla presentazione di un antigene o di un suo frammento peptidico (ad esempio un epitopo di cellule T) e di mediare una risposta immunitaria. Ad esempio, tali cellule secernono citochine e/o chemochine, secernono anticorpi, riconoscono cellule cancerose ed eventualmente eliminano tali cellule. Ad esempio, le cellule immunoreattive comprendono le cellule T (cellule T citotossiche, cellule T helper, cellule T infiltranti il tumore), cellule B, cellule natural killer, neutrofilo, macrofagi e cellule dendritiche. Preferibilmente, nel contesto della presente

invenzione, le cellule immunoreattive sono cellule T, preferibilmente cellule T CD4⁺ e/o CD8⁺.

Preferibilmente, una "cellula immunoreattiva" riconosce un antigene o un suo frammento peptidico con un certo grado di specificità, in particolare se presentato nel contesto di molecole MHC come sulla superficie di cellule presentanti l'antigene o cellule malate come cellule cancerose. Preferibilmente, detto riconoscimento consente alla cellula che riconosce un antigene o un suo frammento peptidico di essere reattiva o reattiva. Se la cellula è una cellula T helper (cellula T CD4⁺) recante recettori che riconoscono un antigene o un suo frammento peptidico nel contesto delle molecole MHC di classe II, tale reattività o reattività può comportare il rilascio di citochine e/o l'attivazione di linfociti CD8⁺ (CTL) e/o cellule B. Se la cellula è un CTL tale reattività o reattività può comportare l'eliminazione di cellule presentate nel contesto di molecole MHC di classe I, cioè cellule caratterizzate dalla presentazione di un antigene con MHC di classe I, ad esempio, tramite apoptosi o cellula mediata dalla perforina lisi.

Secondo l'invenzione, la reattività del CTL può includere un flusso di calcio sostenuto, divisione cellulare, produzione di citochine come IFN- γ e TNF- α , sovraregolazione dei marcatori di attivazione come CD44 e CD69 e uccisione citolitica specifica di cellule bersaglio che esprimono l'antigene. La reattività CTL può anche essere determinata utilizzando un reporter artificiale che indica accuratamente la reattività CTL. Tali CTL che riconoscono un antigene o un frammento di antigene e sono responsivi o reattivi sono anche qui definiti "CTL reattivi all'antigene". Se la cellula è una cellula B, tale reattività può comportare il rilascio di immunoglobuline.

I termini "cellula T" e "linfocita T" sono qui usati in modo intercambiabile e includono cellule T helper (cellule T CD4 +) e cellule T citotossiche (CTL, cellule T CD8 +) che comprendono cellule T citolitiche.

Le cellule T appartengono a un gruppo di globuli bianchi noti come linfociti e svolgono un ruolo centrale nell'immunità cellulo-mediata. Possono essere distinti da altri tipi di linfociti, come le cellule B e le cellule natural killer per la presenza di uno speciale recettore sulla loro superficie cellulare chiamato recettore delle cellule T (TCR). Il timo è il principale organo responsabile della maturazione dei linfociti T. Sono stati scoperti diversi sottoinsiemi di cellule T, ognuno con una funzione distinta.

Le cellule T helper assistono altri globuli bianchi nei processi immunologici, compresa la maturazione delle cellule B in plasmacellule e l'attivazione di cellule T citotossiche e macrofagi, tra le altre funzioni. Queste cellule sono anche note come cellule T CD4 + perché esprimono la proteina CD4 sulla loro superficie. Le cellule T helper si attivano quando vengono presentate con antigeni peptidici da molecole MHC di classe II che sono espresse sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC). Una volta attivati, si dividono rapidamente e secernono piccole proteine chiamate citochine che regolano o assistono la risposta immunitaria attiva.

Le cellule T citotossiche distruggono le cellule infettate viralmente e le cellule tumorali e sono anche implicate nel rigetto del trapianto.

Queste cellule sono anche conosciute come cellule T CD8 + poiché esprimono la glicoproteina CD8 sulla loro superficie. Queste cellule riconoscono i loro bersagli legandosi all'antigene associato all'MHC di classe I, che è presente sulla superficie di quasi tutte le cellule del corpo.

La maggior parte delle cellule T ha un recettore delle cellule T (TCR) esistente come un complesso di diverse proteine. L'attuale recettore delle cellule T è composto da due catene peptidiche separate, che sono prodotte dai geni indipendenti del recettore delle cellule T alfa e beta (TCR α e TCR β) e sono chiamate catene α - e β -TCR, cellule T $\gamma\delta$ (cellule T gamma delta) rappresentano un piccolo sottoinsieme di cellule T che possiedono un recettore distinto delle cellule T (TCR) sulla loro superficie. Tuttavia, nelle cellule T $\gamma\delta$, il TCR è costituito da una catena γ e una catena δ . Questo gruppo di cellule T è molto meno comune (2% delle cellule T totali) rispetto alle cellule T $\alpha\beta$.

Secondo l'invenzione il termine "recettore dell'antigene" include recettori presenti in natura come i recettori delle cellule T nonché recettori ingegnerizzati, che conferiscono una specificità arbitraria come la specificità di un anticorpo monoclonale su una cellula effettrice come una cellula T. In questo modo, un gran numero di cellule T antigene-specifiche può essere generato per il trasferimento cellulare adottivo. Pertanto, un recettore dell'antigene secondo l'invenzione può essere presente sui linfociti T, ad es. al posto o in aggiunta al recettore dei linfociti T della cellula T. Tali cellule T non richiedono necessariamente l'elaborazione e la presentazione di un antigene per il riconoscimento della cellula bersaglio, ma piuttosto possono riconoscere preferibilmente con specificità qualsiasi antigene presente su una cellula bersaglio. Preferibilmente, detto recettore dell'antigene è espresso sulla superficie delle cellule. Ai fini della presente invenzione, le cellule T comprendenti un recettore dell'antigene ingegnerizzato sono comprese dal termine "cellula T" come qui utilizzato. In particolare, secondo l'invenzione, il termine "recettore dell'antigene" include recettori artificiali comprendenti una singola molecola o un complesso di molecole che riconoscono, cioè si legano a, una struttura bersaglio (ad esempio un antigene) su una cellula bersaglio come una cellula cancerosa (ad es. legando un sito di legame dell'antigene o un dominio di legame dell'antigene a un antigene espresso sulla superficie della cellula bersaglio) e può conferire specificità a una cellula effettrice come una cellula T che esprime detto recettore dell'antigene sulla superficie cellulare.

Preferibilmente, il riconoscimento della struttura bersaglio da parte di un recettore dell'antigene si traduce nell'attivazione di una cellula effettrice che esprime detto recettore dell'antigene. Secondo l'invenzione un "recettore dell'antigene" può essere un "recettore chimerico dell'antigene (CAR)", "recettore chimerico delle cellule T" o "recettore artificiale delle cellule T".

Secondo l'invenzione, l'antigene può essere riconosciuto da un recettore dell'antigene attraverso qualsiasi dominio di riconoscimento dell'antigene (qui indicato anche semplicemente come "domini") in grado di formare un sito di legame dell'antigene come attraverso porzioni di legame dell'antigene di anticorpi e recettori delle cellule T che può risiedere sulla stessa o diverse catene peptidiche. In modo opzionale, i due domini

che formano un sito di legame dell'antigene sono derivati da un'immunoglobulina. In un'altra forma di realizzazione, i due domini che formano un sito di legame dell'antigene sono derivati da un recettore delle cellule T. Particolarmente preferiti sono i domini variabili dell'anticorpo, come frammenti variabili a catena singola (scFv) derivati da anticorpi monoclonali e domini variabili del recettore delle cellule T, in particolare catene singole TCR alfa e beta. In effetti, quasi tutto ciò che lega un determinato bersaglio con un'elevata affinità può essere utilizzato come dominio di riconoscimento dell'antigene. Il primo segnale di attivazione delle cellule T è fornito dal legame del recettore delle cellule T a un breve peptide presentato dall'MHC su un'altra cellula.

Ciò garantisce che venga attivata solo una cellula T con un TCR specifico per quel peptide. La cellula partner è di solito una cellula che presenta l'antigene come una cellula professionale che presenta l'antigene, di solito una cellula dendritica nel caso di risposte native, sebbene le cellule B e i macrofagi possano essere APC importanti. Secondo la presente invenzione, una molecola è in grado di legarsi a un bersaglio se ha un'affinità significativa per detto bersaglio predeterminato e si lega a detto bersaglio predeterminato in saggi standard. "Affinità" o "affinità di legame" viene spesso misurata dalla costante di dissociazione di equilibrio (D). Una molecola non è (sostanzialmente) in grado di legarsi a un bersaglio se non ha affinità significativa per detto bersaglio e non si lega in modo significativo a detto bersaglio in saggi standard.

I linfociti T citotossici possono essere generati in vivo incorporando un antigene o un suo frammento peptidico in cellule presentanti l'antigene in vivo. L'antigene o un suo frammento peptidico può essere rappresentato come proteina, come DNA (ad esempio all'interno di un vettore) o come RNA. L'antigene può essere elaborato per produrre un partner peptidico per la molecola MHC, mentre un suo frammento può essere presentato senza la necessità di ulteriore elaborazione. Quest'ultimo è il caso in particolare, se questi possono legarsi alle molecole MHC. In generale, è possibile la somministrazione a un paziente mediante iniezione intradermica. Tuttavia, l'iniezione può anche essere eseguita intranodalmente in un linfonodo (Maloy et al. (2001), Proc Natl Acad Sci USA 95: 3299-303). Le cellule risultanti presentano il complesso di interesse e sono riconosciute dai linfociti T citotossici autologhi che poi si propagano.

L'attivazione specifica delle cellule T CD4 + o CD8 + può essere rilevata in vari modi. I metodi per rilevare l'attivazione delle cellule T specifiche includono il rilevamento della proliferazione delle cellule T, la produzione di citochine (ad esempio, linfocine) o la generazione di attività citolitica. Per le cellule T CD4 +, un metodo preferito per rilevare l'attivazione delle cellule T specifiche è il rilevamento della proliferazione delle cellule T. Per le cellule T CD8 +, un metodo preferito per rilevare l'attivazione di cellule T specifiche è il rilevamento della generazione di attività citolitica.

Il termine "immunologicamente equivalente" significa che la molecola immunologicamente equivalente come la sequenza di amminoacidi

immunologicamente equivalente presenta le stesse o essenzialmente le stesse proprietà immunologiche e/o esercita gli stessi o essenzialmente gli stessi effetti immunologici, ad esempio, rispetto al tipo di l'effetto immunologico come l'induzione di una risposta immunitaria umorale e/o cellulare, la forza e/o la durata della reazione immunitaria indotta o la specificità della reazione immunitaria indotta. Nel contesto della presente invenzione, il termine "immunologicamente equivalente" è preferibilmente utilizzato rispetto agli effetti o alle proprietà immunologiche di un peptide utilizzato per l'immunizzazione. Ad esempio, una sequenza amminoacidica è immunologicamente equivalente a una sequenza amminoacidica di riferimento se detta sequenza amminoacidica quando esposta al sistema immunitario di un soggetto induce una reazione immunitaria avente una specificità di reagire con la sequenza amminoacidica di riferimento.

Il termine "funzioni effettrici immunitarie" nel contesto della presente invenzione include qualsiasi funzione mediata da componenti del sistema immunitario che si traduce, ad esempio, nell'uccisione di cellule tumorali o nell'inibizione della crescita tumorale e/o nell'inibizione del tumore sviluppo, compresa l'inibizione della diffusione del tumore e delle metastasi. Preferibilmente, le funzioni effettrici immunitarie nel contesto della presente invenzione sono funzioni effettrici mediate da cellule T. Tali funzioni comprendono nel caso di una cellula T helper (cellula T CD4+) il riconoscimento di un antigene o di un frammento di antigene nel contesto di molecole MHC di classe II da parte dei recettori delle cellule T, il rilascio di citochine e/o l'attivazione di linfociti CD8⁺ (CTL) e/o cellule B, e nel caso di CTL il riconoscimento di un antigene o di un frammento di antigene nel contesto di molecole MHC di classe I da parte dei recettori delle cellule T, l'eliminazione delle cellule presentate in il contesto delle molecole MHC di classe I, ovvero cellule caratterizzate dalla presentazione di un antigene con MHC di classe I, ad esempio, tramite apoptosi o lisi cellulare mediata dalla perforina, produzione di citochine come IFN- γ e TNF- α e citolitico specifico uccisione dell'antigene che esprime le cellule bersaglio.

In generale, le proteine espresse dalle cellule malate vengono valutate rispetto alla loro utilità in immunoterapia. Una proteina con utilità prevista per l'immunoterapia può essere utilizzata per fornire un vaccino comprendente la proteina o uno o più suoi frammenti peptidici, in particolare uno o più (potenziali) peptidi leganti MHC della proteina. Secondo l'invenzione, il termine "distribuzione" si riferisce a uno stato di localizzazione. Il termine "accertamento della distribuzione o della localizzazione", in particolare, comprende una determinazione o previsione dello stato di localizzazione, ad es. una determinazione o previsione della localizzazione subcellulare o dell'abbondanza di un peptide, proteina o acido nucleico come una determinazione o previsione se un peptide, una proteina o un acido nucleico è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno di esosomi in vivo. Termini come "prevedere", "prevedere" o "predizione" si riferiscono alla determinazione di una probabilità.

Prevedere l'utilità di una proteina o di un suo frammento espresso da cellule malate per l'immunoterapia può comprendere uno o più dei

seguenti: (i) accertare la distribuzione o la localizzazione della proteina o di un acido nucleico che la codifica, o di un frammento della proteina come accertare se la proteina o un acido nucleico che la codifica, o un frammento della proteina è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno di esosomi in vivo, (ii) accertare se la proteina o un suo frammento è cross-presentato da cellule presentanti l'antigene, preferibilmente cellule presentanti l'antigene professionale, (iii) accertare una risposta anticorpale esistente alla proteina o un suo frammento, (iv) accertare se la proteina o un suo frammento si lega all'actina F, (v) accertare se la proteina o un suo frammento si lega all'RNA. In modo opzionale, l'accertamento se una proteina o un acido nucleico che lo codifica, o un frammento della proteina è localizzato o abbondante all'interno di esosomi in vivo viene eseguito ottenendo un campione di fluidi extracellulari, isolando esosomi per esempio mediante centrifugazione differenziale, isolando proteine o acidi nucleici per esempio mediante elettroforesi su gel e identificando detta proteina o un suo frammento per esempio tramite spettrometria di massa, ELISA, citometria a flusso, array di anticorpi o western blotting o identificando un acido nucleico che codifica per detta proteina es. tramite microarray, sequenziamento dell'RNA o RT-PCR. In un'altra forma di realizzazione, l'accertamento se una proteina o un acido nucleico che lo codifica, o un frammento della proteina è localizzato o abbondante all'interno degli esosomi in vivo viene eseguito estraendo le informazioni da una base di dati che raccoglie i dati dagli esperimenti come descritto in questa sezione sopra come per esempio ExoCarta (eerthikumar, S, et al., J. Mol. Biol. 428, 688(2016)).

In modo opzionale, l'accertamento di una risposta anticorpale esistente può essere eseguito utilizzando SEREX. SEREX significa identificazione sierologica di antigeni mediante clonazione di espressione ricombinante ed è un metodo per identificare antigeni tumorali mediante screening di anticorpi da sieri di pazienti per il riconoscimento di una libreria di fago trasdotto da cDNA derivato dal tumore. Questa tecnica utilizza una libreria di visualizzazione dei fagi per esprimere un'ampia varietà di potenziali antigeni di un paziente. Gli antigeni vengono trasferiti su una superficie bidimensionale consentendo la loro mappatura su cloni specifici. La superficie viene incubata con sieri di pazienti autologhi. I cloni reattivi immunitari vengono localizzati, coltivati e sequenziati (Sahin, U, et al., PNAS 92, 11810 (1995)).

La presente invenzione può anche comprendere la rottura di sequenze proteiche in frammenti appropriati per il legame di MHC e l'accertamento dei punteggi per il legame dei frammenti a una o più molecole di MHC. Gli output possono essere classificati e possono consistere in un elenco di peptidi e dei loro punteggi previsti, indicando la loro probabilità di legame. In generale, le proteine secondo l'invenzione sono particolarmente utili per l'immunoterapia se contengono uno o più (potenziali) peptidi leganti MHC.

I metodi qui descritti possono essere eseguiti per un paziente come un malato di cancro, per esempio, su un campione di tumore di un paziente come un malato di cancro.

Una proteina o un frammento proteico qui descritto preferibilmente contiene almeno una modifica amminoacidica. Le modifiche amminoacidiche la cui utilità per l'immunoterapia deve essere determinata secondo la presente invenzione o che devono essere selezionate e/o classificate secondo la loro prevista immunogenicità secondo l'invenzione possono derivare da mutazioni nell'acido nucleico di una cellula. Tali mutazioni possono essere identificate mediante tecniche di sequenziamento note.

In modo opzionale, le mutazioni sono mutazioni somatiche specifiche del cancro in un campione di tumore di un malato di cancro che possono essere determinate identificando differenze di sequenza tra il genoma, l'esoma e/o il trascrittoma di un campione di tumore e il genoma, l'esoma e/o il trascrittoma di un campione non cancerogeno.

Un campione di tumore si riferisce a qualsiasi campione come un campione corporeo derivato da un paziente contenente o che ci si aspetta contenga cellule tumorali o cancerose. Il campione corporeo può essere qualsiasi campione di tessuto come sangue, un campione di tessuto ottenuto dal tumore primario o da metastasi tumorali o qualsiasi altro campione contenente cellule tumorali o cancerose. Preferibilmente, un campione corporeo è sangue e le mutazioni somatiche specifiche del cancro o le differenze di sequenza sono determinate in una o più cellule tumorali circolanti (CTC) contenute nel sangue. In un'altra forma di realizzazione, un campione di tumore si riferisce a uno o più tumori isolati o cellule cancerose come cellule tumorali circolanti (CTC) o un campione contenente uno o più tumori isolati o cellule cancerose come cellule tumorali circolanti (CTC).

Un campione non cancerogeno si riferisce a qualsiasi campione come un campione corporeo derivato da un paziente o da un altro individuo che preferibilmente è della stessa specie del paziente, preferibilmente un individuo sano che non contiene o non ci si aspetta che contenga cellule tumorali o cancerose. Il campione corporeo può essere un qualsiasi campione di tessuto come sangue o un campione di un tessuto non tumorale.

L'invenzione può comportare la determinazione della firma della mutazione del cancro di un paziente. Il termine "firma della mutazione del cancro" può riferirsi a tutte le mutazioni tumorali presenti in una o più cellule tumorali di un paziente o può riferirsi solo a una parte delle mutazioni tumorali presenti in una o più cellule tumorali di un paziente. Di conseguenza, la presente invenzione può comportare l'identificazione di tutte le mutazioni specifiche del cancro presenti in una o più cellule tumorali di un paziente o può comportare l'identificazione di solo una parte delle mutazioni specifiche del cancro presenti in una o più cellule tumorali di un paziente. In generale, i metodi dell'invenzione prevedono l'identificazione di un numero di mutazioni che fornisce un numero sufficiente di modifiche o proteine modificate da includere nei metodi dell'invenzione.

Preferibilmente, le mutazioni identificate secondo la presente invenzione sono mutazioni non sinonime, preferibilmente mutazioni non sinonime di proteine espresse in un tumore o in una cellula cancerosa.

In modo opzionale, le mutazioni somatiche specifiche del cancro o le differenze di sequenza sono determinate nel genoma, preferibilmente nell'intero genoma, di un campione di tumore. Pertanto, l'invenzione può comprendere l'identificazione della firma della mutazione del cancro del genoma, preferibilmente dell'intero genoma di una o più cellule tumorali. In modo opzionale, la fase di identificare mutazioni somatiche specifiche del cancro in un campione di tumore di un malato di cancro comprende l'identificazione del profilo di mutazione del cancro a livello di genoma. In modo opzionale, le mutazioni somatiche specifiche del cancro o le differenze di sequenza sono determinate nell'esoma, preferibilmente nell'intero esoma, di un campione di tumore. Pertanto, l'invenzione può comprendere l'identificazione della firma della mutazione del cancro dell'esoma, preferibilmente dell'intero esoma di una o più cellule tumorali. In modo opzionale, la fase di identificare mutazioni somatiche specifiche del cancro in un campione di tumore di un malato di cancro comprende l'identificazione del profilo di mutazione del cancro a livello di esoma.

In modo opzionale, le mutazioni somatiche specifiche del cancro o le differenze di sequenza sono determinate nel trascrittoma, preferibilmente nell'intero trascrittoma, di un campione di tumore. Pertanto, l'invenzione può comprendere l'identificazione della firma della mutazione del cancro del trascrittoma, preferibilmente dell'intero trascrittoma di una o più cellule tumorali. In modo opzionale, la fase di identificare mutazioni somatiche specifiche del cancro in un campione di tumore di un malato di cancro comprende l'identificazione del profilo di mutazione del cancro a livello di trascrittoma.

In modo opzionale, la fase di identificare mutazioni somatiche specifiche del cancro o identificare differenze di sequenza comprende il sequenziamento di una singola cellula di uno o più, preferibilmente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o anche più cellule tumorali. Pertanto, l'invenzione può comprendere l'identificazione di una firma di mutazione del cancro di dette una o più cellule tumorali. In modo opzionale, le cellule cancerose stanno circolando cellule tumorali. Le cellule cancerose come le cellule tumorali circolanti possono essere isolate prima del sequenziamento di singole cellule.

In modo opzionale, la fase di identificazione di mutazioni somatiche specifiche del cancro o di identificazione di differenze di sequenza implica l'uso di sequenziamento di nuova generazione (NGS).

In modo opzionale, la fase di identificare mutazioni somatiche specifiche del cancro o identificare differenze di sequenza comprende il sequenziamento del DNA genomico e/o dell'RNA del campione di tumore.

Per rivelare mutazioni somatiche specifiche del cancro o differenze di sequenza, le informazioni sulla sequenza ottenute dal campione di tumore vengono preferibilmente confrontate con un riferimento come le informazioni sulla sequenza ottenute dal sequenziamento dell'acido nucleico come il DNA o l'RNA di cellule normali non cancerose come le cellule germinali che possono essere ottenute dal paziente o da un individuo diverso.

In modo opzionale, il normale DNA germinale genomico è ottenuto da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC)

Il termine "genoma" si riferisce alla quantità totale di informazioni genetiche nei cromosomi di un organismo o di una cellula.

Il termine "esoma" si riferisce a una parte del genoma di un organismo formato da esoni, che codificano porzioni di geni espressi. L'esoma fornisce il modello genetico utilizzato nella sintesi di proteine e altri prodotti genici funzionali. È la parte funzionalmente più rilevante del genoma e, quindi, è più probabile che contribuisca al fenotipo di un organismo. Si stima che l'esoma del genoma umano costituisca l'1,5% del genoma totale (Ng, PC et al, PLoS Gen., 4 (8): 1-15, 2008).

Il termine "trascrittoma" si riferisce all'insieme di tutte le molecole di RNA, inclusi mRNA, rRNA, tRNA e altri RNA non codificanti prodotti in una cellula o in una popolazione di cellule. Nel contesto della presente invenzione per trascrittoma si intende l'insieme di tutte le molecole di RNA prodotte in una cellula, una popolazione di cellule, preferibilmente una popolazione di cellule cancerose, o tutte le cellule di un dato individuo in un certo momento.

Un "acido nucleico" è secondo l'invenzione preferibilmente acido desossiribonucleico (DNA) o acido ribonucleico (RNA), più preferibilmente RNA, più preferibilmente RNA trascritto in vitro (IVT RNA) o RNA sintetico. Gli acidi nucleici includono secondo l'invenzione DNA genomico, cDNA, mRNA, molecole prodotte in modo ricombinante e sintetizzate chimicamente. Secondo l'invenzione, un acido nucleico può essere presente come molecola a filamento singolo o doppio filamento e lineare o chiusa circolarmente in modo covalente. Un acido nucleico può, secondo l'invenzione, essere isolato. Il termine "acido nucleico isolato" significa, secondo l'invenzione, che l'acido nucleico (i) è stato amplificato in vitro, ad esempio tramite reazione a catena della polimerasi (PCR), (ii) è stato prodotto in modo ricombinante mediante clonazione, (iii) è stato purificato, ad esempio, mediante scissione e separazione mediante elettroforesi su gel, o (iv) è stato sintetizzato, ad esempio, mediante sintesi chimica. Un nucleico può essere impiegato per l'introduzione, cioè la trasfezione di, cellule, in particolare, sotto forma di RNA che può essere preparato mediante trascrizione in vitro da uno stampo di DNA.

L'RNA può inoltre essere modificato prima dell'applicazione stabilizzando le sequenze, il capping e la poliadenilazione.

Il termine "materiale genetico" si riferisce all'acido nucleico isolato, DNA o RNA, una sezione di una doppia elica, una sezione di un cromosoma o l'intero genoma di un organismo o di una cellula, in particolare il suo esoma o trascrittoma.

Il termine "mutazione" si riferisce a un cambiamento o differenza nella sequenza di acido nucleico (sostituzione, aggiunta o delezione nucleotidica) rispetto a un riferimento. Una "mutazione somatica" può verificarsi in qualsiasi cellula del corpo eccetto le cellule germinali (sperma e uovo) e quindi non viene trasmessa ai bambini. Queste alterazioni possono (ma non sempre) causare il cancro o altre malattie. Preferibilmente una mutazione è una

mutazione non sinonima. Il termine "mutazione non sinonima" si riferisce a una mutazione, preferibilmente una sostituzione nucleotidica, che si traduce in un cambiamento amminoacidico come una sostituzione amminoacidica nel prodotto di traduzione.

Il termine "mutazione" include mutazioni puntiformi, Indel, fusioni, cromotripsi e modifiche dell'RNA.

Il termine "Indel" descrive una classe di mutazione speciale, definita come una mutazione risultante in un'inserzione e delezione colocalizzate e un guadagno o una perdita netta di nucleotidi. Nelle regioni codificanti del genoma, a meno che la lunghezza di un indel non sia un multiplo di 3, producono una mutazione frameshift. Indels può essere contrastato con una mutazione puntiforme; dove un Indel inserisce ed elimina i nucleotidi da una sequenza, una mutazione puntiforme è una forma di sostituzione che sostituisce uno dei nucleotidi.

Le fusioni possono generare geni ibridi formati da due geni precedentemente separati. Può verificarsi come risultato di una traslocazione, delezione interstiziale o inversione cromosomica. Spesso i geni di fusione sono oncogeni. I geni di fusione oncogeni possono portare a un prodotto genico con una funzione nuova o diversa dai due partner di fusione. In alternativa, un proto-oncogene è fuso a un forte promotore, e quindi la funzione oncogenica è impostata per funzionare da una sovraregolazione causata dal forte promotore del partner di fusione a monte. I trascritti di fusione oncogenica possono anche essere causati da eventi di trans-splicing o read-through.

Il termine "cromotripsi" si riferisce a un fenomeno genetico mediante il quale regioni specifiche del genoma vengono frantumate e quindi unite insieme tramite un singolo evento devastante.

Il termine "modifica dell'RNA" o "modificazione dell'RNA" si riferisce a processi molecolari in cui il contenuto di informazioni in una molecola di RNA viene alterato attraverso un cambiamento chimico nella composizione della base. L'editing dell'RNA include modifiche nucleosidiche come deaminazioni da citidina (C) a uridina (U) e adenosina (A) in inosina (I), nonché aggiunte e inserzioni di nucleotidi non modellati. La modifica dell'RNA negli mRNA altera efficacemente la sequenza amminoacidica della proteina codificata in modo che differisca da quella prevista dalla sequenza del DNA genomico.

Il termine "firma di mutazione del cancro" si riferisce a un insieme di mutazioni che sono presenti nelle cellule tumorali rispetto alle cellule di riferimento non cancerose.

Un "riferimento" può essere utilizzato per correlare e confrontare i risultati di un campione di tumore. Tipicamente il "riferimento" può essere ottenuto sulla base di uno o più campioni normali, in particolare campioni che non sono affetti da una malattia cancerosa, ottenuti da un paziente o da uno o più individui diversi, preferibilmente individui sani, in particolare individui di la stessa specie. Un "riferimento" può essere determinato empiricamente testando un numero sufficientemente elevato di campioni normali.

Qualsiasi metodo di sequenziamento adatto può essere utilizzato secondo l'invenzione per determinare le mutazioni, essendo preferite le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS). I metodi di sequenziamento di terza generazione potrebbero sostituire la tecnologia NGS in futuro per accelerare la fase di sequenziamento del metodo. A scopo di chiarimento: i termini "Next Generation Sequencing" o "NGS" nel contesto della presente invenzione indicano tutte le nuove tecnologie di sequenziamento ad alto rendimento che, in contrasto con la metodologia di sequenziamento "convenzionale" nota come chimica di Sanger, leggono i modelli di acido nucleico in modo casuale parallelamente lungo l'intero genoma suddividendo l'intero genoma in piccoli pezzi. Tali tecnologie NGS (note anche come tecnologie di sequenziamento massivamente parallelo) sono in grado di fornire informazioni sulla sequenza di acido nucleico di un intero genoma, esoma, trascrittoma (tutte le sequenze trascritte di un genoma) o metiloma (tutte le sequenze metilate di un genoma) in tempi molto brevi periodi, ad es. entro 1-2 settimane, preferibilmente entro 1-7 giorni o più preferibilmente entro meno di 24 ore e consentire, in linea di principio, approcci di sequenziamento di cellule singole.

Piattaforme NGS multiple che sono disponibili in commercio o che sono menzionate in letteratura possono essere utilizzate nel contesto della presente invenzione per es. quelli descritti in dettaglio in Zhang et al. 2011: l'impatto del sequenziamento di nuova generazione sulla genomica. *J. Genet Genomics* 38 (3), 95-109; o in Voelkerding et al. 2009: Sequenziamento di nuova generazione: dalla ricerca di base alla diagnostica. *Chimica clinica* 55, 641-658. Esempi non limitativi di tali tecnologie/piattaforme NGS sono

1) La tecnologia di sequenziamento per sintesi nota come pirosequenziamento implementata ad es. nel GS-FLX 454 Genome Sequencer™ della società associata a Roche 454 Life Sciences (Branford, Connecticut), descritto per la prima volta in Ronaghi et al. 1998: un metodo di sequenziamento basato sul pirofosfato in tempo reale". *Science* 281 (5375), 363-365. Questa tecnologia utilizza una PCR in emulsione in cui le sfere di legame al DNA a filamento singolo vengono incapsulate mediante un vigoroso vortex in micelle acquose contenenti reagenti PCR circondate da olio per l'amplificazione PCR in emulsione. Durante il processo di pirosequenziamento, la luce emessa dalle molecole di fosfato durante l'incorporazione dei nucleotidi viene registrata mentre la polimerasi sintetizza il filamento di DNA.

2) Gli approcci di sequenziamento per sintesi sviluppati da Solexa (ora parte di Illumina Inc., San Diego, California) che si basa su terminatori di coloranti reversibili e implementato ad es. nell'Illumina/Solexa Genome Analyzer™ e nell'Illumina HiSeq 2000 Genome Analyzer™. In questa tecnologia, tutti e quattro i nucleotidi vengono aggiunti simultaneamente in frammenti di cluster oligo-innescati nei canali delle cellule a flusso insieme alla DNA polimerasi. L'amplificazione a ponte estende i filamenti del cluster con tutti e quattro i nucleotidi marcati in modo fluorescente per il sequenziamento.

3) Approcci di sequenziamento per legatura, ad es. implementato nella piattaforma SOLid™ di Applied Biosystems (ora Life

Technologies Corporation, Carlsbad, California). In questa tecnologia, un pool di tutti i possibili oligonucleotidi di lunghezza fissa vengono etichettati in base alla posizione sequenziata. Gli oligonucleotidi vengono ricotti e ligati; la legatura preferenziale con DNA ligasi per sequenze di corrispondenza risulta in un segnale informativo del nucleotide in quella posizione. Prima del sequenziamento, il DNA viene amplificato mediante PCR in emulsione. Le sfere risultanti, ciascuna contenente solo copie della stessa molecola di DNA, vengono depositate su un vetrino. Come secondo esempio, la piattaforma Polonator™ G.007 di Dover Systems (Salem, New Hampshire) impiega anche un approccio di sequenziamento mediante legatura utilizzando una PCR in emulsione a matrice casuale, basata su perline, per amplificare i frammenti di DNA per il sequenziamento parallelo.

4) Tecnologie di sequenziamento a molecola singola come ad es. implementato nel sistema PacBio RS di Pacific Biosciences (Menlo Park, California) o nella piattaforma HeliScope™ di Helicos Biosciences (Cambridge, Massachusetts). La caratteristica distintiva di questa tecnologia è la sua capacità di sequenziare singole molecole di DNA o RNA senza amplificazione, definita come sequenziamento del DNA Single-Molecule Real Time (SMRT). Ad esempio, HeliScope utilizza un sistema di rilevamento della fluorescenza altamente sensibile per rilevare direttamente ogni nucleotide mentre viene sintetizzato. Un approccio simile basato sul trasferimento di energia di risonanza di fluorescenza (FRET) è stato sviluppato da Visigen Biotechnology (Houston, Texas). Altre tecniche a molecola singola basate sulla fluorescenza provengono da U.S. Genomics (GeneEngine™) e Genovoxx (AnyGene™).

5) Nanotecnologie per il sequenziamento di singole molecole in cui vengono utilizzate varie nanostrutture quali ad es. disposti su un chip per monitorare il movimento di una molecola di polimerasi su un singolo filamento durante la replicazione. Esempi non limitativi di approcci basati sulle nanotecnologie sono la piattaforma GridON™ di Oxford Nanopore Technologies (Oxford, Regno Unito), le piattaforme di sequenziamento dei nano-pori assistito da ibridazione (HANS™) sviluppate da Nabsys (Providence, Rhode Island) e la piattaforma proprietaria di sequenziamento del DNA basata sulla ligasi con tecnologia DNA nanoball (DNB) denominata cPAL™ (combinatorial probe-anchor ligation).

6) Tecnologie basate sulla microscopia elettronica per il sequenziamento di singole molecole, ad es. quelli sviluppati da LightSpeed Genomics (Sunnyvale, California) e Halcyon Molecular (Redwood City, California)

7) Sequenziamento di semiconduttori ionici basato sulla rilevazione degli ioni idrogeno che vengono rilasciati durante la polimerizzazione del DNA. Ad esempio, Ion Torrent Systems (San Francisco, California) utilizza un array ad alta densità di pozzi micro-lavorati per eseguire questo processo biochimico in modo massicciamente parallelo. Ciascun pozzetto contiene un modello di DNA diverso. Sotto i pozzetti c'è uno strato sensibile agli ioni e sotto di esso un sensore ionico proprietario.

Preferibilmente, le preparazioni di DNA e RNA servono come materiale di partenza per NGS. Tali acidi nucleici possono essere facilmente

ottenuti da campioni come materiale biologico, ad es. da tessuti tumorali freschi, congelati istantaneamente o fissati in formalina inclusi in paraffina (FFPE) o da cellule isolate di recente o da CTC presenti nel sangue periferico dei pazienti. Il DNA genomico o RNA normale non mutato può essere estratto da tessuto somatico normale, tuttavia le cellule germinali sono preferite nel contesto della presente invenzione. Il DNA germinale o l'RNA possono essere estratti dalle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) in pazienti con neoplasie non ematologiche. Sebbene gli acidi nucleici estratti dai tessuti FFPE o da singole cellule isolate di recente siano altamente frammentati, sono adatti per applicazioni NGS.

In letteratura sono descritti diversi metodi NGS mirati per il sequenziamento dell'esoma (per la revisione vedere ad es. Teer e Mullikin 2010: Human Mol Genet 19 (2), R1 45-51), che possono essere tutti usati insieme alla presente invenzione. Molti di questi metodi (descritti ad esempio come cattura del genoma, partizionamento del genoma, arricchimento del genoma ecc.) Utilizzano tecniche di ibridazione e includono array-based (ad es. Hodges et al. 2007: Nat. Genet. 39, 1522-1527) e a base liquida (ad es. Choi et al. 2009: Proc. Natl. Acad. Sci USA 106, 19096-19101) approcci all'ibridazione. Sono disponibili anche kit commerciali per la preparazione del campione di DNA e la successiva cattura dell'esoma: ad esempio, Alumina Inc. (San Diego, California) offre il Kit di preparazione di campioni di DNA TruSeq™ e il Kit di arricchimento di esomi TruSeq™.

Al fine di ridurre il numero di risultati falsi positivi nel rilevare mutazioni somatiche specifiche del cancro o differenze di sequenza quando si confrontano ad es. dalla sequenza di un campione di tumore alla sequenza di un campione di riferimento come la sequenza di un campione di linea germinale, si preferisce determinare la sequenza in replicati di uno o entrambi questi tipi di campioni. Pertanto, è preferibile che la sequenza di un campione di riferimento come la sequenza di un campione di linea germinale sia determinata due volte, tre volte o più. In alternativa o in aggiunta, la sequenza di un campione di tumore viene determinata due, tre o più volte. Può anche essere possibile determinare la sequenza di un campione di riferimento come la sequenza di un campione di linea germinale e/o la sequenza di un campione di tumore più di una volta determinando almeno una volta la sequenza nel DNA genomico e determinando almeno una volta il sequenza in RNA di detto campione di riferimento e/o di detto campione di tumore. Ad esempio, determinando le variazioni tra le repliche di un campione di riferimento come un campione della linea germinale, è possibile stimare il tasso atteso di mutazioni somatiche di falsi positivi (FDR) come quantità statistica.

Le ripetizioni tecniche di un campione dovrebbero generare risultati identici e qualsiasi mutazione rilevata in questo "stesso confronto con lo stesso" è un falso positivo. In particolare, per determinare il tasso di false scoperte per il rilevamento di mutazioni somatiche in un campione di tumore rispetto a un campione di riferimento, una ripetizione tecnica del campione di riferimento può essere utilizzata come riferimento per stimare il numero di falsi positivi. Inoltre, varie metriche relative alla qualità (ad esempio copertura o qualità SNP) possono essere combinate in un unico

punteggio di qualità utilizzando un approccio di apprendimento automatico. Per una data variazione somatica possono essere conteggiate tutte le altre variazioni con un punteggio di qualità superiore, il che consente una classificazione di tutte le variazioni in un set di dati.

Il termine "RNA" si riferisce ad una molecola che comprende almeno un residuo ribonucleotidico ed è preferibilmente interamente o sostanzialmente composta da residui ribonucleotidici. "Ribonucleotide" si riferisce a un nucleotide con un gruppo idrossile nella posizione 2' di un gruppo β -D-ribofuranosile. Il termine "RNA" comprende RNA a doppio filamento, RNA a filamento singolo, RNA isolato come RNA parzialmente o completamente purificato, RNA essenzialmente puro, RNA sintetico e RNA generato in modo ricombinante come RNA modificato che differisce dall'RNA naturale per aggiunta, delezione, sostituzione e/o alterazione di uno o più nucleotidi. Tali alterazioni possono includere l'aggiunta di materiale non nucleotidico, come all'estremità o alle estremità di un RNA o internamente, per esempio a uno o più nucleotidi dell'RNA. I nucleotidi nelle molecole di RNA possono anche comprendere nucleotidi non standard, come nucleotidi non presenti in natura o nucleotidi o deossinucleotidi sintetizzati chimicamente.

Questi RNA alterati possono essere indicati come analoghi o analoghi dell'RNA naturale.

Il termine "RNA" include e preferibilmente si riferisce a "mRNA". Il termine "mRNA" significa "RNA messaggero" e si riferisce a un "trascritto" che viene generato utilizzando uno stampo di DNA e codifica un peptide o polipeptide. Tipicamente, un mRNA comprende un 5'-UTR, una regione codificante della proteina, un 3'-UTR e facoltativamente una coda poli (A). L'mRNA possiede solo un'emivita limitata nelle cellule e in vitro. Nel contesto della presente invenzione, l'mRNA può essere generato mediante trascrizione in vitro da uno stampo di DNA. La metodologia di trascrizione in vitro è nota alla persona esperta. Ad esempio, è disponibile in commercio una varietà di kit di trascrizione in vitro.

La stabilità e l'efficienza di traduzione dell'RNA possono essere modificate secondo necessità. Ad esempio, l'RNA può essere stabilizzato e la sua traduzione aumentata da una o più modifiche aventi effetti stabilizzanti e/o aumentando l'efficienza di traduzione dell'RNA. Tali modifiche sono descritte, ad esempio, in PCT/EP2006/009448 qui incorporato per riferimento. Per aumentare l'espressione dell'RNA utilizzato secondo la presente invenzione, esso può essere modificato all'interno della regione codificante, cioè la sequenza che codifica il peptide o la proteina espressa, preferibilmente senza alterare la sequenza del peptide o della proteina espressa, in modo da aumentare il contenuto di GC per aumentare la stabilità dell'mRNA e per eseguire un'ottimizzazione del codone e, quindi, migliorare la traduzione nelle cellule.

Il termine "modifica" nel contesto dell'RNA utilizzato nella presente invenzione include qualsiasi modifica di un RNA che non è naturalmente presente in detto RNA.

In modo opzionale, l'RNA utilizzato secondo l'invenzione non ha 5'-trifosfati senza cappuccio. La rimozione di tali 5'-trifosfati non coperti

può essere ottenuta trattando l'RNA con una fosfatasi.

L'RNA può avere ribonucleotidi modificati per aumentarne la stabilità e/o diminuire la citotossicità. Ad esempio, in modo opzionale, nell'RNA utilizzato secondo l'invenzione la 5-metilcitosina è sostituita parzialmente o completamente, preferibilmente completamente, alla citidina. In alternativa o in aggiunta, in modo opzionale, nell'RNA utilizzato secondo l'invenzione la pseudouridina è sostituita parzialmente o completamente, preferibilmente completamente, all'uridina.

In modo opzionale, il termine "modifica" si riferisce alla fornitura di un RNA con un analogo da 5' o da 5'. Il termine "5'-cap" si riferisce a una struttura del cappuccio che si trova all'estremità 5' di una molecola di mRNA e generalmente consiste in un nucleotide guanosina collegato all'mRNA tramite un insolito legame trifosfato da 5' a 5'. In modo opzionale, questa guanosina è metilata nella posizione 7. Il termine "5'-cap convenzionale" si riferisce a un cappuccio 5' di RNA presente in natura, preferibilmente al cappuccio 7-metilguanosina (m⁷G). Nel contesto della presente invenzione, il termine "cappuccio 5'" include un analogo cappuccio 5' che assomiglia alla struttura del cappuccio dell'RNA ed è modificato per possedere la capacità di stabilizzare l'RNA e/o migliorare la traduzione dell'RNA se collegato ad esso, preferibilmente in vivo e/o in una cellula.

Fornire un RNA con un analogo da 5' o da 5' può essere ottenuto mediante trascrizione in vitro di uno stampo di DNA in presenza di detto analogo da 5' o da 5', in cui detto 5'-cap è incorporato in co-trascrizione nel filamento di RNA generato, oppure l'RNA può essere generato, ad esempio, mediante trascrizione in vitro, e il tappo 5' può essere attaccato all'RNA dopo la trascrizione utilizzando enzimi di chiusura, ad esempio, enzimi di chiusura del virus del vaccino.

L'RNA può comprendere ulteriori modifiche. Ad esempio, un'ulteriore modifica dell'RNA utilizzato nella presente invenzione può essere un'estensione o un troncamento della coda di poli (A) presente in natura o un'alterazione delle regioni 5' o 3' non tradotte (UTR) come l'introduzione di un UTR che non è correlato alla regione codificante di detto RNA, ad esempio, lo scambio del 3'-UTR esistente con o l'inserimento di una o più, preferibilmente due copie di un 3'-UTR derivato da un gene globinico, come alfa2-globina, alfa-globina, beta-globina, preferibilmente beta-globina, più preferibilmente beta-globina umana.

L'RNA avente una sequenza poli-A non mascherata viene tradotto in modo più efficiente dell'RNA avente una sequenza poli-A mascherata. Il termine "coda poli (A)" o "sequenza poli-A" si riferisce a una sequenza di residui di adenile (A) che si trova tipicamente sull'estremità 3' di una molecola di RNA e "sequenza poli-A non mascherata" significa che la sequenza poli-A all'estremità 3' di una molecola di RNA termina con una A della sequenza poli-A e non è seguita da nucleotidi diversi da A situati all'estremità 3', cioè a valle, della sequenza poli-A. Inoltre, una lunga sequenza poli-A di circa 120 coppie di basi si traduce in una stabilità ottimale del trascritto e in un'efficienza di traduzione dell'RNA.

Pertanto, al fine di aumentare la stabilità e/o l'espressione dell'RNA utilizzato secondo la presente invenzione, può essere modificato in modo da essere presente in combinazione con una sequenza poli-A, preferibilmente avente una lunghezza da 10 a 500, più preferibilmente da 30 a 300, ancor più preferibilmente da 65 a 200 e specialmente da 100 a 150 residui di adenosina. Preferibilmente, la sequenza poli-A ha una lunghezza di circa 120 residui di adenosina. Per aumentare ulteriormente la stabilità e/o l'espressione dell'RNA utilizzato secondo l'invenzione, la sequenza poli-A può essere smascherata.

Inoltre, l'incorporazione di una regione 3'-non tradotta (UTR) nella regione 3'-non tradotta di una molecola di RNA può comportare un miglioramento dell'efficienza di traduzione. Un effetto sinergico può essere ottenuto incorporando due o più di tali regioni 3'-non tradotte. Le regioni 3'-non tradotte possono essere autologhe o eterologhe rispetto all'RNA in cui vengono introdotte. In una particolare forma di realizzazione la regione 3'-non tradotta è derivata dal gene della β -globina umana.

Una combinazione delle modifiche sopra descritte, ovvero l'incorporazione di una sequenza poli-A, lo smascheramento di una sequenza poli-A e l'incorporazione di una o più regioni 3'-non tradotte, ha un'influenza sinergica sulla stabilità dell'RNA e sull'aumento della traduzione efficienza.

Il termine "stabilità" dell'RNA si riferisce alla "emivita" dell'RNA. "Half-life" si riferisce al periodo di tempo necessario per eliminare metà dell'attività, quantità o numero di molecole. Nel contesto della presente invenzione, l'emivita di un RNA è indicativa per la stabilità di detto RNA. L'emivita dell'RNA può influenzare la "durata dell'espressione" dell'RNA. Ci si può aspettare che l'RNA con una lunga emivita venga espresso per un periodo di tempo prolungato.

Naturalmente, se secondo la presente invenzione si desidera diminuire la stabilità e/o l'efficienza di traduzione dell'RNA, è possibile modificare l'RNA in modo da interferire con la funzione degli elementi come descritto sopra aumentando la stabilità e/o l'efficienza di traduzione dell'RNA RNA.

Il termine "espressione" è usato secondo l'invenzione nel suo significato più generale e comprende la produzione di RNA e/o peptidi, polipeptidi o proteine, ad es. per trascrizione e/o traduzione. Per quanto riguarda l'RNA, il termine "espressione" o "traduzione" si riferisce in particolare alla produzione di peptidi, polipeptidi o proteine. Comprende anche l'espressione parziale di acidi nucleici. Inoltre, l'espressione può essere transitoria o stabile.

Il termine "espressione" include anche una "espressione aberrante" o "espressione anormale". "Espressione aberrante" o "espressione anormale" significa, secondo l'invenzione, che l'espressione è alterata, preferibilmente aumentata, rispetto a un riferimento, ad es. uno stato in un

soggetto che non ha una malattia associata all'espressione aberrante o anormale di una certa proteina, ad esempio un antigene tumorale. Un aumento dell'espressione si riferisce a un aumento di almeno il 10%, in particolare almeno il 20%, almeno il 50% o almeno il 100%, o più. In modo opzionale, l'espressione si trova solo in un tessuto malato, mentre l'espressione in un tessuto sano viene repressa.

Il termine "espressamente espresso" significa che una proteina è essenzialmente espressa solo in uno specifico tessuto o organo. Ad esempio, un antigene tumorale espressamente espresso nella mucosa gastrica significa che detta proteina è espressa principalmente nella mucosa gastrica e non è espressa in altri tessuti o non è espressa in misura significativa in altri tipi di tessuti o organi. Pertanto, una proteina espressa esclusivamente nelle cellule della mucosa gastrica e in misura significativamente minore in qualsiasi altro tessuto, come il testicolo, è espressamente espressa nelle cellule della mucosa gastrica. In modo opzionale, un antigene tumorale può anche essere specificamente espresso in condizioni normali in più di un tipo di tessuto o organo, come in 2 o 3 tipi di tessuto o organi, ma preferibilmente in non più di 3 diversi tipi di tessuto o organo. In questo caso, l'antigene tumorale viene quindi espressamente espresso in questi organi. Ad esempio, se un antigene tumorale è espresso in condizioni normali preferibilmente in misura approssimativamente uguale nel polmone e nello stomaco, detto antigene tumorale è espressamente espresso nel polmone e nello stomaco.

Il termine "trascrizione" si riferisce a un processo, in cui il codice genetico in una sequenza di DNA viene trascritto in RNA. Successivamente, l'RNA può essere tradotto in proteine. Il termine "trascrizione" comprende "trascrizione in vitro", in cui il termine "trascrizione in vitro" si riferisce a un processo in cui l'RNA, in particolare l'mRNA, è sintetizzato in vitro in un sistema privo di cellule, preferibilmente utilizzando estratti cellulari appropriati. Preferibilmente, i vettori di clonazione vengono applicati per la generazione di trascritti. Questi vettori di clonazione sono generalmente designati come vettori di trascrizione e secondo la presente invenzione sono compresi dal termine "vettore". Secondo la presente invenzione, l'RNA utilizzato nella presente invenzione è preferibilmente RNA trascritto in vitro (IVT-RNA) e può essere ottenuto mediante trascrizione in vitro di uno stampo di DNA appropriato. Il promotore per il controllo della trascrizione può essere qualsiasi promotore per qualsiasi RNA polimerasi.

Esempi particolari di RNA polimerasi sono le RNA polimerasi T7, T3 e SP6. Preferibilmente, la trascrizione in vitro secondo l'invenzione è controllata da un promotore T7 o SP6. Uno stampo di DNA per la trascrizione in vitro può essere ottenuto clonando un acido nucleico, in particolare cDNA, e introducendolo in un vettore appropriato per la trascrizione in vitro. Il cDNA può essere ottenuto mediante trascrizione inversa dell'RNA.

Il termine "traduzione" secondo l'invenzione si riferisce al processo nei ribosomi di una cellula mediante il quale un filamento di RNA

messaggero dirige l'assemblaggio di una sequenza di amminoacidi per formare un peptide, polipeptide o proteina.

Le sequenze di controllo dell'espressione o le sequenze regolatrici, che secondo l'invenzione possono essere collegate funzionalmente con un acido nucleico, possono essere omologhe o eterologhe rispetto all'acido nucleico. Una sequenza codificante e una sequenza regolatrice sono collegate insieme "funzionalmente" se sono legate insieme in modo covalente, in modo che la trascrizione o traduzione della sequenza codificante sia sotto il controllo o sotto l'influenza della sequenza regolatrice. Se la sequenza codificante deve essere tradotta in una proteina funzionale, con collegamento funzionale di una sequenza regolatrice con la sequenza codificante, l'induzione della sequenza regolatrice porta a una trascrizione della sequenza codificante, senza causare uno spostamento del frame di lettura nella sequenza codificante o incapacità della sequenza codificante di essere tradotta nella proteina o nel peptide desiderato.

Il termine "sequenza di controllo dell'espressione" o "sequenza regolatrice" comprende, secondo l'invenzione, promotori, sequenze leganti i ribosomi e altri elementi di controllo, che controllano la trascrizione di un acido nucleico o la traduzione dell'RNA derivato. In modo opzionale dell'invenzione, le sequenze di regolazione possono essere controllate. La struttura precisa delle sequenze regolatorie può variare a seconda della specie o del tipo di cellula, ma generalmente comprende sequenze 5 'non trascritte e 5' e 3 'non tradotte, che sono coinvolte nell'inizio della trascrizione o traduzione, come TATA-box, sequenza di copertura, sequenza CAAT e simili. In particolare, le sequenze regolatorie 5 'non trascritte comprendono una regione del promotore che include una sequenza del promotore per il controllo trascrizionale del gene funzionalmente legato. Le sequenze di regolazione possono anche comprendere sequenze di potenziamento o sequenze di attivatori a monte.

Preferibilmente, secondo l'invenzione, in detta cellula viene introdotto l'RNA da esprimere in una cellula. In modo opzionale dei metodi secondo l'invenzione, l'RNA che deve essere introdotto in una cellula è ottenuto mediante trascrizione in vitro di uno stampo di DNA appropriato.

Termini come "RNA in grado di esprimere" e "RNA codificante" sono usati in modo intercambiabile nel presente documento e rispetto a un particolare peptide o polipeptide significano che l'RNA, se presente nell'ambiente appropriato, preferibilmente all'interno di una cellula, può essere espresso per produrre detto peptide o polipeptide. Preferibilmente, l'RNA è in grado di interagire con il macchinario di traduzione cellulare per fornire il peptide o polipeptide che è in grado di esprimere. Termini come "trasferimento", "introduzione" o "trasfezione" sono qui usati in modo intercambiabile e si riferiscono all'introduzione di acidi nucleici, in particolare acidi nucleici esogeni o eterologhi, in particolare RNA in una cellula. Secondo la presente invenzione, la cellula può far parte di un organo, un tessuto e/o un organismo. Secondo la presente invenzione, la somministrazione di un acido nucleico viene ottenuta come acido nucleico nudo o in combinazione con un reagente di somministrazione.

Preferibilmente, la somministrazione di acidi nucleici è sotto forma di acidi nucleici nudi. Preferibilmente, l'RNA viene somministrato in

combinazione con sostanze stabilizzanti come gli inibitori della RNasi. La presente invenzione prevede anche l'introduzione ripetuta di acidi nucleici nelle cellule per consentire un'espressione sostenuta per periodi di tempo prolungati. Le cellule possono essere trasfettate con qualsiasi trasportatore a cui l'RNA può essere associato, ad es. formando complessi con l'RNA o formando vescicole in cui l'RNA è racchiuso o incapsulato, con conseguente maggiore stabilità dell'RNA rispetto all'RNA nudo. I veicoli utili secondo l'invenzione includono, ad esempio, veicoli contenenti lipidi come lipidi cationici, liposomi, in particolare liposomi cationici, micelle e nanoparticelle. I lipidi cationici possono formare complessi con acidi nucleici caricati negativamente. Qualsiasi lipide cationico può essere utilizzato secondo l'invenzione. Preferibilmente, l'introduzione di RNA che codifica un peptide o polipeptide in una cellula, in particolare in una cellula presente in vivo, determina l'espressione di detto peptide o polipeptide nella cellula.

In particolari forme di realizzazione, è preferito il targeting degli acidi nucleici a particolari cellule. In tali forme di realizzazione, un veicolo che viene applicato per la somministrazione dell'acido nucleico a una cellula (ad esempio, un retrovirus o un liposoma), mostra una molecola di targeting. Ad esempio, una molecola come un anticorpo che è specifico per una proteina di membrana di superficie sulla cellula bersaglio o un legante per un recettore sulla cellula bersaglio può essere incorporata nel veicolo di acido nucleico o può essere legato ad esso. Nel caso in cui l'acido nucleico venga somministrato dai liposomi, le proteine che si legano a una proteina della membrana superficiale associata all'endocitosi possono essere incorporate nella formulazione del liposoma per consentire il targeting e/o l'assorbimento. Tali proteine comprendono proteine del capsido di loro frammenti che sono specifici per un particolare tipo di cellula, anticorpi contro proteine che sono interiorizzate, proteine che prendono di mira una posizione intracellulare ecc.

Il termine "cellula" o "cellula ospite" è preferibilmente una cellula intatta, cioè una cellula con una membrana intatta che non ha rilasciato i suoi normali componenti intracellulari come enzimi, organelli o materiale genetico. Una cellula intatta è preferibilmente una cellula vitale, cioè una cellula vivente in grado di svolgere le sue normali funzioni metaboliche. Preferibilmente detto termine si riferisce secondo l'invenzione a qualsiasi cellula che può essere trasformata o trasfettata con un acido nucleico esogeno. Il termine "cellula" include, secondo l'invenzione, cellule procariotiche (ad es. E. coli) o cellule eucariotiche (ad es. Cellule dendritiche, cellule B, cellule CHO, cellule COS, cellule K562, cellule HEK293, cellule HELA, cellule di lievito e cellule di insetti). L'acido nucleico esogeno può essere trovato all'interno della cellula (i) liberamente disperso come tale, (ii) incorporato in un vettore ricombinante, o (iii) integrato nel genoma della cellula ospite o nel DNA mitocondriale. Le cellule di mammiferi sono particolarmente preferite, come le cellule di esseri umani, topi, criceti, maiali, capre e primati.

Le cellule possono essere derivate da un gran numero di tipi di tessuto e includono cellule primarie e linee cellulari. Esempi specifici includono cheratinociti, leucociti del sangue periferico, cellule staminali del midollo osseo e cellule staminali embrionali. In ulteriori forme di

realizzazione, la cellula è una cellula che presenta l'antigene, in particolare una cellula dendritica, un monocita o un macrofago.

Una cellula che comprende una molecola di acido nucleico preferibilmente esprime il peptide o il polipeptide codificato dall'acido nucleico.

Il termine "espansione clonale" si riferisce a un processo in cui un'entità specifica viene moltiplicata. Nel contesto della presente invenzione, il termine è preferibilmente utilizzato nel contesto di una risposta immunologica in cui i linfociti sono stimolati da un antigene, proliferano e il linfocita specifico che riconosce detto antigene è amplificato. Preferibilmente, l'espansione clonale porta alla differenziazione dei linfociti.

Termini come "riduzione" o "inibizione" si riferiscono alla capacità di causare una diminuzione complessiva, preferibilmente del 5% o superiore, del 10% o superiore, del 20% o superiore, più preferibilmente del 50% o superiore e più preferibilmente del 75% o superiore, nel livello. Il termine "inibire" o frasi simili include un'inibizione completa o essenzialmente completa, cioè una riduzione a zero o essenzialmente a zero.

Termini come "aumento", "miglioramento", "promozione" o "prolungamento" si riferiscono preferibilmente a un aumento, miglioramento, promozione o prolungamento di circa almeno il 10%, preferibilmente almeno il 20%, preferibilmente almeno il 30%, preferibilmente a almeno il 40%, preferibilmente almeno il 50%, preferibilmente almeno l'80%, preferibilmente almeno il 100%, preferibilmente almeno il 200% e in particolare almeno il 300%. Questi termini possono anche riferirsi a un aumento, miglioramento, promozione o prolungamento da zero o da un livello non misurabile o non rilevabile a un livello superiore a zero o un livello misurabile o rilevabile.

La presente invenzione prevede vaccini come vaccini contro il cancro progettati sulla base di proteine preferibilmente modificate o frammenti di proteine o modificazioni di amminoacidi predette utili nell'immunoterapia mediante i metodi della presente invenzione.

Il termine "vaccino" si riferisce a una preparazione farmaceutica (composizione farmaceutica) o un prodotto che in seguito alla somministrazione induce una risposta immunitaria, in particolare una risposta immunitaria cellulare, che riconosce e attacca un agente patogeno o una cellula malata come un cancro cellula. Un vaccino può essere utilizzato per la prevenzione o il trattamento di una malattia. Il termine "vaccino antitumorale personalizzato" o "vaccino antitumorale individualizzato" riguarda un particolare malato di cancro e significa che un vaccino antitumorale è adattato alle esigenze o circostanze speciali di un singolo malato di cancro.

In modo opzionale, un vaccino fornito secondo l'invenzione può comprendere un peptide o polipeptide comprendente una o più modifiche amminoacidiche o uno o più peptidi modificati previsti come utili in immunoterapia mediante i metodi dell'invenzione o un acido nucleico, preferibilmente RNA, codificare detto peptide o polipeptide.

I vaccini antitumorali forniti secondo l'invenzione quando somministrati secondo un brevetto preferibilmente forniscono uno o più epitopi di cellule T adatti per stimolare, innescare e/o espandere cellule T specifiche per cellule malate del paziente come il tumore del paziente. Le cellule T sono preferibilmente dirette contro le cellule che esprimono antigeni da cui derivano gli epitopi delle cellule T. I vaccini qui descritti sono preferibilmente in grado di indurre o promuovere una risposta cellulare, preferibilmente attività delle cellule T citotossiche, contro una malattia cancerosa caratterizzata dalla presentazione di uno o più neo-antigeni associati al tumore con MHC di classe I. Un vaccino mirato a mutazioni specifiche del cancro sarà specifico per il tumore del paziente.

Un vaccino fornito secondo l'invenzione si riferisce a un vaccino che, quando somministrato a un brevetto, fornisce preferibilmente uno o più epitopi delle cellule T, come 2 o più, 5 o più, 10 o più, 15 o più, 20 o più, 25 o più, 30 o più e preferibilmente fino a 60, fino a 55, fino a 50, fino a 45, fino a 40, fino a 35 o fino a 30 epitopi delle cellule T, che incorporano modificazioni di amminoacidi o peptidi modificati predetti come immunogenici da i metodi dell'invenzione. Tali epitopi dei linfociti T sono anche qui chiamati "neoepitopi". La presentazione di questi epitopi da parte delle cellule di un paziente, in particolare le cellule che presentano l'antigene, si traduce preferibilmente in cellule T che prendono di mira gli epitopi quando sono legate a MHC e quindi, il tumore del paziente, preferibilmente il tumore primario così come le metastasi tumorali, che esprimono. Gli epitopi delle cellule T sono derivati e presentano gli stessi epitopi sulla superficie delle cellule tumorali.

I metodi qui descritti possono comprendere l'ulteriore fase di determinare l'usabilità delle modificazioni amminoacidiche identificate o dei peptidi modificati per la vaccinazione contro il cancro. Pertanto, ulteriori passaggi possono comportare uno o più dei seguenti: (i) valutare se le modifiche si trovano in epitopi presentati da MHC noti o previsti, (ii) test in vitro e/o in silico se le modifiche si trovano negli epitopi presentati da MHC, per esempio testare se le modifiche fanno parte di sequenze peptidiche che vengono elaborate e/o presentate come epitopi presentati da MHC, e (iii) test in vitro se gli epitopi modificati previsti, in particolare quando presenti nel loro contesto di sequenza naturale, ad es. quando sono affiancati da sequenze di amminoacidi che fiancheggiano anche detti epitopi nella proteina presente in natura, e quando espressi in cellule presentanti l'antigene sono in grado di stimolare le cellule T come le cellule T del paziente aventi la specificità desiderata. Tali sequenze fiancheggianti ciascuna può comprendere 3 o più, 5 o più, 10 o più, 15 o più, 20 o più e preferibilmente fino a 50, fino a 45, fino a 40, fino a 35 o fino a 30 amminoacidi e possono fiancheggiano la sequenza epitopica N-terminale e/o C-terminale.

I peptidi modificati determinati secondo l'invenzione possono essere classificati per la loro utilizzabilità come epitopi per la vaccinazione contro il cancro. Pertanto, in un aspetto, l'invenzione comprende un processo analitico manuale o basato su computer in cui i peptidi modificati identificati vengono analizzati e selezionati per la loro utilizzabilità nel rispettivo vaccino da fornire. Preferibilmente, detto processo analitico è un

processo basato su algoritmo di calcolo. Preferibilmente, detto processo analitico comprende determinare e/o classificare gli epitopi secondo una previsione della loro capacità di essere immunogenici.

I neoepitopi identificati secondo l'invenzione e forniti da un vaccino dell'invenzione sono preferibilmente presenti sotto forma di un polipeptide comprendente detti neoepitopi come un polipeptide polipeptidico o un acido nucleico, in particolare RNA, codificante detto polipeptide. Inoltre, i neo-epitopi possono essere presenti nel polipeptide sotto forma di una sequenza vaccinale, cioè presenti nel loro contesto di sequenza naturale, ad es. affiancato da sequenze di amminoacidi che fiancheggiano anche detti epitopi nella proteina naturale. Tali sequenze fiancheggiatrici ciascuna può comprendere 5 o più, 10 o più, 15 o più, 20 o più e preferibilmente fino a 50, fino a 45, fino a 40, fino a 35 o fino a 30 amminoacidi e possono fiancheggiare la sequenza epitopica N-terminale e/o C-terminale. Pertanto, una sequenza di vaccino può comprendere 20 o più, 25 o più, 30 o più, 35 o più, 40 o più e preferibilmente fino a 50, fino a 45, fino a 40, fino a 35 o fino a 30 amminoacidi. In modo opzionale, i neoepitopi e/o le sequenze di vaccino sono allineate nel polipeptide dalla testa alla coda.

In modo opzionale, i neoepitopi e/o le sequenze di vaccino sono distanziate da linker, in particolare linker neutri. Il termine "linker" secondo l'invenzione si riferisce a un peptide aggiunto tra due domini peptidici come epitopi o sequenze di vaccini per connettere detti domini peptidici. Non ci sono limitazioni particolari per quanto riguarda la sequenza del linker. Tuttavia, è preferibile che la sequenza del linker riduca l'ostacolo sterico tra i due domini peptidici, sia ben tradotta e supporti o consenta l'elaborazione degli epitopi. Inoltre, il linker non dovrebbe avere o solo pochi elementi di sequenza immunogenica. I linker preferibilmente non dovrebbero creare neoepitopi non endogeni come quelli generati dalla sutura di giunzione tra neoepitopi adiacenti, che potrebbero generare reazioni immunitarie indesiderate. Pertanto, il vaccino poliepitopico dovrebbe preferibilmente contenere sequenze di linker che sono in grado di ridurre il numero di epitopi di giunzione di legame MHC indesiderati. Hoyt et al. (EMBO J. 25 (8), 1720-9, 2006) e Zhang et al. (J. Biol. Chem., 279 (10), 8635-41, 2004) hanno dimostrato che le sequenze ricche di glicina compromettono l'elaborazione proteosomiale e quindi l'uso di sequenze di linker ricche di glicina agisce per ridurre al minimo il numero di peptidi contenuti nel linker che possono essere processati dal proteasoma. Inoltre, è stato osservato che la glicina inibisce un forte legame nelle posizioni del solco di legame dell'MHC (Abastado et al, J. Immunol. 151(7), 3569-75, 1993). Schlessinger et al. (Proteins, 61 (1), 115-26, 2005) avevano scoperto che gli amminoacidi glicina e serina inclusi in una sequenza di amminoacidi producono una proteina più flessibile che viene tradotta ed elaborata in modo più efficiente dal proteasoma, consentendo un migliore accesso al codificato neoepitopi. Ciascun linker può comprendere 3 o più, 6 o più, 9 o più, 10 o più, 15 o più, 20 o più e preferibilmente fino a 50, fino a 45, fino a 40, fino a 35 o fino a 30 amminoacidi. Preferibilmente il linker è arricchito in amminoacidi glicina e/o serina. Preferibilmente, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90% o almeno

il 95% degli amminoacidi del linker sono glicina e/o serina.

Preferibilmente, un linker è sostanzialmente composto dagli amminoacidi glicina e serina. In modo opzionale, il linker comprende la sequenza amminoacidica (GGS) a (GSS) b (GGG) c (SSG) d (GSG) e dove a, b, c, d ed e è indipendentemente un numero selezionato da 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 e dove a + b + c + d + e sono diversi da 0 e preferibilmente sono 2 o più, 3 o più, 4 o più o 5 o più. In modo opzionale, il linker comprende una sequenza come qui descritta includendo le sequenze di linker descritte negli esempi come la sequenza GGSGGGGSG. Preferibilmente, un polipeptide che incorpora uno o più neo-epitopi come un polipeptide polipeptopico secondo la presente invenzione viene somministrato a un paziente sotto forma di un acido nucleico, preferibilmente RNA come RNA trascritto in vitro o sintetico, che può essere espresso nelle cellule di un paziente come le cellule che presentano l'antigene per produrre il polipeptide. La presente invenzione prevede anche la somministrazione di uno o più polipeptidi multiepitopici che ai fini della presente invenzione sono compresi dal termine "polipeptide polipeptopico", preferibilmente sotto forma di un acido nucleico, preferibilmente RNA come RNA trascritto in vitro o sintetico, che può essere espresso nelle cellule di un paziente come le cellule che presentano l'antigene per produrre uno o più polipeptidi. In caso di somministrazione di più di un polipeptide multiepitopico i neoepitopi forniti dai diversi polipeptidi multiepitopici possono essere differenti o parzialmente sovrapposti. Una volta presente nelle cellule di un paziente come le cellule presentanti l'antigene, il polipeptide secondo l'invenzione viene processato per produrre i neoepitopi identificati secondo l'invenzione. La somministrazione di un vaccino fornito secondo l'invenzione fornisce preferibilmente epitopi presentati in classe I MHC che sono in grado di suscitare una risposta di cellule T helper CD8 + contro cellule che esprimono antigeni da cui derivano gli epitopi presentati da MHC. La somministrazione di un vaccino fornito secondo l'invenzione può anche fornire epitopi MHC presentati di classe II che sono in grado di suscitare una risposta delle cellule T CD4 + contro cellule che esprimono antigeni da cui derivano gli epitopi presentati da MHC. Inoltre, la somministrazione di un vaccino fornito secondo l'invenzione può fornire uno o più neoepitopi (inclusi neoepitopi noti e neoepitopi identificati secondo l'invenzione) nonché uno o più epitopi non contenenti mutazioni somatiche specifiche del cancro ma espresso da cellule cancerose e preferibilmente inducendo una risposta immunitaria contro le cellule tumorali, preferibilmente una risposta immunitaria specifica per il cancro.

Il vaccino fornito secondo l'invenzione può essere un vaccino ricombinante.

Il termine "ricombinante" nel contesto della presente invenzione significa "prodotto mediante ingegneria genetica". Preferibilmente, una "entità ricombinante" come un polipeptide ricombinante nel contesto della presente invenzione non si verifica naturalmente, e preferibilmente è il risultato di una combinazione di entità come sequenze di amminoacidi o acidi nucleici che non sono combinate in natura. Ad esempio, un polipeptide

ricombinante nel contesto della presente invenzione può contenere diverse sequenze di amminoacidi come neo-epitopi o sequenze di vaccini derivate da differenti proteine o differenti porzioni della stessa proteina fuse insieme, ad esempio, da legami peptidici o linker appropriati.

Il termine "presente in natura" come qui utilizzato si riferisce al fatto che un oggetto può essere trovato in natura. Ad esempio, un peptide o acido nucleico che è presente in un organismo (compresi i virus) e può essere isolato da una fonte in natura e che non è stato intenzionalmente modificato dall'uomo in laboratorio è presente in natura.

Gli agenti e le composizioni qui descritti possono essere usati per trattare un soggetto con una malattia, ad esempio una malattia caratterizzata dalla presenza di cellule malate che esprimono un antigene e che ne presentano un frammento. Le malattie particolarmente preferite sono le malattie del cancro. Gli agenti e le composizioni qui descritti possono anche essere usati per l'immunizzazione o la vaccinazione per prevenire una malattia qui descritta.

Il termine "malattia" si riferisce a una condizione anormale che colpisce il corpo di un individuo. Una malattia è spesso interpretata come una condizione medica associata a sintomi e segni specifici. Una malattia può essere causata da fattori originari di una fonte esterna, come una malattia infettiva, oppure può essere causata da disfunzioni interne, come malattie autoimmuni. Negli esseri umani, la parola "malattia" è spesso usata in modo più ampio per riferirsi a qualsiasi condizione che causa dolore, disfunzione, angoscia, problemi sociali o morte all'individuo affetto, o problemi simili per coloro che sono in contatto con l'individuo. In questo senso più ampio, a volte include lesioni, disabilità, disturbi, sindromi, infezioni, sintomi isolati, comportamenti devianti e variazioni atipiche di struttura e funzione, mentre in altri contesti e per altri scopi questi possono essere considerati categorie distinguibili. Le malattie di solito colpiscono gli individui non solo fisicamente, ma anche emotivamente, poiché contrarre e convivere con molte malattie può alterare la propria prospettiva sulla vita e la propria personalità.

Il termine "normale" si riferisce allo stato sano o alle condizioni in un soggetto o tessuto sano, cioè condizioni non patologiche, in cui "sano" preferibilmente significa non canceroso. Il termine "malattia associata a un antigene" o "malattia che coinvolge un antigene" si riferisce a qualsiasi malattia che implichi un antigene, ad es. una malattia caratterizzata dalla presenza di uno o più antigeni che esprimono un antigene. La malattia che coinvolge un antigene può essere una malattia infettiva, una malattia autoimmune o una malattia tumorale o semplicemente un cancro. Come menzionato sopra, l'antigene può essere un antigene associato alla malattia, come un antigene associato al tumore, un antigene virale o un antigene batterico.

"Malattia che coinvolge cellule che esprimono un antigene" significa, secondo l'invenzione, che viene rilevata l'espressione dell'antigene nelle cellule di un tessuto o organo malato. L'espressione nelle cellule di un tessuto o di un organo malato può essere aumentata rispetto allo stato in

un tessuto o organo sano. Un aumento si riferisce a un aumento di almeno il 10%, in particolare almeno il 20%, almeno il 50%, almeno il 100%, almeno il 200%, almeno il 500%, almeno il 1000%, almeno il 10000% o anche Di Più. In modo opzionale, l'espressione si trova solo in un tessuto malato, mentre l'espressione in un tessuto sano viene repressa. Secondo l'invenzione, le malattie che coinvolgono o sono associate a cellule che esprimono un antigene includono le malattie del cancro.

Il termine "malattia infettiva" si riferisce a qualsiasi malattia che può essere trasmessa da individuo a individuo o da organismo a organismo ed è causata da un agente microbico (ad es. Raffreddore comune). Le malattie infettive sono note nell'arte e includono, per esempio, una malattia virale, una malattia batterica o una malattia parassitaria, le quali malattie sono causate rispettivamente da un virus, un batterio e un parassita. A questo proposito, la malattia infettiva può essere, ad esempio, epatite, malattie a trasmissione sessuale (es. Clamidia o gonorrea), tubercolosi, HIV/sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), difterite, epatite B, epatite C, colera, respirazione acuta grave sindrome (S ARS), influenza aviaria e influenza.

Il termine "malattia autoimmune" si riferisce a qualsiasi malattia in cui il corpo produce una risposta immunogenica (cioè sistema immunitario) a qualche costituente del proprio tessuto. In altre parole, il sistema immunitario perde la sua capacità di riconoscere alcuni tessuti o sistemi all'interno del corpo come sé e bersaglio e lo attacca come se fosse estraneo. Le malattie autoimmuni possono essere classificate in quelle in cui è colpito prevalentemente un organo (ad es. Anemia emolitica e tiroidite anti-immunitaria) e quelle in cui il processo della malattia autoimmune è diffuso attraverso molti tessuti (ad es. Ad esempio, si pensa che la sclerosi multipla sia causata da cellule T che attaccano le guaine che circondano le fibre nervose del cervello e del midollo spinale. Ciò si traduce in perdita di coordinazione, debolezza e visione offuscata. Le malattie autoimmuni sono note nell'arte e includono, ad esempio, tiroidite di Hashimoto, morbo di Grave, lupus, sclerosi multipla, artrite reumatica, anemia emolitica, tiroidite antiimmune, lupus eritematoso sistemico, celiachia, morbo di Crohn, colite, diabete, sclerodermia, psoriasi e simili.

I termini "malattia del cancro" o "cancro" si riferiscono o descrivono la condizione fisiologica in un individuo che è tipicamente caratterizzato da una crescita cellulare non regolata. Esempi di tumori includono, ma non sono limitati a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Più in particolare, esempi di tali tumori includono cancro alle ossa, cancro al sangue cancro ai polmoni, cancro al fegato, cancro al pancreas, cancro della pelle, cancro della testa o del collo, melanoma cutaneo o intraoculare, cancro uterino, cancro ovarico, cancro del retto, cancro dell'ano regione, cancro allo stomaco, cancro al colon, cancro al seno, cancro alla prostata, cancro uterino, carcinoma degli organi sessuali e riproduttivi, morbo di Hodgkin, cancro dell'esofago, cancro dell'intestino tenue, cancro del sistema endocrino, cancro della ghiandola tiroidea, cancro della ghiandola paratiroidea, cancro della ghiandola surrenale, sarcoma dei tessuti molli, cancro della vescica, cancro del rene, carcinoma a cellule

renali, carcinoma della pelvi renale, neoplasie del sistema nervoso centrale (SNC), cancro neuroectodermico, tumori dell'asse spinale, glioma, meningioma e adenoma ipofisario.

Il termine "cancro" comprende anche metastasi tumorali.

Il termine "tumore" o "malattia tumorale" si riferisce ad una crescita anormale di cellule (chiamate cellule neoplastiche, cellule tumorigene o cellule tumorali) che formano preferibilmente un rigonfiamento o una lesione. Per "cellula tumorale" si intende una cellula anormale che cresce per una proliferazione cellulare rapida e incontrollata e continua a crescere dopo che gli stimoli che hanno avviato la nuova crescita cessano. I tumori mostrano una mancanza parziale o totale di organizzazione strutturale e coordinazione funzionale con il tessuto normale e di solito formano una massa distinta di tessuto, che può essere benigna, pre-maligna o maligna.

I termini "cancro" e "malattia da cancro" sono usati in modo intercambiabile con i termini "tumore" e "malattia tumorale".

Per "metastasi" si intende la diffusione delle cellule cancerose dal suo sito originale ad un'altra parte del corpo. La formazione di metastasi è un processo molto complesso e dipende dal distacco delle cellule maligne dal tumore primario, dall'invasione della matrice extracellulare, dalla penetrazione delle membrane basali endoteliali per entrare nella cavità corporea e nei vasi, e quindi, dopo essere state trasportate dal sangue, infiltrazione di organi bersaglio. Infine, la crescita di un nuovo tumore, cioè un tumore secondario o metastatico, nel sito target dipende dall'angiogenesi. Le metastasi tumorali si verificano spesso anche dopo la rimozione del tumore primario perché le cellule o componenti del tumore possono rimanere e sviluppare un potenziale metastatico. In modo opzionale, il termine "metastasi" secondo l'invenzione si riferisce a "metastasi a distanza" che si riferisce a una metastasi che è lontana dal tumore primario e dal sistema linfonodale regionale.

Le cellule di un tumore secondario o metastatico sono come quelle del tumore originale. Ciò significa, ad esempio, che, se il cancro ovarico metastatizza al fegato, il tumore secondario è costituito da cellule ovariche anormali, non da cellule epatiche anormali. Il tumore nel fegato viene quindi chiamato cancro ovarico metastatico, non cancro al fegato.

Il termine "cellule tumorali circolanti" o "CTC" si riferisce a cellule che si sono staccate da un tumore primario o metastasi tumorali e circolano nel flusso sanguigno. Le CTC possono costituire i semi per la successiva crescita di ulteriori tumori (metastasi) in diversi tessuti. Le cellule tumorali circolanti si trovano a frequenze nell'ordine di 1-10 CTC per mL di sangue intero in pazienti con malattia metastatica. Sono stati sviluppati metodi di ricerca per isolare CTC. Diversi metodi di ricerca sono stati descritti nell'arte per isolare le CTC, ad es. tecniche che sfruttano il fatto che le cellule epiteliali esprimono comunemente la proteina di adesione cellulare EpCAM, assente nelle cellule del sangue normali. La cattura immunomagnetica basata su microsfele comporta il trattamento di campioni di sangue con anticorpi contro EpCAM che è stato coniugato con

particelle magnetiche, seguito dalla separazione delle cellule contrassegnate in un campo magnetico. Le cellule isolate vengono quindi colorate con l'anticorpo verso un altro marker epiteliale, la citocheratina, nonché un comune marker leucocitario CD45, in modo da distinguere le CTC rare dai globuli bianchi contaminanti.

Questo approccio robusto e semi-automatizzato identifica le CTC con una resa media di circa 1 CTC/mL e una purezza dello 0,1% (Allard et al, 2004: Clin Cancer Res 10, 6897-6904). Un secondo metodo per isolare le CTC utilizza un dispositivo di cattura CTC basato su microfluidica che prevede il flusso di sangue intero attraverso una camera incorporata con 80.000 micropost che sono stati resi funzionali mediante rivestimento con anticorpo a EpCAM. Le CTC vengono quindi colorate con anticorpi secondari contro citocheratina o marker tissutali specifici, come PSA nel cancro alla prostata o HER2 nel cancro al seno e vengono visualizzate mediante scansione automatizzata di micropost su più piani lungo coordinate tridimensionali. I chip CTC sono in grado di identificare le cellule tumorali circolanti positive alla citocherizzazione in pazienti con una resa mediana di 50 cellule/ml e una purezza compresa tra 1 e 80% (Nagrath et al, 2007: Nature 450, 1235-1239). Un'altra possibilità per isolare le CTC è l'utilizzo del test CellSearch™ Circulating Tumor Cell (CTC) di Veridex, LLC (Raritan, NJ) che cattura, identifica e conta le CTC in una provetta di sangue.

Il sistema CellSearch™ è una metodologia approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense per il conteggio delle CTC nel sangue intero che si basa su una combinazione di etichettatura immunomagnetica e microscopia digitale automatizzata. Esistono altri metodi per isolare CTC descritti in letteratura che possono essere tutti usati insieme alla presente invenzione.

Una ricaduta o una ricorrenza si verifica quando una persona viene nuovamente colpita da una condizione che l'ha colpita in passato. Ad esempio, se un paziente ha sofferto di una malattia tumorale, ha ricevuto un trattamento di successo di detta malattia e sviluppa nuovamente detta malattia, detta malattia di recente sviluppo può essere considerata come ricaduta o recidiva. Tuttavia, secondo l'invenzione, una ricaduta o ricorrenza di una malattia tumorale può, ma non necessariamente, verificarsi nel sito della malattia tumorale originale. Così, ad esempio, se un paziente ha sofferto di tumore ovarico e ha ricevuto un trattamento di successo, una ricaduta o una recidiva può essere il verificarsi di un tumore ovarico o il verificarsi di un tumore in un sito diverso dall'ovaio. Una ricaduta o recidiva di un tumore include anche situazioni in cui un tumore si verifica in un sito diverso da quello del tumore originale, nonché nel sito del tumore originale. Preferibilmente, il tumore originale per il quale il paziente ha ricevuto un trattamento è un tumore primario e il tumore in un sito diverso dal sito del tumore originale è un tumore secondario o metastatico.

Il termine "immunoterapia" si riferisce al trattamento di una malattia o condizione inducendo, potenziando o sopprimendo una risposta immunitaria. Le immunoterapie progettate per suscitare o amplificare una risposta immunitaria sono classificate come immunoterapie di attivazione, mentre le immunoterapie che riducono o sopprimono una risposta immunitaria sono classificate come immunoterapie di soppressione. Il termine

"immunoterapia" include immunizzazione antigenica o vaccinazione antigenica, o immunizzazione tumorale o vaccinazione tumorale. Il termine "immunoterapia" si riferisce anche alla manipolazione delle risposte immunitarie in modo tale che risposte immunitarie inappropriate siano modulate in risposte più appropriate nel contesto di malattie autoimmuni come artrite reumatica, allergie, diabete o sclerosi multipla.

I termini "immunizzazione" o "vaccinazione" descrivono il processo di somministrazione di un antigene a un individuo allo scopo di indurre una risposta immunitaria, ad esempio, per ragioni terapeutiche o profilattiche.

Il termine "trattamento terapeutico" o semplicemente "trattamento" si riferisce a qualsiasi trattamento che migliora lo stato di salute e/o prolunga (aumenta) la durata della vita di un individuo. Detto trattamento può eliminare la malattia in un individuo, arrestare o rallentare lo sviluppo di una malattia in un individuo, inibire o rallentare lo sviluppo di una malattia in un individuo, diminuire la frequenza o la gravità dei sintomi in un individuo e/o diminuire il recidiva in un individuo che ha attualmente o che ha precedentemente avuto una malattia.

Il termine "trattamento profilattico" o "trattamento preventivo" si riferisce a qualsiasi trattamento inteso a prevenire il verificarsi di una malattia in un individuo. I termini "trattamento profilattico" o "trattamento preventivo" sono qui usati in modo intercambiabile.

I termini "proteggere", "prevenire", "profilattico", "preventivo" o "protettivo" si riferiscono alla prevenzione e/o al trattamento del verificarsi e/o della propagazione di una malattia, ad es. tumore, in un individuo. Ad esempio, una somministrazione profilattica di un'immunoterapia, ad es. somministrando una composizione qui descritta, può proteggere l'individuo ricevente dallo sviluppo di un tumore. Ad esempio, una somministrazione terapeutica di un'immunoterapia, ad es. somministrando una composizione qui descritta, può arrestare lo sviluppo di una malattia, ad es. portare all'inibizione del progresso/crescita di un tumore. Ciò comprende la decelerazione del progresso/crescita del tumore, in particolare un'interruzione della progressione del tumore, che preferibilmente porta all'eliminazione del tumore. Una somministrazione terapeutica di un'immunoterapia può proteggere l'individuo, ad esempio, dalla disseminazione o metastasi di tumori esistenti.

Il termine "individuo" o "soggetto" si riferisce ai vertebrati, in particolare ai mammiferi. Ad esempio, mammiferi nel contesto della presente invenzione sono esseri umani, primati non umani, mammiferi domestici come cani, gatti, pecore, bovini, capre, maiali, cavalli ecc., Animali da laboratorio come topi, ratti, conigli, Guinea maiali, ecc. così come animali in cattività come gli animali degli zoo. Il termine "soggetto" si riferisce anche a vertebrati non mammiferi come uccelli (in particolare uccelli domestici come pollo, anatre, oche, tacchini) e ai pesci (in particolare pesci d'allevamento, ad esempio salmone o pesce gatto). Il termine "animale" come qui utilizzato include anche gli esseri umani. Preferibilmente, il termine "paziente" si riferisce a un individuo malato.

Gli agenti qui descritti possono essere somministrati sotto forma di qualsiasi composizione farmaceutica adatta. Il termine "composizione

farmaceutica" si riferisce a una formulazione comprendente un agente terapeuticamente efficace o un suo sale, preferibilmente insieme ad eccipienti farmaceutici come tamponi, conservanti e modificatori di tonicità. Detta composizione farmaceutica è utile per trattare, prevenire o ridurre la gravità di una malattia o disturbo mediante la somministrazione di detta composizione farmaceutica a un individuo. Una composizione farmaceutica è anche nota nell'arte come formulazione farmaceutica. La composizione farmaceutica può essere somministrata localmente o sistemicamente.

Il termine "somministrazione sistemica" si riferisce alla somministrazione di un agente terapeuticamente efficace in modo tale che l'agente venga ampiamente distribuito nel corpo di un individuo in quantità significative e sviluppi un effetto biologico. Secondo la presente invenzione, si preferisce che la somministrazione avvenga per via parenterale.

Il termine "somministrazione parenterale" si riferisce alla somministrazione di un agente terapeuticamente efficace in modo tale che l'agente non passi nell'intestino. Il termine "somministrazione parenterale" include la somministrazione endovenosa, la somministrazione sottocutanea, la somministrazione intradermica o la somministrazione intraarteriosa ma non è limitata a ciò. Preferibilmente, la composizione secondo la presente invenzione viene somministrata al tessuto muscolare, come il muscolo scheletrico. La somministrazione intramuscolare come l'iniezione intramuscolare è quindi la via di somministrazione preferita.

La somministrazione può essere ottenuta in vari modi. In modo opzionale, la composizione secondo la presente invenzione viene somministrata per iniezione. Preferibilmente, l'iniezione avviene tramite un ago. In alternativa può essere utilizzata l'iniezione senza ago.

Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono comprendere almeno un adiuvante. Il termine "adiuvante" si riferisce a composti che, quando somministrati in combinazione con un antigene o un peptide di antigene a un individuo, prolungano o aumentano o accelerano una risposta immunitaria. Si presume che gli adiuvanti esercitino la loro attività biologica mediante uno o più meccanismi, tra cui un aumento della superficie dell'antigene, un prolungamento della ritenzione dell'antigene nel corpo, un ritardo del rilascio dell'antigene, indirizzare l'antigene ai macrofagi, aumento della captazione dell'antigene, potenziamento dell'elaborazione dell'antigene, stimolazione del rilascio di citochine, stimolazione e attivazione di cellule immunitarie come cellule B, macrofagi, cellule dendritiche, cellule T e attivazione aspecifica di cellule immunitarie. Gli adiuvanti comprendono un gruppo eterogeneo di composti come emulsioni oleose (ad esempio, adiuvanti di Freund), composti minerali (come allume), prodotti batterici (come la tossina di Bordetella pertussis) o complessi immunostimolanti.

Esempi di adiuvanti includono saponine, adiuvanti di Freund incompleti, adiuvanti di Freund completi, tocoferolo o allume, ma non sono limitati a questi.

La composizione farmaceutica secondo la presente invenzione viene generalmente applicata in una "quantità farmaceuticamente efficace" e in "una

preparazione farmaceuticamente accettabile".

Il termine "quantità farmaceuticamente efficace" si riferisce alla quantità che ottiene una reazione desiderata o un effetto desiderato da solo o insieme a ulteriori dosi. Nel caso del trattamento di una particolare malattia, la reazione desiderata si riferisce preferibilmente all'inibizione del decorso della malattia. Ciò comprende il rallentamento del progresso della malattia e, in particolare, l'interruzione o l'inversione del progresso della malattia. La reazione desiderata in un trattamento di una malattia può anche essere un ritardo dell'insorgenza o una prevenzione dell'insorgenza di detta malattia o di detta condizione. Una quantità efficace delle composizioni qui descritte dipenderà dalla condizione da trattare, dalla gravità della malattia, dai parametri individuali del paziente, inclusi età, condizione fisiologica, taglia e peso, dalla durata del trattamento, dal tipo di terapia (se presente), via specifica di somministrazione e fattori simili. Di conseguenza, le dosi somministrate delle composizioni qui descritte possono dipendere da vari di tali parametri.

Nel caso in cui una reazione in un paziente sia insufficiente con una dose iniziale, possono essere utilizzate dosi più elevate (o dosi effettivamente più elevate ottenute con una via di somministrazione diversa e più localizzata).

Il termine "farmaceuticamente accettabile" si riferisce alla non tossicità di un materiale che non interagisce con l'azione del componente attivo della composizione farmaceutica.

Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono contenere sali, tamponi, agenti conservanti, veicoli e facoltativamente altri agenti terapeutici. Preferibilmente, le composizioni farmaceutiche della presente invenzione comprendono uno o più veicoli, diluenti e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

Il termine "eccipiente" intende indicare tutte le sostanze in una composizione farmaceutica che non sono ingredienti attivi come leganti, lubrificanti, addensanti, agenti tensioattivi, conservanti, emulsionanti, tamponi, agenti aromatizzanti o coloranti.

Il termine "diluente" si riferisce a un agente diluente e/o diluente. Inoltre, il termine "diluente" include uno o più tra sospensioni fluide, liquide o solide e/o mezzi di miscelazione.

Il termine "veicolo" si riferisce a uno o più riempitivi o diluenti solidi o liquidi compatibili, che sono adatti per una somministrazione a un essere umano. Il termine "veicolo" si riferisce a un componente organico o inorganico naturale o sintetico che è combinato con un componente attivo al fine di facilitare l'applicazione del componente attivo. Preferibilmente, i componenti di supporto sono liquidi sterili come acqua o oli, inclusi quelli derivati da olio minerale, animali o piante, come olio di arachidi, olio di semi di soia, olio di sesamo, olio di girasole, ecc. Le soluzioni saline e le soluzioni acquose di destrosio e glicerina possono anche essere usate come composti di trasporto acquosi. Veicoli o diluenti farmaceuticamente

accettabili per uso terapeutico sono ben noti nell'arte farmaceutica e sono descritti, ad esempio, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R Gennaro edit. 1985). Esempi di veicoli adatti includono, per esempio, carbonato di magnesio, stearato di magnesio, talco, zucchero, lattosio, pectina, destrina, amido, gelatina, tragacanto, metilcellulosa, carbossimetilcellulosa di sodio, una cera a basso punto di fusione, burro di cacao e simili.

Esempi di diluenti adatti includono etanolo, glicerolo e acqua.

È possibile selezionare veicoli, eccipienti o diluenti farmaceutici tenendo conto della via di somministrazione prevista e della pratica farmaceutica standard. Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono comprendere come, o in aggiunta a, il supporto (i), eccipiente (i) o diluente (i) qualsiasi legante (i) adatto (i), lubrificante (i), agente (i) di sospensione (i), rivestimento agente (i) e/o agente (i) solubilizzante (i). Esempi di leganti adatti includono amido, gelatina, zuccheri naturali come glucosio, lattosio anidro, lattosio a flusso libero, beta-lattosio, dolcificanti di mais, gomme naturali e sintetiche, come acacia, tragacanto o alginato di sodio, carbossimetilcellulosa e polietilenglicole. Esempi di lubrificanti adatti includono oleato di sodio, stearato di sodio, stearato di magnesio, benzoato di sodio, acetato di sodio, cloruro di sodio e simili/Nella composizione farmaceutica possono essere forniti conservanti, stabilizzanti, coloranti e persino agenti aromatizzanti. Esempi di conservanti includono sodio benzoato, acido sorbico ed esteri dell'acido p-idrossibenzoico.

Possono essere utilizzati anche antiossidanti e agenti di sospensione.

In modo opzionale, la composizione è una composizione acquosa. La composizione acquosa può facoltativamente comprendere soluti, ad es. sali. In modo opzionale, la composizione è sotto forma di una composizione liofilizzata. Una composizione liofilizzata è ottenibile mediante liofilizzazione di una rispettiva composizione acquosa.

Gli agenti e le composizioni forniti nel presente documento possono essere usati da soli o in combinazione con altri regimi terapeutici come chirurgia, irradiazione, chemioterapia e/o trapianto di midollo osseo (autologo, singenico, allogenico o non correlato).

La presente invenzione è descritta in dettaglio ed è illustrata dalle figure e dagli esempi, che vengono utilizzati solo a scopo illustrativo e non sono da intendersi limitativi.

FIGURE

Figura 1. Le proteine degli epitopi pubblicati sono significativamente arricchite negli esosomi e nel citosol rispetto ai peptidi casuali (proteoma).

Figura 2. I geni degli epitopi pubblicati si trovano significativamente più spesso nel database SEREX rispetto ai peptidi casuali.

ESEMPI

Le tecniche e i metodi utilizzati nel presente documento sono qui descritti o eseguiti in un modo di per sé noto e come descritto, ad esempio, in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Tutti i metodi, compreso l'uso di kit e reagenti, vengono eseguiti in base alle informazioni del produttore, a meno che non sia specificamente indicato.

Esempio 1: posizione di proteine contenenti epitopi pubblicati

La letteratura è stata vagliata al fine di identificare i neoepitopi mutati di classe I ristretti MHC ("Epitopi pubblicati", n = 129) e la loro posizione è stata confrontata con un campione casuale di geni codificanti proteine ("Proteome", n = 500) (Figura 1). La posizione dei rispettivi geni è stata determinata tramite il database di ontologia genica (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>). Inoltre, la presenza negli esosomi è stata testata tramite il database ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>). Come mostrato nella Figura 1, i geni contenenti neo-epitopo sono significativamente arricchiti negli esosomi e nel citosol rispetto ai geni di controllo (test esatto di fishers; $p < 0.0001$).

In una seconda fase, la presenza di geni da epitopi pubblicati nel database SEREX (V. Jongeneel, Cancer Immunity, Vol.1, p. 3 (30 Marzo 2001)) è stato confrontato con i geni del controllo casuale (Figura 2). Il database SEREX elenca le proteine che hanno dimostrato di essere riconosciute dagli autoanticorpi. I geni degli epitopi pubblicati sono stati trovati molto più spesso nel database SEREX rispetto ai peptidi casuali (test esatto dei pescatori; $p < 0,0001$). I risultati mostrati nelle Figure 1 e 2 indicano che la presenza di geni mutati negli esosomi, nel citosol o in un database di autoanticorpi sono parametri utili per prevedere gli antigeni mutati levanti per l'immunoterapia.

ELENCO DI SEQUENZE

<110> BioNTech RNA Pharmaceuticals GmbH et al.

<120> METODI PER PREVEDERE L'UTILITA' DELLE PROTEINE O I FRAMMENTI DI PROTEINE PER IMMUNOTERAPIA

<130> 674-157 PCT2

<150> PCT/EP2016/060897

<151> 2016-05-13

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Sequenza linker

<220>

<221> REPEAT

<222> (1)..(3)

<223> Porzione di sequenza ripetuta a volte, in cui a è in modo indipendente un numero scelto tra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(15)

<223> a + b + c + d + e sono diversi da 0 e preferibilmente sono 2 o più, 3 o più, 4 o più o 5 o più

<220>

<221> REPEAT

<222> (4)..(6)

<223> Porzione di sequenza ripetuta b volte, in cui b è in modo indipendente un numero scelto tra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20

<220>

<221> REPEAT

<222> (7)..(9)

<223> Porzione di sequenza ripetuta c volte, in cui c è in modo indipendente un numero scelto tra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20

<220>

<221> REPEAT

<222> (10)..(12)

<223> Porzione di sequenza ripetuta d volte, in cui d è in modo indipendente un numero scelto tra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20

<220>

<221> REPEAT

<222> (13)..(15)

<223> Porzione di sequenza ripetuta e volte, in cui e è in modo indipendente un numero scelto tra 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20

<400> 1

Gly Gly Ser Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Sequenza linker

<400> 2

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per prevedere l'utilità di un neo-antigene o suo neoepitopo associato al cancro comprendente una o più modifiche di aminoacidi specifiche del cancro per l'immunoterapia anti-cancro, il metodo comprendendo le fasi di

accertare la distribuzione o la localizzazione del neo-antigene comprendente l'accertamento in un database computazionale se il neo-antigene è localizzato o abbondante nel citosol e/o all'interno di esosomi in vivo,

in cui la localizzazione o l'abbondanza del neo-antigene o di un acido nucleico che lo codifica, o un neoepitopo del neo-antigene nel citosol e/o all'interno degli esosomi in vivo indica che il neo-antigene o il neoepitopo è utile per immunoterapia anti-cancro,

in cui l'elaborazione e la presentazione del neo-antigene nella via MHC I dà come risultato il riconoscimento di complessi formati da MHC I e neo-epitopi del neo-antigene da parte delle cellule T CD8 +.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui l'una o più modifiche di aminoacidi sono dovute a mutazioni somatiche specifiche del cancro.

**** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

Figura 1

Posizione

Percentuale di geni

Epitopi pubblicati (n=129)

Proteoma (n=500)

Esosoma

Membrana

Citoplasma

Nucleo

Citosol

Membrana cellulare

Mitocondrio

Membrana ER

Endosoma

Extracellulare

Lisosoma

Figura 2

Banca dati SEREX

Percentuale di geni

Epitopi pubblicati (n=129)

Proteoma

(n=500)

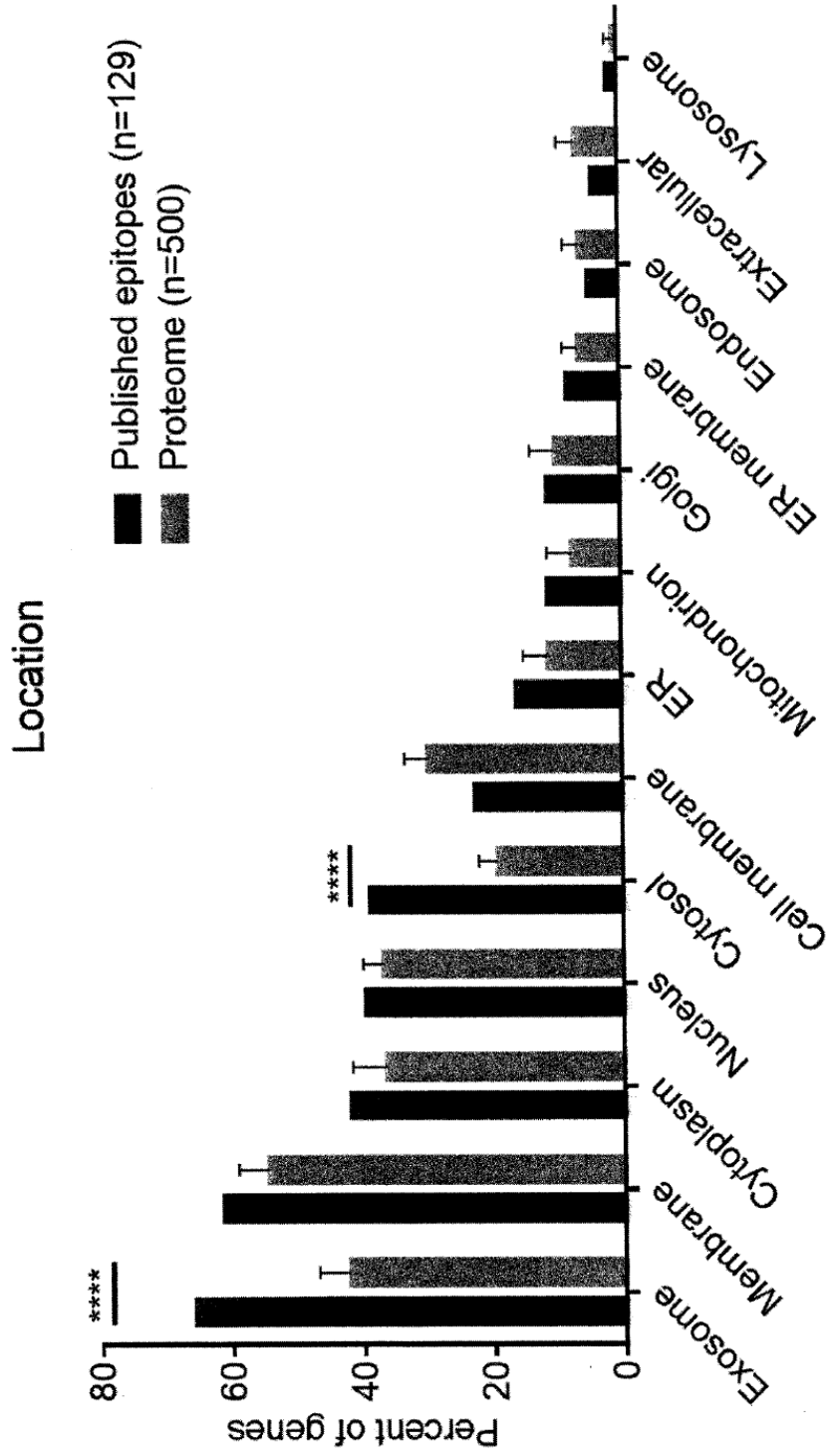


Fig. 1

Fig. 2

