



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 548**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06711432 .2**
96 Fecha de presentación : **15.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1848456**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

54 Título: **Péptido poli-epítoto derivado de timidilato sintasa que tiene actividad inmunológica y antitumoral.**

30 Prioridad: **16.02.2005 IT RM05A0064**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es: **Università degli Studi di Siena
55, Via Banchi di Sotto
I-53100 Siena, IT**

72 Inventor/es: **Correale, Pierpaolo;
Cusi, Maria, Grazia;
Francini, Guido y
Giorgi, Giorgio**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 357 548 T3

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

DESCRIPCIÓN

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividad antitumoral y a sus composiciones farmacéuticas relacionadas. En particular, la presente invención se refiere a un péptido con actividad antitumoral preventiva y terapéutica, también en conjunto con otros compuestos antitumorales conocidos tales como, por ejemplo, 5-fluorouracilo.

TÉCNICA ANTERIOR

10 Timidilato sintasa (TS) es una proteína intracelular capaz de regularse por sí misma en respuesta a los niveles de expresión de sus cofactores y sus sustratos. La TS es la fuente principal de timidina en células eucariotas, y es necesaria para la síntesis y duplicación de ADN. Sintetiza timidina añadiendo una unidad de moncarbonato al deoxiuracilo en presencia de folatos reducidos [1,2].

15 Por lo tanto, la TS está implicada estrictamente en la duplicación del ADN y en la proliferación celular y, por lo tanto, en células normales, su expresión está controlada de forma rigurosa por genes implicados en el ciclo celular, y se expresa de forma temporal solamente durante la fase S [3,4].

Por el contrario, en células tumorales, la TS se expresa de forma constitutiva y su intensidad de expresión es un índice de la proliferación. En base a estas consideraciones, algunos de los fármacos antitumorales más activos, incluyendo los antimetabolitos, actúan directa y/o indirectamente inhibiendo esta enzima [5].

20 Además, la TS es la diana enzimática crítica inhibida por el monofosfato de 5-fluorodeoxiuradina (5-FdUMP), un metabolito de 5-fluorouracilo (5-FU), que es uno de los fármacos citotóxicos más activos y está incluido en casi todos los regímenes de tratamiento de poliquimioterapia utilizados para tratar neoplasmas malignos del aparato gastroentérico, carcinomas de pecho y neoplasmas malignos de cabeza y cuello [6].

25 El 5-FU es un profármaco de fluoropirimidina que tiene que ser activado en el citoplasma de células neoplásicas en dos metabolitos citotóxicos: trifosfato de 5-fluoro-uridina (5-FUTP) y 5-FdUMP. Este último es en particular responsable de la inhibición permanente de TS con lo que, también en asociación con el folato reducido, forma un complejo terciario estable que es degradado rápidamente en el citoplasma celular por el sistema de proteosomas responsables de la formación de epítopes de péptido derivados de antígenos de tumor.

30

Muchos estudios en la actualidad han demostrado que la sobreexpresión constitutiva o adquirida de TS, así como sus mutaciones, son mecanismos de escape válidos para las células tumorales porque les confieren resistencia a 5-FU [7].

35 En este sentido, numerosos estudios en la actualidad han demostrado que la detección de altos niveles de TS o de sus mutaciones en pacientes con carcinomas gástricos o de colon es predictiva de resistencia al fármaco y se consideran factores de pronóstico negativo [8,9].

40 Incluso en las células tumorales que expresan de forma constitutiva niveles bajos o intermedios de TS, la enzima está, en todo caso, sometida a actividad autorreguladora potente porque, después de la exposición a 5-FU solamente durante cinco horas, estas células también muestran una respuesta adaptativa, con una sobreexpresión clara e inmediata de la enzima [10].

Por lo tanto, es evidente que existe una necesidad de desarrollar una herramienta terapéutica que pueda superar la incapacidad de 5-FU, sola o conjuntamente con distintos agentes quimioterapéuticos, de suprimir totalmente la enfermedad neoplásica y de curar así a pacientes con neoplasmas malignos, particularmente de pecho y del aparato gastroentérico.

45 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

50 Los autores de la presente invención han desarrollado un agente peptídico antitumoral con actividad inmunoterapéutica, designado TS/PP, que también se puede combinar con quimioterapia convencional basada en fluoropirimidina y es capaz de obtener, *in vivo* e *in vitro*, una respuesta de linfocitos T citotóxica poliepitope, capaz de destruir las células tumorales que sobreexpresan la enzima TS. Como la expresión de la proteína TS es una de las primeras alteraciones que ocurren en todos los tumores humanos durante la carcinogénesis, el péptido de la presente invención tiene también una acción inmunoprotectora preventiva además de su actividad terapéutica.

55 TS/PP es un péptido sintético de 28 aminoácidos caracterizado por el hecho de que contiene varias secuencias de aminoácidos de un epítipo natural, algunas de las cuales son potencialmente capaces de unirse a diferentes haplotipos de moléculas de HLA de clase I (que incluyen

los tres epítopes conocidos específicos para las moléculas HLA-A(*)02.01: TS-1, TS-2 y TS-3) [11], y para las moléculas de HLA de clase II. La actividad inmunológica y antitumoral de TS/PP se ha demostrado en modelos humanos *in vitro* y en ratones (ratones transgénicos HHD) genéticamente manipulados con moléculas humanas de la clase I del sistema principal de histocompatibilidad (haplotipo HLA-A(*)02.01) que expresan una TS que es muy similar a la TS humana (similitud de aminoácidos del 90-95%).

En el modelo humano, TS/PP ha sido utilizado para generar líneas de linfocitos T citotóxicas (CTL) *in vitro* estimulando de forma cíclica células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (derivadas de donadores normales y de donadores con neoplasmas malignos) con dosis bajas de interleuquina 2, y en cultivos en conjunto con células dendríticas autólogas expuestas previamente a TS/PP. Estas líneas linfocíticas manifiestan actividad citotóxica significativa contra células tumorales de carcinoma de pecho y de colon (HLA-A(*)02.01+). Esta actividad citotóxica aumenta de forma dramática si las células tumorales son expuestas con anterioridad a dosis subletales de 5-FU capaces de aumentar la expresión endógena de TS.

En el modelo animal, TS/PP administrado a ratones de HHD inoculados con células leucémicas (EL-4 HHD) autólogas que expresan TS, tiene potente actividad antitumoral (preventiva y terapéutica) que es incrementada por el tratamiento combinado con 5-FU. La actividad antitumoral e inmunogénica de TS/PP no está asociada con el comienzo de ningún evento adverso o autoinmunidad sino que, en los modelos murino y humano, es mucho mayor que la ejercida por los péptidos de epítipo conocidos de TS (TS-1, TS-2 y TS-3) utilizados individualmente o en combinación.

La presente invención también se refiere a un método para generar *in vitro* líneas de CTL específicas de TS (y multiepítopes) con actividad antitumoral para ser utilizadas en la inmunoterapia de pacientes neoplásicos. Las líneas linfocíticas a ser reinfundidas en los pacientes neoplásicos son de hecho generadas por medio de la estimulación cíclica *ex vivo* de las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes (PBMC).

(HLA-(*)02.01+, recogido por medio de leucoféresis) con dosis bajas de IL-2 y células dendríticas autólogas expuestas al péptido TS/PP.

La presente invención también se refiere a la capacidad del péptido TS/PP de evitar el inicio de la formación de tumores en ratones transgénicos positivos a HLA-(*)02.01 (HHD) e inoculados con células tumorales autólogas (EL-4/HHD).

La presente invención también se refiere a la capacidad del péptido TS/PP de inducir una respuesta inmune con actividad antitumoral en ratones transgénicos positivos a HLA-(*)02.01 (HHD) e inoculados con células tumorales autólogas (EL-4/HHD) en ausencia de una respuesta autoinmune y/o tóxica.

Además, la presente invención se refiere a la terapia antitumoral combinada de TS/PP y 5-FU como tratamiento quimioinmunoterapéutico de carcinomas sensibles a fluoropirimidina (carcinomas gastroentéricos, de pecho y de cabeza y cuello).

El objeto de la presente invención es por lo tanto un péptido multiepítipo que consiste en la secuencia de aminoácidos del aminoácido 19 al aminoácido 27 de la Seq. ID Núm. 2 y del aminoácido 1 al aminoácido 9 de la Seq. ID Núm. 2 y del aminoácido 10 al aminoácido 18 de la Seq. ID Núm. 2 para uso médico.

En una forma alternativa preferente, el péptido consiste en la secuencia YMAIHITGLFLDSLGFSTTLGDAHIYL (Seq. ID Núm. 2).

Un objeto adicional de la presente invención es un péptido que tiene la secuencia YMAIHITGLFLDSLGFSTTLGDAHIYL (Seq. ID Núm. 2).

Un objeto adicional de la presente invención es un vector que comprende, y es capaz de expresar de forma eficaz en una célula eucariota, una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la presente invención, en el que la secuencia de nucleótidos es preferentemente TACATGATTGCGCACATCACGGCCTGTTTTGGACAGCCTGGGATTCTCCACC ACTTTGGGAGATGCACATATTTACCTG (Seq. ID Núm: 1).

Un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica con actividad antitumoral preventiva que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido según la presente invención y excipientes adecuados y/o diluyentes y/o agentes solubilizantes.

Un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica con actividad quimioterapéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido según la presente invención y excipientes adecuados y/o diluyentes y/o agentes solubilizantes. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende un ingrediente activo antitumoral adicional y, más preferentemente, el ingrediente activo antitumoral adicional es 5-fluorouracilo.

Un objeto adicional de la presente invención es un método para obtener *in vitro* linfocitos T citotóxicos (CTL) activados para TS, que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar *in vitro* PBMC obtenidas de un individuo y;
- 5 b) estimular *in vitro* dichas PBMC exponiéndolas a células dendríticas autólogas irradiadas, expuestas previamente durante un tiempo oportuno a concentraciones eficaces del péptido según la presente invención.

Otro objeto de la presente invención son linfocitos T citotóxicos activados para TS obtenibles mediante el método descrito anteriormente, preferentemente para inmunoterapia.

10 La presente invención será descrita a continuación en sus ejemplos no limitativos, en referencia particular a las siguientes figuras:

Figura 1A - Líneas de CTL generadas usando cada péptido de epítipo individual de TS (TS-1, TS-2 y TS-3) capaces de destruir células dianas CIR-A2 expuestas al péptido TS/PP.

15 Estos resultados sugieren que TS/PP es procesado por las células dianas en forma de epítopes de péptido individuales. La actividad lítica de estos CTL se ha examinado (por medio de la liberación de ⁵¹Cr) en ensayos de citotoxicidad contra células CIR-A2 expuestas a 25 µg/ml de TS/PP durante 4 horas. Los controles positivos consistieron en las mismas células, pulsadas con 25 µg/ml de cada uno de los péptidos individuales (TS/1, TS/2, o TS/3) específicamente utilizados para generar las líneas transfectadas con un plásmido que contiene el gen de TS (pcTS) que indujo la sobreexpresión de la enzima. Los controles negativos consistieron en las mismas células CIR-A2, no expuestas a ningún reactivo, transfectadas con la cadena principal del plásmido (pcDNA3) (datos no mostrados en la figura), o pulsadas con un péptido de epítipo conocido (PTR-4, proteína relacionada con la hormona paratiroides) derivado de un antígeno no expresado en estas células y sin relación con TS. Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis específica en diferentes relaciones efector/diana (E/T) (valores promedios y desviaciones estándar de los experimentos individuales por triplicado). Los símbolos representan: células CIR-A2 dianas no tratadas [---]; células CIR-A2 transfectadas con pcTS [○]; células CIR-A2 expuestas con anterioridad al péptido TS/PP [■]; células CIR-A2 pulsadas con los péptidos de epítipo específicos de TS utilizados para generar las líneas [△]; células CIR-A2 pulsadas con el péptido de control (PTR-4) [□].

20
25
30
35
40
45
Figura 1B - Especificidad multiepítipo de las líneas CTL generadas usando TS/PP. En los ensayos de citotoxicidad, las líneas CTL generadas usando el péptido TS/PP son capaces de destruir células dianas CIR-A2 pulsadas con 25 µg/ml de cada uno de los tres epítopes de péptido de TS (TS/1, TS/2, o TS/3). Las células CIR-A2 expuestas a 25 µg/ml de TS/PP durante 4 horas, y aquellas transfectadas con el plásmido recombinante para codificar el gen de TS (pcTS), se utilizaron como controles positivos, mientras que los controles negativos eran las mismas células CIR-A2, no expuestas a ningún reactivo o transfectadas con la cadena principal del plásmido (pcDNA3) (datos no mostrados en la figura), pulsadas con PTR-4 o con un péptido de epítipo derivado de la matriz del virus de la influenza (IFN). Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis específica en diferentes relaciones efector/diana (E/T) (valores promedios y desviaciones estándar de los experimentos individuales por triplicado).

Los símbolos representan: células diana CIR-A2 no expuestas a ningún reactivo [---]; células CIR-A2 transfectadas con pcTS [△]; células CIR-A2 expuestas al péptido TS/PP [■]; células CIR-A2 pulsadas con TS-1 [○]; células CIR-A2 pulsadas con TS-2 [◆]; células CIR-A2 pulsadas con TS-3 [▲]; células CIR-A2 pulsadas con PTR-4 [□], células CIR-A2 pulsadas con el péptido de IFN [Δ].

50
55
Figura 2 – La actividad lítica de las líneas de linfocitos T citotóxicas generadas usando el péptido TS/PP contra células de carcinoma de pecho es incrementada por el tratamiento anterior con 5-FU de las células dianas. Examinadas en ensayos de citotoxicidad *in vitro*, las líneas CTL generadas usando TS/PP fueron capaces de destruir las células dianas derivadas de carcinoma de pecho HLA-A(*02.01+ (la línea celular MDA-MB-231). La actividad lítica de los linfocitos efectores fue perceptiblemente mayor que la inducida por las líneas de linfocitos generadas *in vitro* usando cada uno de los tres epítopes mencionados anteriormente del péptido TS, y fue perceptiblemente mayor si las células dianas habían sido sometidas a dosis subletales de 5-FU capaces de aumentar la expresión endógena de TS.

La actividad lítica de los linfocitos específicos de TS/PP se restringió a moléculas HLA de clase I porque se eliminó cuando el experimento de citotoxicidad se llevó a cabo en

presencia de anticuerpos anti-HLA-(*)02.01 (A2.69 y W6.32) (datos no mostrados). En cambio, la lisis no cambió cuando se utilizó el anticuerpo UPC-10 como control negativo que no reacciona con las células dianas (datos no mostrados en la figura).

5 Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis específica en diferentes relaciones efector/diana (E/T).

Los símbolos representan: células dianas MDA-MB-231 [-○-]; células MDA-MB-231 expuestas a anticuerpo monoclonal A2,69 [--Δ-]; células MDA-MB-231 tratadas con anterioridad con 5-FU [-■-]; células MDA-MB-231 tratadas con anterioridad con 5-FU y expuestas a anticuerpo monoclonal A2.69 [--○-].

10 Figura 3 - La actividad lítica contra células de carcinoma de colon de líneas de linfocitos T citotóxicas generadas usando el péptido TS/PP es incrementada por el tratamiento anterior con 5-FU de las células dianas.

15 Las líneas de linfocito generadas *in vitro* usando TS/PP fueron capaces de destruir las células dianas derivadas de carcinoma de colon (las líneas celulares HT-29 y SW-1463). La línea celular HT-29 es una línea celular de carcinoma de colon que no expresa HLA-A(*)02.01 y por lo tanto puede ser utilizada como células dianas de los CTL de la presente invención, se indujeron para expresar moléculas de HLA-A(*)02.01 por medio de la transfección (gen pc-HLA-A(*)02.01). La lisis inducida por las líneas de linfocitos generadas usando el péptido TS/PP era mayor que la inducida por las otras líneas de linfocitos generadas con cada uno de los tres epítopes individuales, y era perceptiblemente mayor cuando las células dianas eran sometidas a dosis subletales de 5-FU capaces de aumentar su producción endógena de TS.

20 La lisis fue restringida a moléculas HLA de clase I porque se eliminó por el uso de los anticuerpos A2.69 y W6.32 en los ensayos de citotoxicidad (datos no mostrados en la figura), y también porque estos CTL eran incapaces de destruir las células HT-29 no transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01, o transfectadas con la cadena principal del plásmido (datos no mostrados en la figura). Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis específica en diferente relaciones efector/diana (E/T).

25 Los símbolos representan: células dianas HT-29 [--○-]; células HT-29 transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01 [-●-]; células HT-29 tratadas con anterioridad con 5-FU transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01 [-◆-]; células diana SW-1463 [--□-]; células SW-1463 tratadas con anterioridad con 5-FU [-■-].

30 Figura 4 - Especificidad de péptido de las líneas de linfocito evaluadas mediante un ensayo de competición en frío de CTL. La figura muestra la especificidad de péptido de las dos líneas de linfocitos generadas usando el péptido TS/PP examinado mediante un ensayo de competición en frío midiendo las relaciones de efector/diana de 25/1 y 12,5/1, y usando células CIR-A2 pulsadas con TS/PP como células dianas de los CTL (cargadas con ⁵¹Cr) y células HT-29 [transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01 o tratadas con anterioridad con 5-FU y, a continuación, transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01] como competidores en frío utilizados en las relaciones escalares diana-marcada/competidor en frío (L/C).

35 La figura muestra que la actividad citotóxica de los CTL contra las células CIR-A2 cargadas con 25 µg/ml de TS/PP se redujo por los competidores en frío y se eliminó totalmente a relaciones inferiores de L/C [1/5] [P <0,05]. La figura también muestra que las células HT-29 tratadas con anterioridad con 5-FU y, a continuación, transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01 eran mucho más eficaces ya que eliminaron la lisis de las células dianas en una relación de L/C 5 veces mayor [1/1] [P < 0,05]. Esto sugiere que el efecto inmunosensibilizador de 5-FU está de hecho relacionado con la cantidad creciente de epítopes de TS en las células dianas.

40 Los símbolos representan las células dianas CIR-A2 cargadas con TS/PP en presencia de: sin competidor [-○-]; células HT-29 transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01 y utilizadas como competidores en frío en las relaciones de L/C de 1/1 [-◆-], 1/2 [-■-] y 1/5 [-▲-]; células HT-29 tratadas con anterioridad con 5-FU y transfectadas a continuación con el gen HLA-A(*)02.01 y utilizadas como competidores en frío en las relaciones de L/C de 1/1 [--○-], 1/2 [--■-] y 1/5 [--▲-].

45 50 55 Figura 5 – El crecimiento del tumor en ratones HHD inoculados con células leucémicas autólogas es retardado perceptiblemente o abrogado totalmente por el tratamiento combinado con TS/PP y 5-FU. El crecimiento del tumor se monitorizó semanalmente midiendo su diámetro máximo. Los resultados se muestran como el valor promedio ± SD del diámetro máximo. Los ratones vacunados con TS/PP mostraron un retardo significativo del

crecimiento del tumor, que llegó a ser aún más evidente en los ratones que recibieron TS/PP junto con tratamiento quimioterapéutico con 5-FU.

5 En estos experimentos, el tratamiento quimioterapéutico solo, la vacunación con el péptido de control (derivado del virus de la papera) y la vacunación con una combinación de los tres epítopes del péptido TS (+/- 5-FU) fueron todos incapaces de evitar el crecimiento neoplásico.

10 Los símbolos representan un grupo de ratones tratados con: el péptido de control [-□-]; un cóctel de los epítopes del péptido TS [-△-]; el péptido TS/PP [-○-]; el péptido de control y quimioterapia con 5-FU [-■-]; el cóctel de epítopes del péptido TS y quimioterapia con 5-FU [-▲-]; el péptido TS/PP y quimioterapia con 5-FU [-●-].

15 Figura 6 - La figura muestra el aspecto del tumor en cada ratón que pertenecen a los diferentes grupos 30 días después de la inoculación subcutánea con 2×10^6 células leucémicas autólogas (EL4/HHD). Este experimento muestra que el tratamiento combinado con TS/PP y 5-FU tiene la mayor actividad protectora y contra el tumor. La fotografía muestra ratones anestesiados. El experimento se repitió dos veces con los mismos resultados.

A: Ratones vacunados con el péptido de control (paperas).

B: Ratones vacunados con el péptido de control y tratados con 5-FU.

C: Ratones vacunados con el cóctel de epítopes de péptido de TS.

20 D: Ratones vacunados con el cóctel de epítopes de péptido de TS y tratados con 5-FU.

E: Ratones vacunados con el péptido TS/PP.

F: Ratones vacunados con el péptido TS/PP y tratados con 5-FU.

25 Figura 7 - La figura muestra los resultados de un estudio anatomopatológico de tejido tumoral tomado de animales sacrificados. La fotografía más grande muestra el inmunoteñido para TS (IS), mientras que la fotografía en el recuadro más pequeño muestra el teñido con hematoxilina y eosina HES) en la misma muestra. Cada imagen proviene de un solo animal y es representativa de la condición anatomopatológica encontrada en el grupo de animales que recibieron el mismo tratamiento.

30 A: Ratones vacunados con el péptido de control (paperas). IS: Presencia de células tumorales altamente positivas a la expresión de TS; HES: Capa de células tumorales con algunos cuerpos apoptóticos.

35 B: Ratones vacunados con el péptido de control y tratados con 5-FU. IS: Número incrementado de células tumorales positivas a la expresión de TS; HES: Alteraciones degenerativas en células tumorales y presencia de espacios intercelulares.

40 C: Ratones vacunados con el cóctel de epítopes del péptido TS. IS: Células tumorales raras positivas a la expresión de TS y grupos de pequeños linfocitos que rodean las áreas negativas a TS; HES: Numerosos cuerpos apoptóticos, espacios intercelulares y presencia de una reacción desmoplástica.

D: Ratones vacunados con el cóctel de epítopes de péptido de TS y tratados con 5-FU. IS: Células tumorales positivas a TS raras y aglomerados de pequeños linfocitos en las áreas negativas a TS; HES: espacios pseudocísticos en áreas con cambios degenerativos visibles.

45 E: Ratones vacunados con el péptido TS/PP. Células positivas a TS raras y aglomerados de pequeños linfocitos que rodean las áreas negativas a TS y que se infiltran en los espacios entre las restantes células tumorales; HES: áreas pseudocísticas difusas a través del tejido neoplásico.

50 F: Ratones vacunados con el péptido TS/PP y tratados con 5-FU. Casi ninguna célula positiva a TS y muchos aglomerados de pequeños linfocitos que rodean las áreas negativas a TS; HES: aglomerados de pequeños linfocitos entre las células; áreas pseudocísticas grandes y difusas a través del tejido neoplásico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares. La línea celular de carcinoma de pecho MDA-MB-231 y las líneas celulares de carcinoma de colon HT29 y SW-1463 fueron adquiridas del ATCC. La línea celular linfoblastoide CIR-A2 [12] fue donada por el Dr. Jeffrey Schlom (EOS, LTIB, NCI, NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos). Todas las líneas celulares de tumor se mantuvieron en cultivo tal como se describió anteriormente [12] *Síntesis de péptidos.* Los péptidos derivados de TS, TS-1 (TLGDAHIYL) (aa. 19-27 de Seq. ID Núm. 2, correspondiente a los aa. 245-253 de TS), TS-2 (YMIAHITGL) (aa. 1-9 de Seq. ID Núm. 2, correspondiente a los aa. 229-237 de TS) y TS-3 (FLDSLGFST) (aa. 10-18 de Seq. ID Núm. 2, correspondiente a los aa. 111-119 de TS) y TS/PP (YMIAHITGLFLDSLGFSTTLGDAHIYL) (Seq. ID Núm. 2) se sintetizaron químicamente y se caracterizaron tal como se describió anteriormente [14].

Los péptidos TS-1, TS-2 y TS-3 se seleccionaron en base a su unión cercana con HLA-A(*)02.01, tal como se calculó usando el algoritmo sugerido por Parker y otros [15].

Generación de células dendríticas y cultivos de CTL. Los PBMC se obtuvieron mediante gradientes de separación Ficoll-Hypaque de la capa leucoplaquetaria, o a partir de muestras de sangre colectadas de donantes sanos con el haplotipo HLA-A(*)02.01 y pacientes con cáncer de colon. Las células dendríticas utilizadas para estimular los linfocitos T *in vitro* se generaron a partir de PBMC autólogos crecidos en presencia de GM-CSF y de interleuquina 4 tal como se describió anteriormente [16].

El PBMC utilizado para generar la línea CTL se cultivó tal como se describió en estudios previos [17] a excepción del hecho de que las células dendríticas utilizadas para estimular los CTL se expusieron a TS/PP durante cuatro horas antes de ser utilizadas para la estimulación (cultivo en conjunto de PBMC/CTL). Las células dendríticas autólogas irradiadas se cargaron con los péptidos y se añadieron al cultivo de linfocitos para obtener una concentración final de 1:5 células dendríticas por CTL. *Ensayos citotóxicos.* La liberación de cromo radiactivo (⁵¹Cr) se ensayó tal como se ha descrito en estudios previos [18].

La expresión de HLA-A(*)02.01 fue inducida mediante la transfección génica en la membrana de las células dianas HT29 antes de cada experimento. La lisis específica se calculó como sigue:

$$\text{lisis específica \%} = \frac{\text{liberación observada} - \text{liberación espontánea}}{\text{liberación total} - \text{liberación espontánea}} \times 100$$

La liberación espontánea se determinó en las placas a las que se añadieron 100 µl de medio sin células efectoras. La radiactividad total liberada se determinó después de tratar la diana con Triton x-100. Se bloqueó HLA usando un anticuerpo anti-HLA-A2 (A2.69, One Lambda, Inc., Chanoga Park, CA, Estados Unidos) o el anticuerpo anti-HLA clase I (pan A, B, C) W6.32, que fueron incubados con las células dianas durante una hora antes del ensayo de citotoxicidad. El control negativo fue el anticuerpo monoclonal UPC-10.

Citofluorimetría de flujo. El procedimiento para el análisis citofluorimétrico de cada teñido ha sido previamente descrito [19].

Los anticuerpos conjugados fueron suministrados por Becton Dickinson (San José, CA, Estados Unidos), mientras que los anticuerpos W6/32 (anti-HLA clase I), A9 (anti-HLA-A2.1), COL-1 (anti-CEA) y MOPC-21 fueron respectivamente suministrados por Scra (Sussex, Inglaterra), One Lambda y Cappel/Organon Technica Corporation, West Chester, PA, Estados Unidos). Las muestras fueron analizadas usando un Becton Dickinson FACScan equipado con un láser azul con un nivel de excitación de 15 nW a 488 nm.

Determinación de la frecuencia del precursor. El estuche del ensayo de citofluorimetría de dímeros y los reactivos relacionadas fueron suministrados por Pharmigen BD y los ensayos se realizaron tal como se ha descrito por el productor [20].

Cálculos estadísticos. Las diferencias se analizaron estadísticamente con el programa estadístico Stat View (Abacus Concepts, Berkeley, CA, Estados Unidos). Los resultados fueron expresados como los valores promedios ± desviación estándar de cuatro determinaciones hechas en tres experimentos diferentes y las diferencias se analizaron mediante de un ensayo de t de Student de dos colas o de muestras pareadas. Un valor de P inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Caracterización inmunológica del péptido poli-epítopes

5 Los presentes autores han hecho una caracterización de la actividad inmunológica de una nueva construcción de péptido poli-epítope (TS/PP), que contiene en sucesión las secuencias de aminoácidos de tres epítopes del péptido TS, conocidos como TS-1, TS-2 y TS-3 [21], con un motivo de unión específica a la molécula HLA-A(*)02.01. En estudios previos, los presentes autores demostraron que estos péptidos se pueden unir a la molécula HLA-A(*)02.01 usando el ensayo T2, una técnica citofluorimétrica que es capaz de evaluar de forma indirecta el péptido de unión a las moléculas HLA en las células T2, que manifiesta de por sí como un aumento de la expresión de estas moléculas en la membrana celular. Cada uno de los tres epítopes del péptido (TS-1, TS-2 y TS-3) podrían, por lo tanto, ser utilizado para generar *in vitro* líneas de CTL específicas de TS con actividad antitumoral moderada contra células de carcinomas de pecho y de colon.

15 El péptido TS/PP de nueva generación se desarrolló uniendo las secuencias de aminoácidos de los tres epítopes de TS previamente descritos en una sucesión no progresiva, dando lugar de esta manera a un péptido con una secuencia desconocida. En su forma nativa, el péptido TS/PP de 28 aminoácidos es incapaz de unirse a la molécula HLA-A 02.01 en el ensayo T2, y requiere tratamiento con células presentadoras de antígenos profesionales (por ejemplo, linfocitos B o células dendríticas) para dar lugar a una respuesta de linfocitos de múltiples epítopes específica de TS.

20 El análisis posterior del péptido de 28 aminoácidos (TS/PP) utilizando el algoritmo de Ken Parker reveló que éste también contenía las secuencias de aminoácidos que pertenecen a otros epítopes potenciales con motivos de unión específica para otros haplotipos comunes de HLA de clase I y clase II (tabla 1).

Tabla 1

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos	Posición del aa en relación a la secuencia nativa de TS	Ensayo de unión a sHLA-A(*)02.01 (ensayo T2)	^a Epítopes predichos potencialmente capaces de unirse a haplotipos de HLA clase I
TS-1	TLGDAHIYL	245-253	+++	A2
TS-2	YMIAHITGL	229-237	+++	1,A2;1,A
TS-3	FLDSLGFST	111-119	+++	A2
TS/PP	YMIAHITGLFLDSLGFST TLGDAHIYL(Seq. Id. Núm. 2)		-	5,A2; 1,A3, 1, A1; 5,A24, 1,B44 (y 8, ^b HLA-Dr)
Péptido de control positivo CAP-1 (CEA)	YLSGANLNL (Seq. Id. Núm. 3)		+++	A2
^a Predicho por el algoritmo de Ken Parker;				
^b Predicho por el algoritmo de H. G. Rammensee (H. G. Rammensee, J. Bachmann y S. Stevanvic, en el libro "Ligandos MHC y Motivos de Péptidos")				

25 *Generación y caracterización de líneas de linfocitos T citotóxicas específicas de TS usando TS/PP*

Para evaluar la actividad inmunológica del péptido TS/PP, se generaron diferentes líneas de CTL.

30 Los PBMC de dos donadores HLA-A (02.01)+ diferentes se estimularon de forma cíclica con células dendríticas autólogas expuestas a TS/PP (cinco días de cultivo en conjunto) y crecidas posteriormente durante diez días en un medio que contenía dosis bajas de interleuquina 2 (IL-2) antes de ser estimulados nuevamente. Los cinco días de cultivo en conjunto + 10 días de estimulación proliferativa con IL-2 representan un ciclo de estimulación *in vitro* (IVS).

Con el objetivo de obtener un control comparativo, fueron generadas *in vitro* líneas

citotóxicas de linfocitos T usando los tres epítopes de péptido TS-1, TS-2 y TS-3, a partir de los PBMC de los mismos donadores y utilizando la misma metodología. Después de 4 ciclos de IVS (dos meses de cultivo), las líneas celulares CTL fueron consideradas suficientemente estables para ser caracterizadas inmunocitofluorimétricamente y funcionalmente (actividad citotóxica).

5 *Tratamiento del antígeno e inmunogenicidad del péptido TS/PP*

En estudios previos, los presentes autores demostraron que otro péptido trentamérico que contenía múltiples epítopes del antígeno específico de próstata (PSA) podía ser procesado en las membranas de células dendríticas y de células dianas para formar los péptidos de epítopes individuales. Este oligopéptido de PSA podría ser utilizado para generar líneas de linfocitos específicas para PSA multiepítopes que muestran actividad antitumoral en modelos humanos *in vitro*, y, a continuación, se utilizan para dar lugar a una respuesta de linfocitos específica de PSA en ratones transgénicos que expresaban la molécula HLA-A(*)02.01 [22]. Sin embargo, no estaba claro si estos resultados podían ser extrapolados a otros sistemas.

Los presentes autores han estudiado el procesamiento de TS/PP en las células dianas y han evaluado su capacidad de dar lugar a una respuesta de CTL específica de TS de multiepítopes *in vitro*. Los presentes autores investigaron a continuación si las células dianas CIR-A2 eran reconocidas en ensayos de citotoxicidad por las líneas CTL generadas usando cada uno de los tres epítopes de péptido de TS (TS-1, TS-2, TS-3). Los presentes autores observaron que cada una de estas líneas de linfocitos eran capaces de destruir las células dianas expuestas a TS/PP. En este experimento, se utilizaron como controles positivos células CIR-A2 cargadas con el mismo péptido de epítope (TS-1, TS-2, TS-3) que el utilizado para generar la línea CTL examinada, o transfectada con un plásmido que contiene el gen TS (pcTS). Las células CIR-A2 no expuestas a ningún agente, o expuestas a péptidos sin relación con los TS, o transfectadas con la cadena principal del plásmido (pcDNA3), se utilizaron como controles negativos (figura 1 y datos no mostrados).

Los resultados de estos experimentos demostraron que las tres líneas de CTL (T-TS-1, T-TS-2, T-TS-3) fueron capaces de destruir las células dianas expuestas a TS/PP y los controles positivos (figura 1A), pero no fueron capaces de destruir los controles negativos. Estos resultados sugieren que TS/PP es procesado por las células dianas CIR-A2, que, a continuación, son capaces de exponer los epítopes derivados unidos a HLA-A(*)02.01, permitiendo de esta manera su reconocimiento por los CTL específicos de epítope.

Tal como se describió anteriormente, se utilizó TS/PP para generar líneas de CTL a partir de donadores de HLA-A02.01+; estas CTL, designadas T3939/TS/PP y T4756/TS/PP tienen los inmunofenotipos siguientes: CD3+ = 90-95%; CD56+ = 10-22%; CD4+ = 37-40%; CD8+ = 40-50%. Estas líneas de linfocitos también tienen actividad citolítica multiepítopes en la medida que son capaces de destruir las células dianas de CIR-A2 expuestas individualmente a cada uno de los tres epítopes conocidos de TS y son también capaces de destruir las células dianas cargadas con TS/PP o transfectadas con el plásmido mencionado anteriormente que contiene el gen TS. Sin embargo, los mismos CTL fueron incapaces de destruir las células dianas utilizadas como controles negativos (figura 1B). Estos datos indican que el péptido TS/PP también puede ser procesado por las células dendríticas y puede utilizarse para estimular *in vitro* una respuesta de linfocitos T citotóxica específica de TS multiepítopes.

Actividad antitumoral de las líneas de linfocitos T citotóxicas generadas utilizando TS/PP

Se examinó la actividad lítica de las líneas de CTL generadas utilizando TS/PP contra células de carcinoma de pecho y de colon positivas a HLA-A(*)02.01.

Los presentes autores también ensayaron la actividad lítica de las líneas de CTL generadas utilizando TS/PP contra las mismas células dianas tumorales después del tratamiento con dosis subletales de 5-FU.

Los presentes autores también compararon la actividad citotóxica contra las mismas células dianas tumorales de las líneas de CTL generadas utilizando TS/PP con aquellas generadas utilizando los epítopes de péptidos individuales TS-1, TS-2 y TS-3. Los ensayos de citotoxicidad realizados usando la técnica de liberación de ⁵¹Cr se llevaron a cabo usando células dianas que provenían de líneas celulares derivadas de carcinoma de pecho (MDA-MB-231) y de carcinoma de colon (HT-29 y SW-1463), antes y después del tratamiento con dosis subletales de 5-FU.

Las células HT-29 no expresan de forma constitutiva HLA-A(*)02.01, y por lo tanto fueron utilizadas como dianas después de ser transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01.

Los presentes autores demostraron que las líneas de CTL generadas usando TS/PP fueron capaces de destruir las células MBA-MB-231 (figura 2), las células HT29 transfectadas con el gen HLA-A(*)02.01 es y las células SW-1463 (figura 3).

La actividad lítica de los CTL fue restringida a moléculas HLA-A(*)02.01+ porque se eliminó bloqueando los anticuerpos (A2.69 y W6.32), y también porque los CTL fueron incapaces de destruir las células dianas HT29 no transfectadas con HLA 02.01, o transfectadas con la cadena principal del plásmido.

5 La actividad antitumoral de las líneas de CTL generadas usando el péptido TS/PP era perceptiblemente mayor que el de las tres líneas de CTL generadas usando los tres péptidos de epítipo de TS (figuras 2 y 3).

10 Estudios recientes han encontrado que la expresión de TS es modulada por sus cofactores y por los niveles de sustrato y por eso, después de la inhibición inducida por los metabolitos de 5-FU en células tumorales, la expresión de su gen es perceptiblemente mayor (datos no mostrados en las figuras) [23]. Por lo tanto, los presentes autores han investigado si el tratamiento con 5-FU puede sensibilizar a células cancerosas de pecho y de colon a la actividad lítica inducida por los CTL específicos de TS. Usando los mismos ensayos de citotoxicidad mencionados anteriormente, los presentes autores demostraron que, cuando estaban expuestas a dosis subletales de 5-FU durante 48 horas, las mismas células tumorales de carcinoma de pecho y de colon fueron considerablemente más sensibles a la actividad citotóxica de los CTL generados usando TS/PP y/o los otros epítopes de TS.

La actividad lítica de los CTL contra las células dianas tratadas con 5-FU fue restringida siempre a las moléculas de HLA de clase I porque se redujo o se eliminó mediante el uso de un anticuerpo de bloqueo (A2.69).

20 También en este caso, la actividad lítica de las líneas de linfocitos generadas usando TS/PP era mayor que la de las líneas linfocitos generadas usando los epítopes de péptido individuales TS-1, TS-2 y TS-3 (figuras 2 y 3).

25 La viabilidad de las células dianas expuestas a 5-FU se examinó mediante un recuento hemocitométrico después de teñir y nunca fue inferior al 90%, excluyendo de esta manera la posibilidad de que la inmunosensibilización era debido al gran número de células muertas o células ya degeneradas en el ensayo de citotoxicidad.

30 Los análisis citofluorimétricos y de inmunotransferencia de las células dianas mostraron que el tratamiento con 5-FU no indujo ningún cambio en la expresión de HLA de clase I, pero fue capaz de inducir un aumento significativo en la expresión de TS en las células dianas MDA-MB-231, HT-29 y SW-1463 (datos no mostrados).

La lisis mediada por CTL de células de carcinoma de pecho y de colon está condicionada por la presencia de epítopes de péptido de TS

35 En un intento de demostrar que la actividad citolítica de los linfocitos generados usando TS/PP contra las células tumorales de carcinoma de pecho y de colon es un fenómeno específico de la interacción entre TS y moléculas de HLA-A(*)02.01, los presentes autores realizaron ensayos de competición de antígeno en frío llevando a cabo ensayos de citotoxicidad en los que se utilizaron células CIR-A2 expuestas a TS/PP (marcadas con ⁵¹Cr) como dianas de los efectores de CTL y células de carcinoma de colon HT29 transfectadas con HLA-A(*)02.01, o transfectadas y expuestas posteriormente a dosis subletales de 5-FU, se utilizaron como competidores en frío (sin marcar). En los ensayos de citotoxicidad, las células dianas y los competidores en frío se utilizaron en diferentes relaciones de L/C.

40 Estos experimentos demostraron que la lisis mediada por CTL de las células CIR-A2 cargadas con TS/PP se redujo por la adición de los competidores en frío en los ensayos de citotoxicidad, y se suprimió totalmente cuando la relación de L/C alcanzó el valor de 1/5. Si se añaden los competidores tratados con 5-FU al ensayo de citotoxicidad, la lisis mediada por CTL de las células dianas (células CIR-A2 cargadas con TS/PP) ocurre a una relación cinco veces inferior de L/C (1/1) (figura 4). Se han obtenido previamente resultados similares usando células de carcinoma de pecho MDA-MB-231 (datos no mostrados).

45 Los resultados de estos experimentos sugieren que las líneas de linfocitos generadas usando TS/PP reconocen (en la membrana de las células CIR-A2 cargadas con TS/PP y en las células tumorales) los mismos epítopes de péptido unidos a moléculas de HLA-A(*)02.01 como los que están contenidos en la secuencia de TS/PP. Estos resultados sugieren que la inmunosensibilización inducida por 5-FU está relacionada con la mayor producción de TS, y por lo tanto, una mayor accesibilidad de los epítopes de péptido a las moléculas de HLA, como consecuencia directa de la regulación excesiva de TS en el citoplasma de las células dianas.

55 *Estudio in vivo de ratones manipulados genéticamente para expresar moléculas de HLA-A(*)02.01*

Los presentes autores examinaron las actividades inmunológicas, toxicológicas y antitumorales de TS/PP en ratones transgénicos (HHD) manipulados genéticamente para expresar

moléculas de HLA-A(*)02.01 humanas.

Los presentes autores también compararon las actividades inmunológicas, toxicológicas y antitumorales de TS/PP con aquellas inducidas por una combinación de los tres epítopes de péptido conocidos de TS (TS-1, TS-2 y TS-3).

5 En este estudio, seis grupos de cinco ratones recibieron diferentes tratamientos inmunológicos con o sin tratamiento quimioterapéutico con 5-FU. A los ratones en los grupos A y B se les administró un péptido de control derivado del virus de la papera (100 µg por ratón); a los ratones en los grupos C y D se les administró un cóctel de los péptidos TS-1, TS-2 y TS-3 (100 µg por ratón); y a los ratones en los grupos E y F se les administró el péptido TS/PP (100 µg por ratón).

10 Los ratones recibieron la primera administración del péptido por vía subcutánea en tiempo 0, con repeticiones en la tercera y sexta semanas. Dos semanas después de la última administración, a todos los animales se les inocularon por vía subcutánea 2×10^6 células EL-4/HHD.

15 Antes de la inoculación de las células EL-4/HHD, se ensayaron células linfoblásticas autólogas para los ratones HHD que expresaban el haplotipo HLA-A(*)02.01 para determinar la expresión endógena de TS y HLA mediante ensayos citofluorimétricos que revelaron una expresión constitutiva baja de TS murina (35%). Sin embargo, esta expresión podría ser perceptiblemente mayor mediante el tratamiento con dosis subletales de 5-FU (hasta 55-70%). Para evaluar la posible interacción entre TS y el tratamiento de 5-FU para fines de vacunación, siete días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones de los grupos B, D y F experimentaron un tratamiento quimioterapéutico basado en la administración intraperitoneal semanal de 5-FU (100 µg/ml por ratón). Los resultados del estudio demostraron que el tratamiento de TS/PP retardó perceptiblemente el crecimiento neoplásico, mientras que cuando el tratamiento de TS/PP además incluyó el tratamiento quimioterapéutico la mayoría de los ratones se curaron (figuras 5 y 6). Por el contrario, la quimioterapia sola y el tratamiento con la combinación de epítopes de TS, con o sin quimioterapia, no cambió el crecimiento neoplásico en ningún modo.

De hecho, 30 días después de la inoculación de las células tumorales, los ratones de los grupos A, B, C y D (tratados con el péptido de control o con la combinación de péptidos +/- quimioterapia) desarrollaron una masa tumoral grande y su estado clínico declinó rápidamente; por esta razón, fueron sacrificados.

30 El efecto antitumoral más evidente fue observado en el grupo de ratones tratados con TS/PP. Algunos de estos ratones comenzaron a desarrollar un pequeño tumor solamente 35-40 días después de la inoculación, tiempo en el que los ratones de control tratados o no con 5-FU habían ya muerto de la enfermedad o habían sido sacrificados. El efecto antitumoral de la vacunación con TS/PP fue aún más eficaz en ratones que habían recibido el tratamiento de 5-FU. De hecho en este grupo, la masa tumoral estaba totalmente ausente en 3 de 5 ratones. En los ratones de este grupo que desarrollaron un tumor, la masa no se adhirió al tejido subcutáneo o a la fascia del músculo, y podía eliminarse radicalmente de forma quirúrgica. En este caso, los ratones podían mantenerse vivos y permanecer en buenas condiciones sin ningún otro signo patológico durante los siguientes 30 días, cuando se sacrificaron para los estudios inmunológicos y anatomopatológicos.

40 La actividad antitumoral de los esplenocitos derivados de ratones vacunados con TS/PP o la combinación de péptidos, y a continuación sacrificados, se demostró en los ensayos de citotoxicidad (^{51}Cr) contra EL-4/HHD (datos no mostrados en la figura).

La citofluorimetría de dímeros de los ratones vacunados con TS/PP o la combinación de los tres péptidos demostró la inmunización específica eficaz contra los tres epítopes de TS.

45 Tabla 2: Tratamientos de los ratones

Precusores de CTL específicos de péptidos	Células de bazo de control	Péptido del virus de la papera de control	Péptido TS/PP	Combinación de péptidos de TS
TS/1	0,3 (± 0,1)/ 3500	0,4 (± 0,2)/ 4375	1,1 (± 0,1)/ 9050	1,2 (± 0,2)/ 9049
TS/2	0,2 (± 0,1)/ 2700	0,4 (± 0,1)/ 5414	1,5 (± 0,3)/ 9050	1,3 (± 0,1)/ 8105
TS/3	0,3 (± 0,1)/ 4000	0,6 (± 0,1)/ 4888	1,5 (± 0,3)/ 7880	0,9 (± 0,05)/ 8361

Los resultados se expresan como el porcentaje de CD8+ péptido de dímero específico (PE/dímero) en relación a la fluorescencia promedio por célula. Los números entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar.

El estudio anatomopatológico del tejido tumoral de los animales en el grupo de control reveló la expresión moderada de TS en las células neoplásicas, que fue aumentada más por el tratamiento quimioterapéutico. Sin embargo, aunque es capaz de aumentar la necrosis y la apoptosis, este último no tuvo ningún efecto significativo en el crecimiento del tumor, mientras que la vacunación con la combinación de epítopes de TS o TS/PP condujo a infiltración linfocítica significativa y a una reducción o la desaparición de las células tumorales que expresan TS. El tratamiento combinado con TS/PP y quimioterapia no sólo condujo a la desaparición de TS de las células neoplásicas, sino también a la destrucción inmunomediada clara del tejido tumoral, que era rico en pseudocistos degenerativos e infiltración linfocítica (figura 7). El estudio anatomopatológico de órganos tales como pulmón, hígado, bazo, riñón y cerebro, piel y mucosas no reveló ningún signo de degeneración o de autoinmunidad en ninguno de los grupos examinados.

Todos estos resultados sugieren que TS/PP es capaz de inducir una respuesta mediada por células con actividad antitumoral potente *in vivo* que es mejor que la inducida por la combinación de TS1, TS2 y TS3. TS/PP funciona mejor si se administra en conjunto con tratamiento de 5-FU.

Por lo tanto, 5-FU solo no puede regular el crecimiento del tumor pero, en sinergia con TS/PP, tiene actividad inmunosensibilizadora potente en las células dianas debido a su modulación de TS. Además, los resultados obtenidos no indican ningún fenómeno de autoinmunidad o de toxicidad inducidos por el tratamiento de TS/PP, en ausencia de efectos secundarios.

REFERENCIAS

1. Van der Wilt CL, Peters GJ. Pharm World Sci 1994; 84-103.
2. Chu E, Allegra CJ. Bioassay 1996; 18:191-198.
3. Parsel LA, Chu E. Cancer J Sci Am 1998; 4:287-295.
4. Ju J, Pedersen.Lane J, Maley F, Chu E. Proc Natl Acad Sci 1999; 96; 3769-3774.
5. 6. Chu E, Mota AC, Fogarasi MC (2001) En: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Princliple and Practice of Oncology ("Principios del cáncer y práctica de la ontología"). 6ta Edición. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins pág. 388-415.
7. Van der Wilt CL, Peters GJ. Pharm World Sci 1994; 84-103.
8. Peters GJ, Jansen G. Resistance to antimetabolites ("Resistencia a los antimetabolitos"). En: Schilsky RL, Milano GA, Ratain MJ, Eds. Principles of Antineoplastic Drug Development and Pharmacology ("Principios del desarrollo de fármacos antineoplásicos y de farmacología"). Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1996:543-585
9. Landis DM, Loeb LA. J. Biol Chem 1998; 273:31209-31214.
10. Chu E, Mota AC, Fogarasi MC (2001) En: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Princliple and Practice of Oncology ("Principios del cáncer y práctica de la ontología"). 6ta Edición. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins pág. 388-415.
11. Storkus WJ, Howell DN, Salter RD, y otros. J. Immunol. 1987; 138: 1657-9.
12. Correale P, Aquino A, Pellegrini M, y otros. Int J Cancer en impresión, 2003.
13. Correale P, Sabatino M, Cusi MG, y otros. J Chemother, Oct; 13 (5): 519-526, 2001
14. Parker, K. C, Bednarek, M. A. y J. E. Coligan. J Immunol 152:163-175, 1994.
15. Francini G, Scardino A, Kosmatopoulos K, y otros. J. Immunol, 169:4840-4849, 2002
17. Guadagni F, Witt PL, Robbins PF, Schlom J, Greiner WJ. Cancer Res. 1990; 50: 6248-6255.
18. Schneck, JO, Slansky JE, O'Herrin SM y otros: Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers ("Control de células T específicas de antígeno usando dímeros de MHC-Ig"). Coligan J, Kruisbeek AM, Margulies D, Shevach EM, Strober (Eds). En: Current Protocols in Immunology. ("Protocolos Actuales en Inmunología"). Inc. Nueva York, NY John Wiley e hijos, 200, págs 17.2.1-17.2.17.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universit Degli Studi di Siena

CORREALE, Pierpaolo

CUSI, Maria Grazia

5 FRANCINI, Guido

GIORGI, Giorgio

<120> Péptido poli-epítpe derivado de timidilato sintasa que tiene actividad inmunológica y antitumoral

<130> PCT 91166

10 <150> RM2005A000064

<151> 2005-02-16

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 81

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos de codificación del péptido TS/PP

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)_(81)

<400> 1

```

tac atg att gcg cac atc acg ggc ctg ttt ttg gac agc ctg gga ttc 48
Tyr Met Ile Ala His Ile Thr Gly Leu Phe Leu Asp Ser Leu Gly Phe
1 5 10 15
tcc acc act ttg gga gat gca cat att tac ctg 81
Ser Thr Thr Leu Gly Asp Ala His Ile Tyr Leu
20 25
    
```

25 <210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Construcción Sintética

<400> 2

```

Tyr Met Ile Ala His Ile Thr Gly Leu Phe Leu Asp Ser Leu Gly Phe
1 5 10 15
Ser Thr Thr Leu Gly Asp Ala His Ile Tyr Leu
20 25
    
```

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5

<223> Péptido de control sintético CAP-1

<400> 3

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Péptido multiepitope que consiste en la secuencia de aminoácidos del aminoácido 19 al aminoácido 27 de la Seq. ID Núm. 2 y del aminoácido 1 al aminoácido 9 de la Seq. ID Núm. 2 y del aminoácido 10 al aminoácido 18 de la Seq. ID Núm. 2 para uso médico.
- 5 2. Péptido, según la reivindicación 1 que consiste en la secuencia YMIAHITGLFLDSLGFSTTLGDAHIYL (Seq. ID Núm. 2).
3. Péptido que tiene la secuencia YMIAHITGLFLDSLGFSTTLGDAHIYL (Seq. ID Núm. 2).
- 10 4. Vector que comprende, y es capaz de expresar de forma eficaz en una célula eucariota, una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
5. Vector, según la reivindicación 4, cuya secuencia de nucleótidos es TACATGATTGCGCACATCACGGGCCTGTTTTGGACAGCCTGGGATTCTCCACC ACTTTGGGAGATGCACATATTTACCTG (Seq. ID Núm: 1)
- 15 6. Composición farmacéutica con actividad antitumoral preventiva que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido según las reivindicaciones 1 a 3, y excipientes adecuados y/o diluyentes y/o agentes solubilizantes.
7. Composición farmacéutica con actividad quimioterapéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido según las reivindicaciones 1 a 3, y excipientes adecuados y/o diluyentes y/o agentes solubilizantes.
- 20 8. Composición farmacéutica, según la reivindicación 6 ó 7, que comprende un fármaco activo antitumoral adicional.
9. Composición farmacéutica, según la reivindicación 8, en la que dicho ingrediente activo antitumoral adicional es 5-fluoracilo.
- 25 10. Método para obtener linfocitos T citotóxicos *in vitro* (CTL) activados para TS, que comprende las siguientes etapas:
- a) cultivar *in vitro* células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de un individuo y;
- 30 b) estimular *in vitro* dichas PBMC exponiéndolas a células dendríticas autólogas irradiadas expuestas previamente durante un tiempo oportuno a concentraciones eficaces del péptido según reivindicaciones 1 a 3.
11. Linfocitos T citotóxicos activados para TS obtenibles mediante el método según la reivindicación 10.
- 35 12. Linfocitos T citotóxicos activados para TS, según la reivindicación 11, para uso en inmunoterapia.

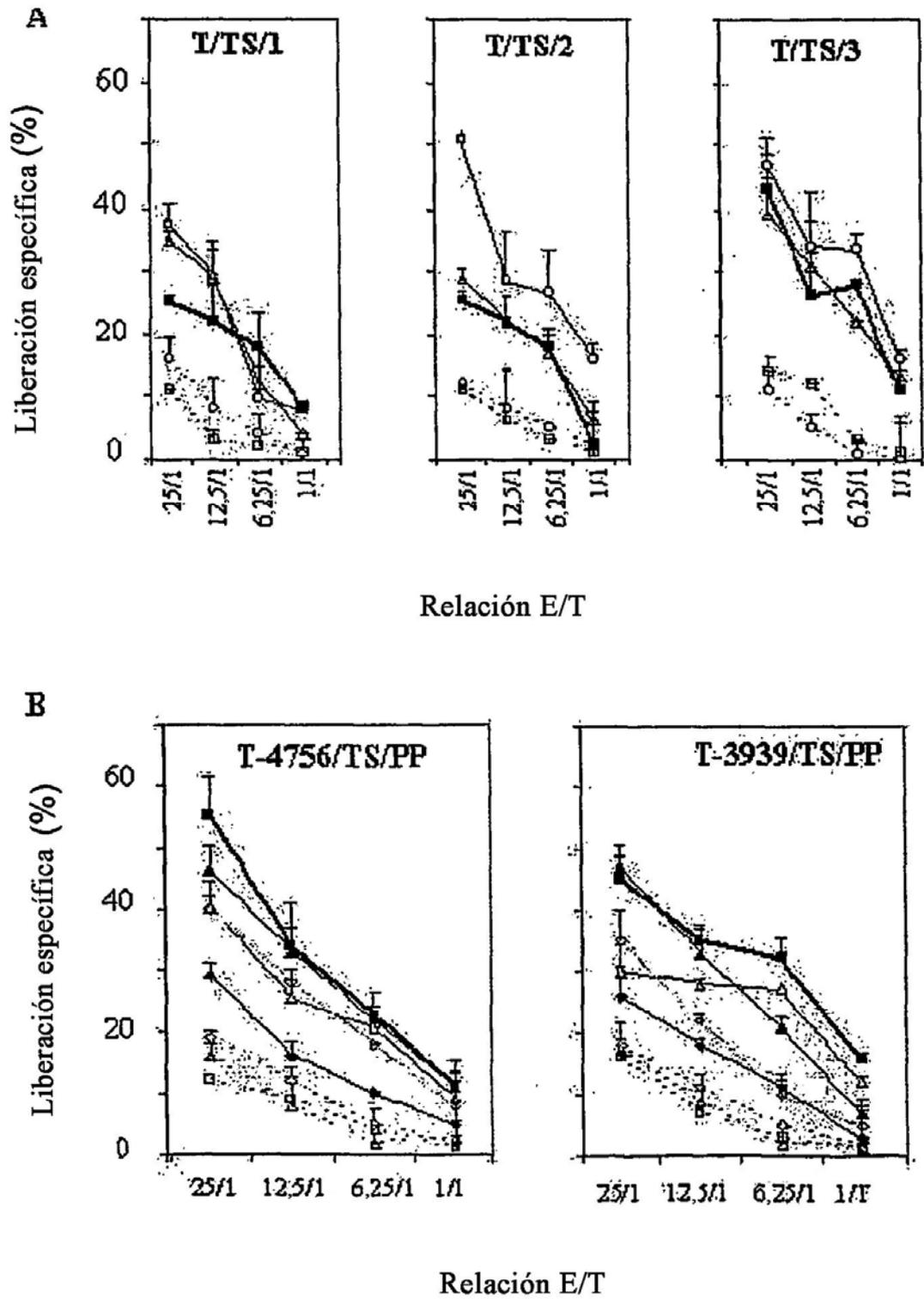


Fig. 1

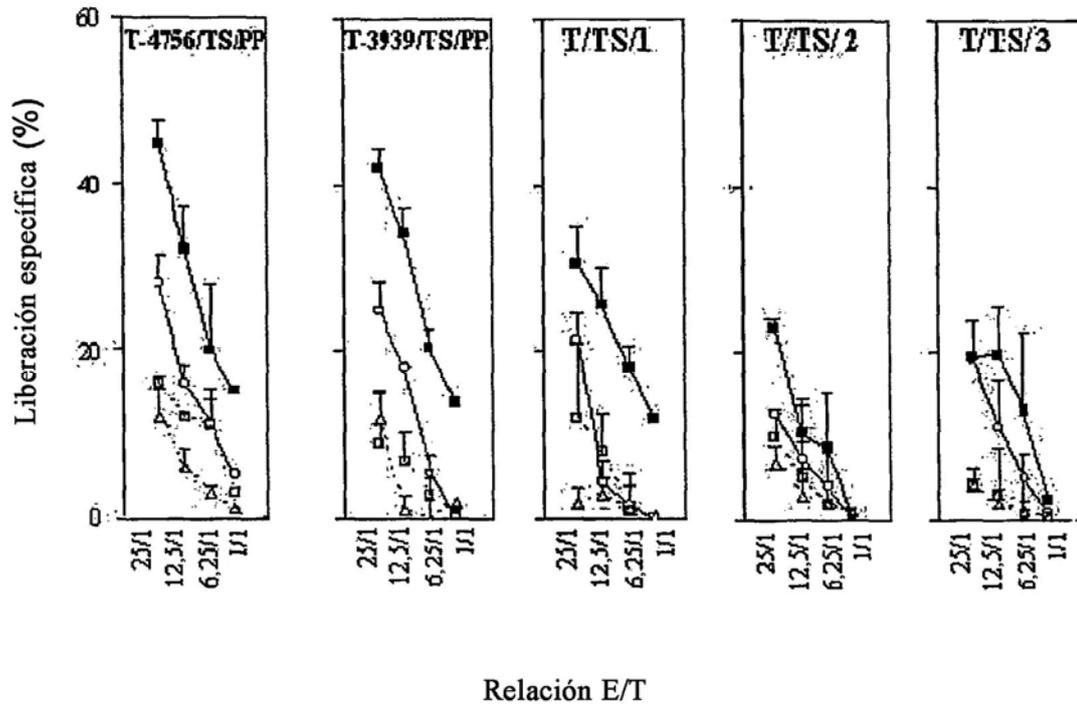


Fig. 2

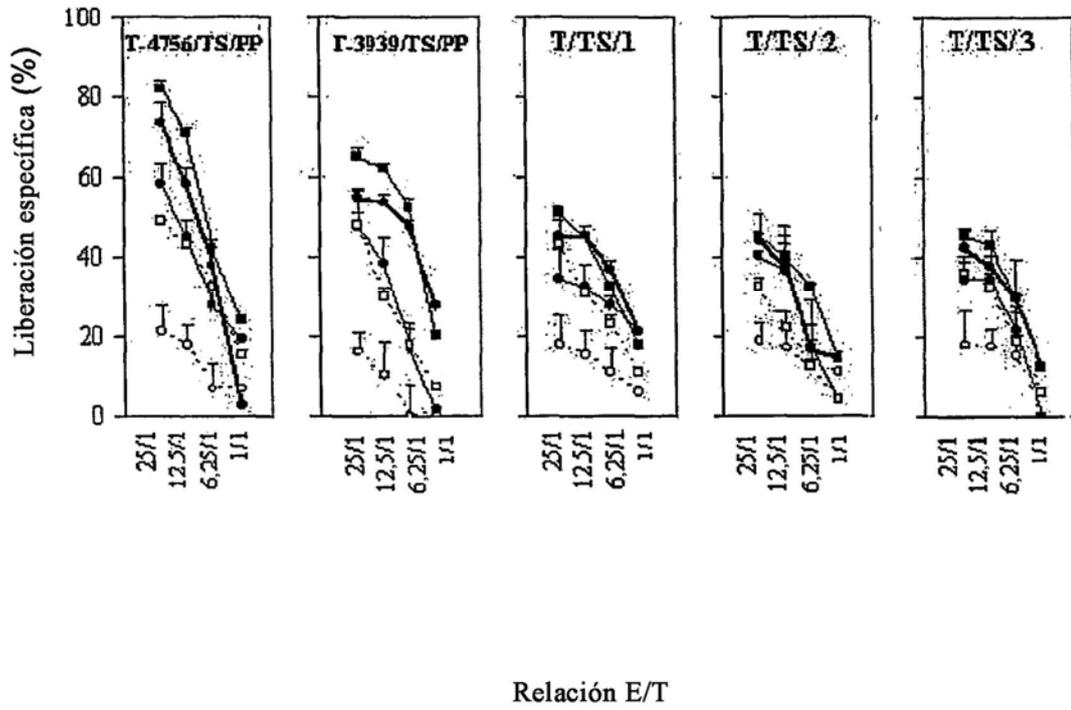


Fig. 3

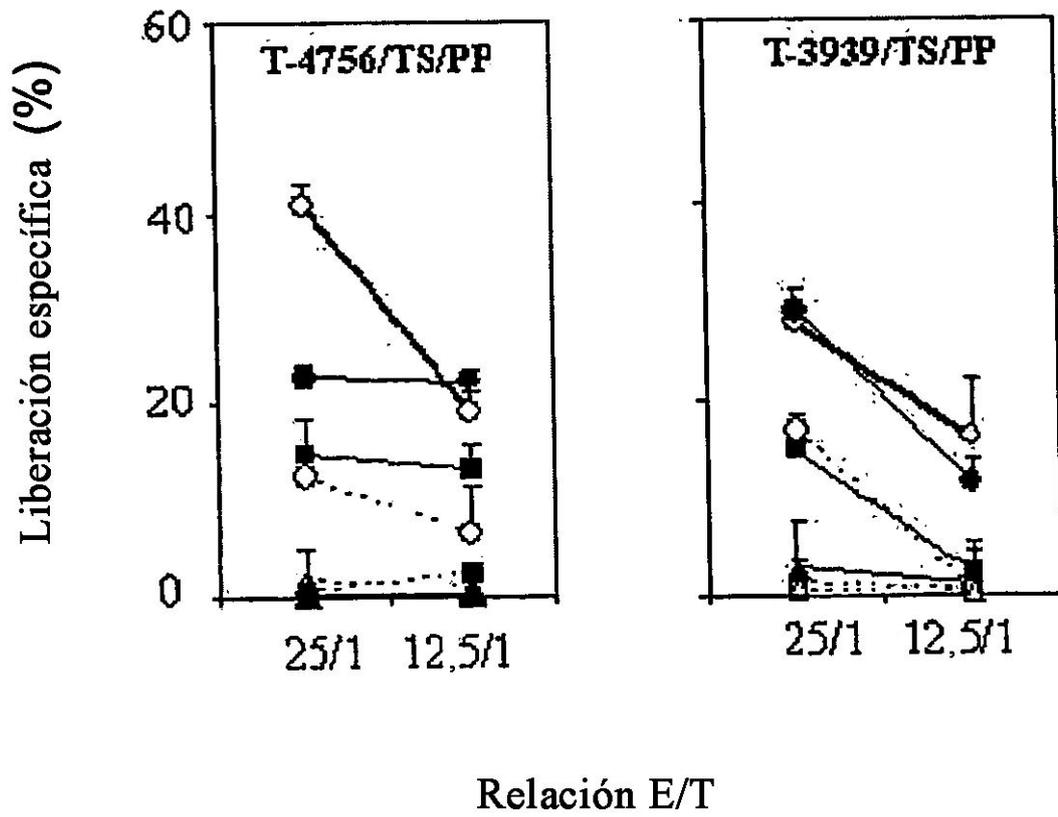


Fig. 4

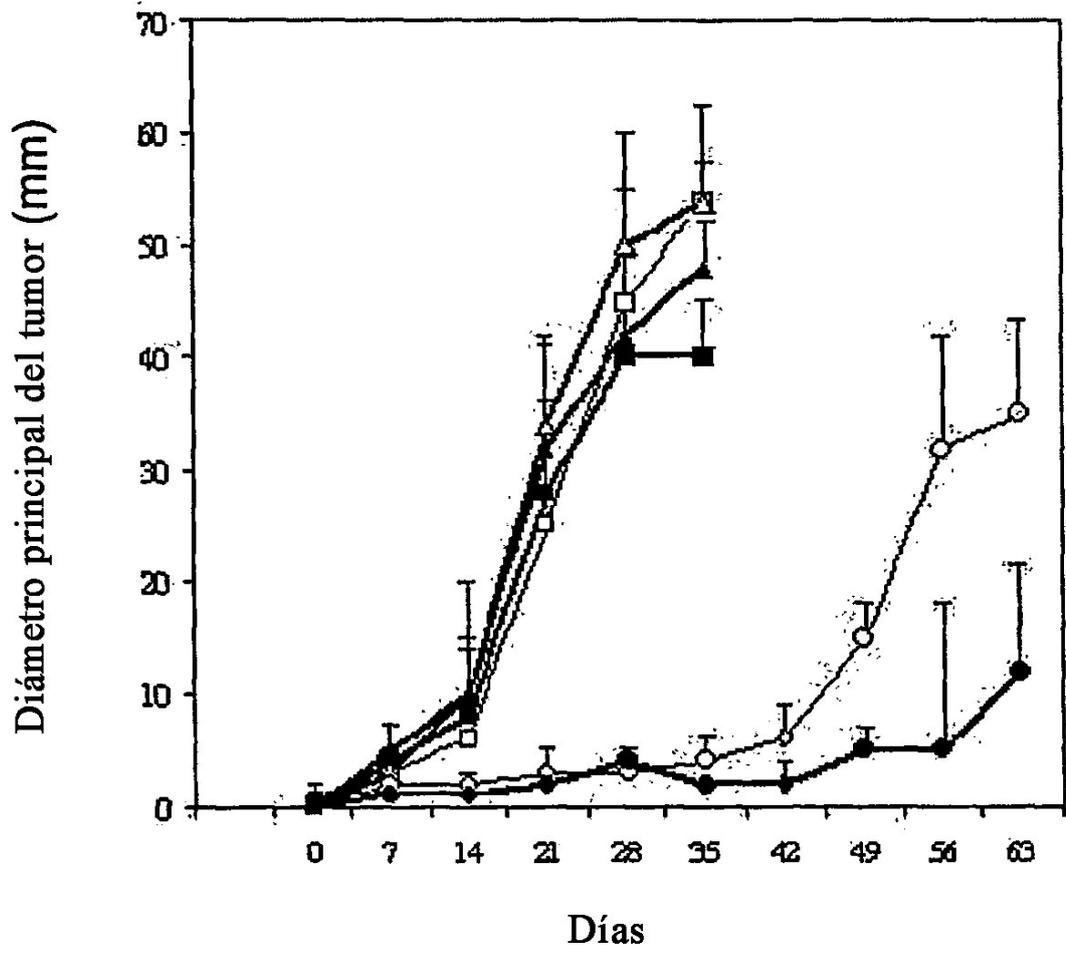


Fig. 5

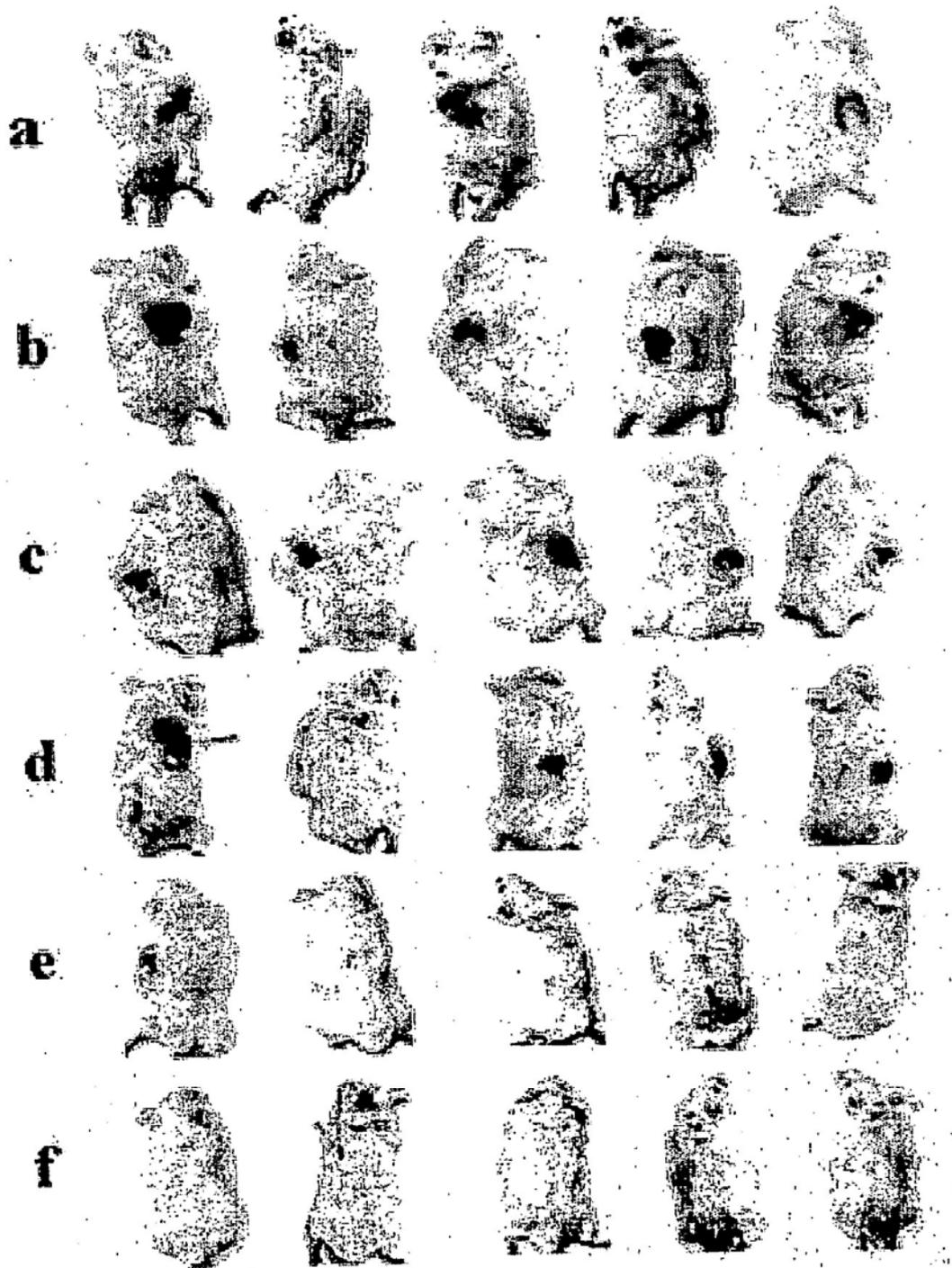


Fig. 6

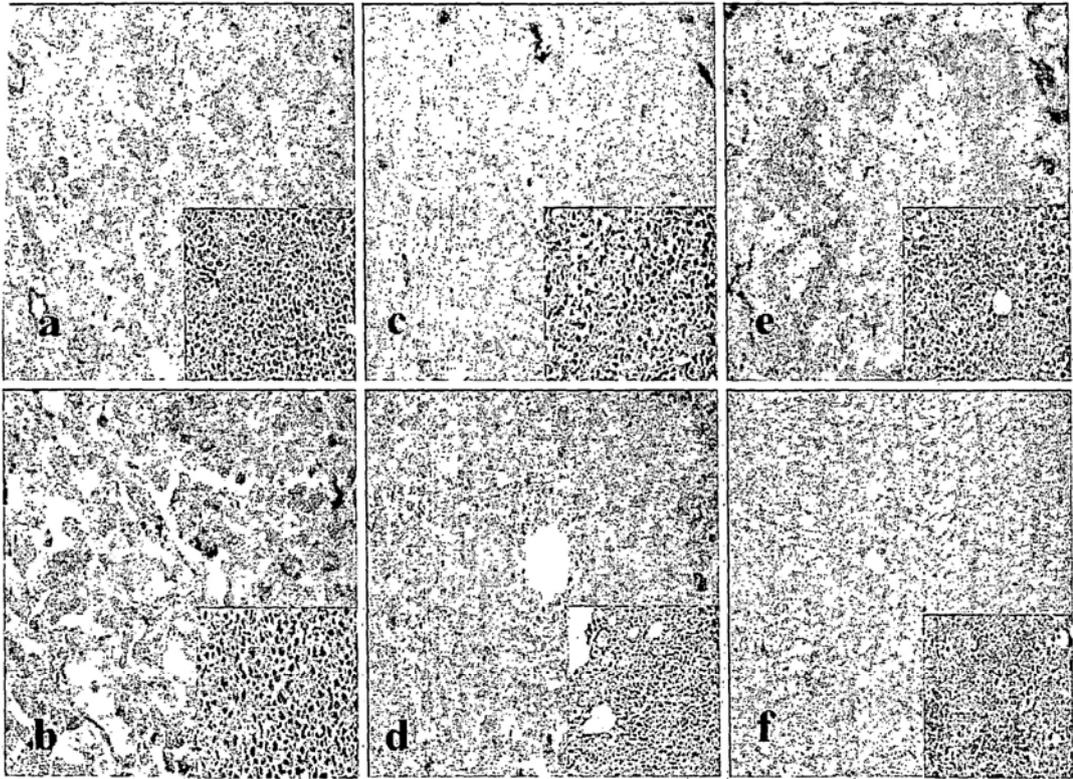


Fig. 7