



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 960**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05076809 .2**

96 Fecha de presentación : **07.05.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1634949**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Procedimiento para generar células T activadas y células presentadoras de antígenos pulsadas con antígenos.**

30 Prioridad: **08.05.1997 US 45949 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2011

73 Titular/es: **ONCOTHYREON Inc.**
2601 Fourth Avenue, Suite 500
Seattle, Washington 98121, US

72 Inventor/es: **Agrawal, Babita;**
Krantz, Mark J.;
Reddish, Mark A. y
Longenecker, Michael B.

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 357 960 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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las respuestas de células T restringidas al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) específicas contra antígenos son un componente importante de las respuestas inmunitarias frente a infecciones víricas y tumores. El diseño y desarrollo de una intervención inmunoterapéutica depende de la comprensión del antígeno diana, así como de su capacidad para ser presentado eficientemente a células T junto con moléculas de MHC clase I y clase II.

Con las técnicas modernas, es posible determinar la afinidad del péptido del antígeno diana por la hendidura de unión al antígeno de las moléculas de MHC clase I y clase II. Sin embargo, no es una tarea fácil predecir la inmunogenicidad de un péptido antigénico dado en la población humana exogámica, dados nuestros repertorios de células T variables. La complejidad aumenta aún más con ciertos antígenos tumorales que a menudo son reconocidos como péptidos "propios". De este modo, un gen que codifica un antígeno tumoral se expresará en células autólogas normales sin ningún cambio en la secuencia nucleotídica.

Muchos adenocarcinomas, tales como de mama, ovárico, pancreático, y colorrectal, son muy expresados en la superficie celular, y segregan mucina MUC-1 (glucosilada deficientemente) anormal. Como resultado de la glucosilación deficiente, la mucina MUC-1 en estos adenocarcinomas tiene epítomos peptídicos expuestos. Hull, *et al.*, (1989) Cancer Commun. 1:261-267; Burchell *et al.*, (1987) Cancer Res. 47:5476-5482. Esto contrasta con las células del epitelio ductal normales, en las que la mucina MUC-1 se expresa sobre la superficie apical y tiene un núcleo peptídico de una repetición en tándem conservada de 20 unidades de aminoácidos que está muy glucosilado y por lo tanto tiene un núcleo peptídico oculto (críptico). En esta situación normal, se cree que las regiones antigénicas de MUC-1 están inmunológicamente apantalladas.

Los epítomos peptídicos en las regiones de repetición en tándem del núcleo peptídico de mucina MUC-1 se han reconocido como antígenos diana potenciales para inmunoterapia de ciertos adenocarcinomas. Gendler *et al.*, (1988) J. Biol. Chem. 263: 12820-12823; Siddiqui *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2320-2323; Longenecker, *et al.*, (1993) Immunologists. 1:89-95. Se ha demostrado que las células T específicas del péptido MUC-1 tienen el potencial de eliminar células tumorales que poseen mucina MUC-1. Agrawal *et al.*, (1996) J. Immunol. 157. 2089-2095. También se han definido los siguientes epítomos peptídicos permisivos: (1) epítomo del núcleo peptídico de MUC-1 para la respuesta de células T CD4⁺ restringida a clase II, y (2) un epítomo que tiene la capacidad para unirse a HLA.A11, HLA.A2.1, HLA.A3 y HLA.A1 Agrawal *et al.*, (1995) Cancer Res. 55:2257-2261; Domenech *et al.*, (1995) J. Immunol. 155:4766-4774. La utilidad de estos péptidos como candidatos potenciales a vacunas para la inmunoterapia de diversos cánceres depende de su capacidad para generar respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ fuertes. Generalmente es factible determinar la inmunogenicidad de un péptido diana en ratones tras el cebado *in vivo*.

Se ha dado a conocer (Agrawal *et al.*, J. Immunol, y Agrawal *et al.*, Cancer Res., *más arriba*) que se aislaron células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas del péptido antigénico MUC-1 a partir de PBL obtenidos de donantes multíparos sanos, pero no de mujeres nulíparas o de hombres. Sin embargo, en esos estudios, los sujetos se cebaron *in vivo*, y las células T aisladas se estimularon *in vitro* con péptido antigénico MUC-1 soluble como antígeno.

La investigación reciente sugiere que se puede generar *in vitro* una respuesta primaria de linfocitos de células T (CTL) citotóxicos CD8⁺ mediante estimulación de células T con estirpes celulares T2 o RMA-S mutantes que se trataron, o "cargaron", con péptido. DeBruijn *et al.*, (1992) Eur. J. Immunol. 21:2963-2970; DeBruijn *et al.*, (1992) Eur. J. Immunol. 22:3013-3020; Stauss *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:7871-7875; Houbiers *et al.*, (1993) Eur. J. Immunol. 23:2072-2077. Como se usa en esta memoria descriptiva, un liposoma que se ha "cargado" con péptido es un producto formulado con antígeno peptídico asociado a la membrana y/o intravesicular. Tal "liposoma cargado" se usa como un vehículo de suministro para "cargar" células con antígeno peptídico. De este modo, una "célula cargada" es aquella que ha recibido efectivamente, o ha captado, antígeno peptídico. Una célula presentadora de antígenos (APC) cargada es aquella que ha captado antígeno peptídico y expresa el antígeno en la superficie celular en el contexto de moléculas de MHC clase I o clase II. Además, se demostró que se podían generar *in vitro* CTL específico del antígeno usando células de bazo murinas que tienen una concentración elevada de péptido exógeno. Alexander *et al.*, (1991) J. Exp. Med. 173:849-858; Carbone *et al.*, (1988) J. Exp. Med. 167:1767-1779.

Los péptidos solubles proporcionados exógenamente generalmente recorren la ruta de presentación endo-lisosómica para la presentación en el contexto de moléculas de MHC clase II. Townsend *et al.*, (1989) Annu. Rev. Immunol. 7:601-624; Unanue *et al.*, (1987) Science 236:551-557. Se mostró que los liposomas insensibles al pH sensibilizan las APC para la presentación restringida a clase II. Además, se ha demostrado que a concentración elevada de péptido antigénico encapsulado, un liposoma

insensible al pH puede suministrar antígeno a localizaciones tanto endocíticas como citoplásmicas para la presentación mediante moléculas tanto de MHC clase I como de MHC clase II. Harding *et al.*, (1991) J. Immunol. 147:2860-2863; Zhou *et al.*, (1994) Immunomethods 4:229-235.

5 Se ha demostrado que los PBL pulsados con péptidos solubles son incapaces de inducir células T primarias *in vitro*. Germain *et al.*, (1993) Annu. Rev. Immunol. 11:403-450. También se demostró que el antígeno encapsulado por liposomas era presentado eficientemente por DC, pero no por macrófagos, para estimular los CTL primarios. Nair *et al.*, (1993) J. Virol, 67:4062-4069. Sin embargo, la purificación y aislamiento de células dendríticas (DC) es una tarea difícil, y requiere un gran número de PBL o de células madre de la médula ósea.

10 Inicialmente, se consideró que las células dendríticas eran APC potenciales para cebar células T vírgenes ("naive"). Steinman, (1991) Annu. Rev. immunol. 9:271-296. Las células dendríticas se han usado como APC para la estimulación *in vitro* de respuestas primarias de CTL específicos de antígenos (DeBrujin *et al.*, Eur. J. Immunol. 22, más arriba, Nair *et al.*, más arriba); Macatonia *et al.*, (1989) J. Exp. Med. 169:1255-1264; Macatonia *et al.*, (1991) Immunology. 74:399-406; Mehta-Damani *et al.* (1994) J. Immunol. 153: 996-1003; Nair *et al.*, (1992) J. Exp. Med. 175:609-612. Se ha sugerido que las DC son capaces de una agregación intensa con células T sin cebar, y expresan una densidad elevada de moléculas accesorias, tales como B7.1 y B7.2. Tales moléculas accesorias son críticas para la estimulación de células T en reposo vírgenes (Steinman, más arriba). B7.1 es uno de los receptores de "segunda señal" denominados como moléculas coestimulantes. Es el ligando para CD28, y es crítico para la inducción de respuestas T_H1. B7.2 es también un ligando para CD28, y está asociado con respuestas T_H2. También se incluye en la categoría de moléculas coestimulantes 1CAM-1, que es el ligando natural de LFA, pero también se demuestra que se une a MUC-1. Reginbald *et al.*, (1996) Cancer Res. 56:4244.

25 Sin embargo, las DC no son buenas candidatas para (I) determinar la inmunogenicidad de diversos péptidos para inmunoterapia, y (II) estimular células T para la expansión para terapia celular adoptiva. A este respecto, la técnica anterior se refiere a la generación de respuestas de CTL CD8⁺ específicas de antígenos usando DC. La técnica anterior no sugiere cómo generar respuestas CTL CD4⁺ específicas de antígenos. El experto en la materia reconocerá que existen células T citotóxicas CD4⁺ que vía la presentación peptídica restringida a clase II. Además, la técnica no sugiere cómo generar una mezcla de células T específicas de antígenos que sean CD8⁺ (T citotóxicas) y CD4⁺ (T auxiliares).

30 El documento WO 96/40066 describe un péptido MUC-1 no lipidado. Samuel *et al* (1998), International Journal of Cancer 75(2): 295-302 describe cómo estimular la inmunogenicidad incorporando un adyuvante lipídico en un liposoma, el cual también contiene un péptido MUC-1 sin lipidar. Shahum *et al* (1998), Immunology 65(2): 315-317 estudia la potenciación de la respuesta humoral a BSA cuando se encapsulan liposomas o se enlaza covalentemente a un liposoma.

35 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un péptido MUC-1 modificado covalentemente con un resto lipídico, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

40 **Figura 1:** Respuesta proliferativa de células T procedentes de linfocitos de sangre periférica de diversos donantes normales frente al antígeno BLP-25 encapsulado con liposomas.

La respuesta de células T de un total de 17 donantes se categorizó en (1A) elevada, (1B) media y (1C) sin respuesta. El ensayo de proliferación se realizó según materiales y procedimientos. Las células T se hicieron crecer en presencia de APC autólogas cargadas con liposomas que contienen BLP-25 a 1 µg □, 10 µg ○ y 100 µg ●.

45 **Figura 2:** Experimento representativo de una respuesta proliferativa de células T de tres donantes normales que responden muy bien. Estas células T se hicieron crecer en presencia de péptido soluble BLP-25 y APC autólogas. La respuesta proliferativa de células T se determinó frente a péptido soluble en presencia de APC autólogas. Las células T se hicieron crecer en presencia de 1 µg □, 10 µg ○ y 100 µg ● de BLP-25 y APC autólogas.

50 **Figura 3:** Especificidad antigénica de las células T estimuladas con APC autólogas cargadas con BLP-25 liposómico. Las células T aisladas de los PBL de donantes normales se cultivaron en presencia de PBL autólogos cargados con liposomas que contienen BLP-25 (10 µg) durante dos semanas (como se afirma en materiales y procedimientos). Estas células T se evaluaron en busca de su respuesta proliferativa frente a (3A) péptido antigénico liposómico o (3B) APC autólogas cargadas con péptido soluble. Como control de antígeno irrelevante, se usó en forma soluble un péptido de 24 aminoácidos de HLA.Aw68.1 (restos 61-84).

55 **Figura 4:** Bloqueo de la respuesta proliferativa de células T específica del péptido antigénico por

los MAb específicos frente a CD4, CD8 y moléculas MHC clase I. Todos los MAb bloqueantes y al anticuerpo de control isotópico se usaron a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. Las células T se cultivaron en presencia de APC autólogas cargadas con BLP-25 (10 μg) durante dos semanas como se explica en materiales y procedimientos, y la respuesta proliferativa se examinó frente a las APC autólogas cargadas con BLP-25 (10 μg) con o sin anticuerpos o con APC cargadas con liposomas que contienen el péptido de control BLP-24M.

Figura 5A: El fenotipo de células T cultivadas con BLP-25 liposómico (10 μg) cargado en APC autólogas. Se observó la presencia de células T tanto CD4+ como CD8+. Todas las células T fueron CD28+. Los paneles superior (I) e inferior (II) representan datos de células T cultivadas procedentes de dos donantes diferentes.

Figura 5B: Fenotipo (TCR y moléculas de activación) de células T cultivadas en presencia de APC autólogas que contienen liposomas vacíos (Panel Izquierdo I, sin antígeno) o liposomas que contienen BLP-25 (10 μg) (Panel Derecho II). Los mayores porcentajes de células T CD25+ y CD69+ en el Panel II en comparación con el Panel I representan la estimulación específica de antígenos de estas células.

Los marcadores en todas las gráficas de transferencia de punto se ajustan de una manera tal para excluir > 98% de células teñidas con el anticuerpo de control isotópico, tratadas de manera similar (datos de control isotópico no mostrados). Se llevó a cabo la tinción con LeukoGATE (CD14/CD45) y TCR (CD3/ $\alpha\beta$) para asegurar la identidad de las células cultivadas.

Figura 6A: Aumento de la expresión de HLA.A2 en células mutantes T2 mediante péptidos MUC-1 STAPPAHGV y SAPDTRPAP. Como control positivo se usó SIINFEKL, y como control negativo para el aumento de HLA-A2 se usó el péptido H-2Kb (61-69). El eje X representa la intensidad de la fluorescencia, y el eje Y representa el número de células. Los marcadores M1 y M2 se ajustaron para examinar visualmente el incremento de expresión de HLA.A2. En cada histograma se muestra la intensidad media del canal (MCI).

Figura 6B: Actividad citotóxica de células T cultivadas con BLP-25 liposómico (10 μg) cargado en APC autólogas. Los tres donantes fueron HLA.A2⁺. Las dianas fueron T2 cargadas con los péptidos indicados. De cada punto de dato, se ha restado la liberación de ⁵¹Cr de las células T2 cargadas con SIINFEKL del control negativo.

Figura 6C: MAb anti-HLA clase I (W6/32) inhibe la muerte por células T (procedentes del donante n° 2) de células T2 cargadas con STAPPAHGV. Este experimento de bloqueo se llevó a cabo en los donantes n° 1 y n° 3, con resultados similares. El anticuerpo de control isotópico estaba a la misma concentración que W6/32.

Figura 7: Cromatograma de RP-HPLC primario que muestra la reactividad de BCP8 a una elución de 18-22 minutos según se detecta revistiendo fracciones diluidas sobre fases sólidas. El MAb de BCP8 unido se detectó vía ELISA a base de $G_{\alpha}M_{19}G_{2b}HRP$. Las moléculas de HLA clase I derivadas de MCF-7 (purificadas con W6/32) se eluyeron con ácido y se sometieron a RP-HPLC usando una matriz ZORBAX C8.

Figura 8: Resultados de RP-HPLC secundario con Zorbax C8 del pico de 17 min. identificado como reactivo a BCP8 en la Fig. 1. Reactividad fuerte a BCP8 a 16-19 min. en RP-HPLC secundaria de fracciones positivas a BCP8 reunidas.

Figura 9: Inhibición de la unión de BCP8 a los péptidos aislados mediante péptidos MUC-1 sintéticos.

Figura 10: La muestra se obtuvo mediante aislamiento por afinidad con BCP8 del pico de 17-19 min. obtenido de la RP-HPLC secundaria. Los péptidos aislados por afinidad se eluyeron con ácido a partir de BCP8 y se volvieron a cromatografiar en ZORBAX C8. Espectro de masas por electropulverización que muestra tres fragmentos, eluidos a partir de las proteínas de MHC clase I, que se supone que son los productos de degradación de una secuencia más larga, durante la elución con ácido. Estos fragmentos fueron sólo los relacionados con mucina MUC-1 (a partir de los datos de secuencias, no mostrados), mientras que los otros fueron de origen desconocido.

Figura 11: Cambio en la intensidad media del canal (δMCI) ($= \text{MCI}_{(\text{muestra})} - \text{MCI}_{(\text{control no alimentado})}$) de la fluorescencia medida en células T2 con el anticuerpo monoclonal MA2.1 (anti-HLA.A2.1), en un procedimiento de tinción indirecta. Se cultivaron 3×10^5 células T2 toda la noche con 40 μmoles de 9 mer o 10 mer sintético procedente de la repetición en tándem de MUC-1, en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de $\beta 2$ -microglobulina. También se muestran el péptido de control positivo FLPSDYFPSV $\delta\text{MCI} = 951,3$. FLPSDYFPSV

Figura 12: Actividad citotóxica de células T estimuladas con péptido MUC-1. Los datos se muestran con tres donantes HLA.A2⁺.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 La presente invención se refiere a la generación de células T activadas. Diferentes formas de realización implican generar células activadas usando (a) células T anérgicas vírgenes, o mezclas de ambas, (b) antígeno encapsulado en liposomas, y (c) linfocitos de sangre periférica completa (PBL) autólogos como células presentadoras de antígenos.

10 En una forma de realización preferida, la invención se refiere a la producción de una población de células T CD4⁺ y CD8⁺ activadas, específicas del péptido MUC-1, que se generan *in vitro* activando células T vírgenes con PBL (como APC) que se cargaron previamente con antígenos peptídicos encapsulados en liposomas. Típicamente, las células T CD4⁺ y CD8⁺ resultantes específicas de antígenos tienen moléculas de superficie asociadas con células T activadas, y producen una concentración elevada de γ -IFN y una concentración moderada de IL-10 en el cultivo, pero sólo cantidades en trazas de IL-4.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula T activada" es la que está en las siguientes fases del ciclo celular: la fase G₁, la fase S, la fase G₂ o la fase M (mitosis). De este modo, una "célula T activada" sufre mitosis y/o división celular. Una célula T activada puede ser una célula T auxiliar (T_H) o una célula citotóxica (linfocito T citotóxico (CTL o T_C)). La activación de una célula T virgen se puede iniciar por exposición de tal célula a una APC (que contiene complejos antígeno/MHC) y a una molécula tal como IL-1, IL-2, IL-12, IL-13, γ -IFN, y linfocinas similares. El complejo antígeno/MHC
20 interacciona con un receptor sobre la superficie T (receptor de células T (TCR)). Golub *et al.*, eds. IMMUNOLOGY: A SYNTHESIS Capítulo 2: "The T-cell Receptor" (1991).

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "cebar" hace referencia a que se expone un animal (incluyendo un ser humano) o células cultivadas a antígeno, de una manera tal que da como resultado la activación y/o memoria. La generación de respuestas de células T Cd4⁺ y CD8⁺ frente a un antígeno diana depende habitualmente del cebado *in vivo*, ya sea a través de infección natural o a través de inmunización deliberada.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, una célula T virgen es la que no se ha expuesto a ningún antígeno extraño (antígeno no autólogo), o aquella que se ha expuesto a un antígeno autólogo críptico. Algunas veces, una célula T virgen se denomina una célula T "no cebada". El experto en la materia reconocerá que una célula "en reposo" está en la fase G₀ del ciclo celular, y por tanto no se divide ni sufre mitosis. El experto en la materia también reconocerá que una célula T "anérgica" es aquella que es incapaz de funcionar apropiadamente, es decir, tal como una célula que carece de la capacidad para mediar la respuesta inmunitaria normal. Las células T de pacientes enfermos pueden contener células T que han sido cebadas, pero son anérgicas.

35 El experto en la materia reconocerá que también se pueden usar moléculas accesorias adecuadas para la activación de células T. Una molécula accesoria es una molécula que facilita la interacción antígeno-MHC con el receptor de la célula T. Las moléculas accesorias tienen una variedad de papeles, incluyendo, pero sin limitarse a, facilitar o potenciar la unión inicial, estabilizar la unión, la transducción de señales y la separación. Los ejemplos de tales moléculas accesorias incluyen, pero no se limitan a, B7.1 (se une a CD28); B7.2 (se une a CD28); e ICAM-1 (se une a LFA-1).
40

45 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a la generación de células T activadas usando células T vírgenes, células T de memoria, y células T anérgicas, o una mezcla de los tres tipos celulares, junto con antígeno encapsulado en liposomas y linfocitos de sangre periférica humana (PBL) autólogos como células presentadoras de antígenos. Como se usa en esta memoria descriptiva, "células T de memoria", también conocidas como células T de "fenotipo de memoria", se usa para denominar una clase de células T que han encontrado previamente un antígeno peptídico pero ahora están en reposo y son capaces de ser activadas. Las células T de memoria son células T que se han expuesto a antígeno y después sobreviven durante períodos prolongados en el cuerpo sin la presencia del antígeno estimulante. Sin embargo, estas células T de memoria responden a antígenos de "recuerdo".

50 En general, las células T de memoria son más sensibles a un antígeno de "recuerdo", cuando se comparan con la respuesta de células T vírgenes al antígeno peptídico. Las células de memoria se pueden reconocer por la presencia de ciertos antígenos de la superficie celular, tales como CD45R0, CD58, CD11 α , CD29, CD44 y CD26, que son marcadores para células T diferenciadas.

55 Las células T de memoria se aíslan por técnicas bien conocidas por el experto en la materia. De forma breve, la población de células T total se aísla, seguido de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) usando anticuerpos monoclonales anti-CD45R0, anti-CD44 o anti-CD26. Véanse Hollsberg *et al.*, (1993) Cellular Immunology 149:170; Bruno *et al.*, (1995) Immunity 2(1):37; y (1993) Journal of Immunology 150 (parte 1):3119.

A. Antígenos

1. Antígenos generalmente útiles

Las respuestas de células T CD4⁺ y CD8⁺ restringidas a MHC clase II y I específicas de antígenos son respuestas inmunitarias importantes del hospedante frente a una variedad de afecciones patógenas. Por lo tanto, es de particular interés la generación de una respuesta de células T específica del antígeno. Como se usa en esta memoria descriptiva, una respuesta de células T "específica de antígenos" es una respuesta de células T (proliferativa, citotóxica, secreción de citocinas) a un estímulo antigénico dado, tal como un péptido, que no es evidente con otros estímulos, tales como péptidos con diferentes secuencias de aminoácidos (péptidos de control). La sensibilidad de la célula T se mide evaluando la aparición de moléculas de la superficie celular que son características de la activación de células T, incluyendo, pero sin limitarse a, CD25 y CD69. Tales ensayos son conocidos en la técnica.

Los presentes procedimientos se aplican generalmente a una gran variedad de antígenos. Estos antígenos pueden ser de casi cualquier constitución química, en tanto sean capaces de provocar una respuesta inmunitaria específica de células T; pueden contener por lo menos un epítipo específico de la célula T. Los antígenos ejemplares pueden derivar de péptidos, hidratos de carbono, lípidos, y especialmente combinaciones de los mismos. Los antígenos particularmente importantes son péptidos, lipopéptidos y glucopéptidos. Se incluyen específicamente antígenos idiotípicos y antiidiotípicos.

Los antígenos contra los cuales sería muy ventajoso usar los procedimientos en cuestión incluyen antígenos tumorales. Los antígenos tumorales son habitualmente antígenos nativos o extraños que están correlacionados con la presencia de un tumor. En tanto que los antígenos tumorales son útiles para diferenciar tejido anormal del normal, son útiles no sólo en el diagnóstico, sino también como una diana para la intervención terapéutica. De este modo, el uso de los presentes procedimientos para generar una respuesta inmunitaria específica de células T frente a antígenos tumorales es un aspecto importante de la invención.

Los antígenos tumorales son bien conocidos en la técnica. De hecho, varios ejemplos están bien caracterizados y actualmente son el foco de gran interés en la generación de terapias específicas de tumores. Los ejemplos no limitantes de antígenos tumorales son antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata (PSA), antígenos de melanoma (MAGE, BAGE, GAGE), y mucinas, tales como MUC-1.

El antígeno de mucina MUC-1 se ha reconocido como una diana inmunoterapéutica potencial para generar inmunidad frente a un número de adenocarcinomas. Longenecker *et al.*, (1993) *Immunologists* 1:89. De este modo, una realización de la invención se refiere a un "derivado de MUC-1" que es capaz de unirse a una de las moléculas de clase I y clase II o a ambas moléculas sobre la superficie de una APC.

"Derivados de MUC-1" son típicamente péptidos o están basados en péptidos. En una forma de realización, este péptido comprende una repetición en tándem central de MUC-1. En todavía otra realización, la invención se refiere a un péptido de 25 aminoácidos de esta región central que tiene la secuencia: STAPPAHGVTSPADTRPAPGSTAPP. Esta región central también se puede modificar, como se describe con detalle a continuación, de manera tal que el derivador retiene la característica de la activación de células T.

Un derivado de MUC-1 puede ser un fragmento de la proteína MUC-1. Tales fragmentos pueden estar glucosilados o no glucosilados. Según la presente invención, los fragmentos de la invención se pueden obtener a partir de MUC-1 pura o MUC-1 producida mediante metodología de ADN recombinante, usando procedimientos que incluyen digestión con proteasas, tales como pepsina o papaína. Por supuesto, los fragmentos de MUC-1 también se pueden obtener directamente por procedimientos recombinantes. Además, los fragmentos de MUC-1 comprendidos por la presente invención se pueden sintetizar usando un sintetizador de péptidos automatizado, tal como los suministrados comercialmente por Applied Biosystems, Multiple Peptide Systems y otros, o se pueden producir manualmente, usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase Geysen *et al.*, *J. Immunol. Methods* 102: 259 (1978).

Los derivados de MUC-1 también incluyen péptidos sintéticos glucosilados o no glucosilados. Además, los derivados de MUC-1 dentro de la presente invención incluyen fragmentos de MUC-1 resistentes a la escisión proteolítica, o fragmentos de MUC-1 que contienen uno o más aminoácidos no naturales, tales como D-aminoácidos. Se espera que tales derivados obtendrían el beneficio de incrementar la semivida circulante, a la vez que retienen el beneficio de la especificidad por células T.

En otra forma de realización, el derivado de MUC-1 podría incluir una porción de la región de repetición en tándem extracelular de MUC-1, con la secuencia de aminoácidos DTR (Asp-Thr-Arg) o DTRP (Asp-Thr-Arg-Pro). Preferentemente, esto incluye la secuencia SAPDTRP (Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro). Un péptido particularmente preferido es TSAPDTRPA.

Algunos derivados de MUC-1 preferidos consisten esencialmente en una repetición central peptídica de la mucina MUC-1. Una repetición central peptídica de MUC-1 en la molécula de MUC-1 nativa comprende la secuencia de 20 aminoácidos PDTRPAPGSTAPPAHGVTS (Pro-Asp-Arg-Thr-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala). Los derivados sintéticos útiles incluyen “permutaciones lineales” de esta secuencia, por ejemplo GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH o TSAPDTRPAPGSTAPPAHGV, en las que la repetición apenas comienza con GVTS o TSAP, en lugar de PDTR. También son posibles otras permutaciones análogas.

Además, uno o más aminoácidos de la secuencia central se puede alterar, preferentemente de manera conservativa conocida en la técnica, de manera que se mantenga el requisito de actividad activante de células T. Las sustituciones típicas se pueden hacer entre los siguientes grupos de aminoácidos: (a) G, A, V, L y I; (b) G y P; (c) S, C, T, M; (d) F, Y, y W; (e) H, K y R; y (f) D, E, N, y Q. Se pueden hacer algunas sustituciones preferidas entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L y I.

Otros derivados de MUC-1 consisten esencialmente en una repetición central peptídica truncada de la mucina MUC-1, por ejemplo GVTSAPDTRPAPGSTA. Por supuesto, esta secuencia central truncada se puede permutar y alterar de otro modo como se describe anteriormente.

Algunas formas de realización contemplan multímeros de las repeticiones centrales y sus derivados (como se describe anteriormente). Los multímeros pueden contener múltiples copias de la misma repetición central o derivado, o se pueden mezclar y emparejar. Estos multímeros, aunque no estrictamente limitados en tamaño, perderán habitualmente sus características inmunoestimulantes, y de hecho pueden provocar inmunosupresión, al aumentar los números de repeticiones. Por lo tanto, es preferible que el número de repeticiones usadas sea menor que tres. Algunos derivados de MUC-1 preferidos comprenden de una a tres copias de un péptido de 7-20 aminoácidos de longitud derivado del péptido central de MUC-1, STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP.

Como se describe anteriormente, estos derivados de MUC-1 preferidos pueden ser glucosilados o parcialmente glucosilados según procedimientos conocidos en la técnica. Además, se contempla que MUC-1 y los derivados de MUC-1 se puedan modificar con polímeros de gran peso molecular, tales como polietilenglicoles. Además, se prefieren modificaciones lipídicas, debido a que pueden facilitar el encapsulamiento o interacción del derivado con liposomas. Los restos lipídicos ejemplares útiles para este fin incluyen, pero no se limitan a, grupos palmitoilo, miristoilo, estearoilo y decanoilo, o, más generalmente, cualquier grupo acilo graso saturado, monoinsaturado o poliinsaturado, de C₂ a C₃₀.

Por conveniencia a la hora de realizar modificaciones químicas, algunas veces es útil incluir en un péptido MUC-1 uno o más aminoácidos que tienen una cadena lateral susceptible de ser modificada. Un aminoácido preferido es lisina, que se puede modificar fácilmente en el grupo ε-amino. Los carboxilos de cadena lateral de aspartato y glutamato se modifican fácilmente, como son los grupos hidroxilo de serina, treonina y tirosina, el grupo sulfhidrilo de cisteína, y el grupo amino de histidina.

También ilustrativo de un derivado de MUC-1 dentro de la presente invención es un “mimético” no peptídico, es decir, un compuesto que imita una o más características funcionales de la proteína MUC-1. Los miméticos son generalmente solubles en agua, resistentes a la proteólisis, y no inmunógenos. Los péptidos orgánicos típicos, conformacionalmente restringidos, que imitan a MUC-1 se pueden producir según procedimientos conocidos, descritos, por ejemplo, por Saragovi, *et al.*, Science 253: 792 (1991).

También se contemplan “derivados de hidratos de carbono de MUC-1”. Tal derivado, como se usa aquí, se refiere a un glucopéptido que retiene la característica inmunoestimulante de derivados de MUC-1. Tal derivado de hidrato de carbono puede incluir todo o parte del hidrato de carbono que está unido a la proteína MUC-1. También se pueden usar miméticos que imitan por lo menos una propiedad de hidrato de carbono de MUC-1.

El experto en la materia reconocerá que se pueden usar otros antígenos para la generación de células T activadas. Los ejemplos de tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos peptídicos no propios (extraños), y antígenos peptídicos procedentes de un virus, tumor, bacteria u otro parásito.

2. Identificación de otros antígenos útiles

Aunque se pueden identificar antígenos completos útiles en los presentes procedimientos usando metodologías reconocidas para medir diversas respuestas de células T, es interesante generar una respuesta más específica, asociada con un epítipo particular. Este enfoque permite el uso de estímulos antigénicos mucho más pequeños, y de este modo producidos de forma más económica. Por tanto, los antígenos preferidos son moléculas pequeñas, típicamente péptidos o derivados peptídicos del orden de menos de aproximadamente 100 aminoácidos, y habitualmente menos de aproximadamente 60 aminoácidos.

Según procedimientos conocidos en la técnica, una vez que se ha identificado un antígeno nativo (grande), se puede refinar posteriormente su antigenicidad a uno o unos pocos epítomos específicos. Un procedimiento clásico implica el tratamiento proteolítico del antígeno grande para obtener antígenos más pequeños. Además, se pueden producir fragmentos de antígenos proteicos mediante técnicas de ADN recombinante, y se pueden estudiar para identificar epítomos particulares. Además, se pueden producir péptidos pequeños mediante péptidos sintéticos *in vitro*, y se pueden evaluar.

Como una alternativa al enfoque aleatorio de obtener partes del antígeno intacto y luego ensayarlas, es posible un enfoque biológicamente más relevante. Específicamente, puesto que los fragmentos antigénicos que se unen a las moléculas de MHC clase I y/o clase II son de particular importancia, un enfoque ejemplar es aislar las propias moléculas de MHC, y después aislar los péptidos asociados con ellas. Generalmente, este procedimiento funciona bien para definir adicionalmente epítomos particularmente útiles de antígenos tumorales.

En un procedimiento típico, se proporcionan células tumorales primarias o una estirpe celular que expresa el antígeno de interés. Además, se reconocerá que se pueden alimentar grandes antígenos (o sus porciones) a células presentadoras de antígenos fagocíticas (o cualquier APC), tales como macrófagos, y de este modo actuar como el material de partida para estos procedimientos. Las moléculas de MHC clase I o clase II se pueden aislar a partir de estas células de partida usando procedimientos conocidos, tal como afinidad por el anticuerpo (anticuerpos específicos del MHC) y técnicas cromatográficas.

Las moléculas de MHC aisladas se tratan entonces para liberar los péptidos unidos. Esto se puede lograr por tratamiento con agentes que destruyen las interacciones entre el péptido unido y la molécula de MHC, por ejemplo detergente, urea, cloruro de guanidinio, cationes divalentes, diversas sales y extremos de pH. Los péptidos liberados se pueden purificar posteriormente usando metodologías cromatográficas convencionales y de afinidad por anticuerpos (usando un anticuerpo específico del antígeno). Los péptidos purificados se pueden someter entonces a determinaciones de secuencia y de estructura, usando por ejemplo secuenciación peptídica, cromatografía de gases y/o espectroscopía de masas.

De esta manera, se pueden determinar las secuencias/estructuras de los epítomos peptídicos más prevalentes asociados con moléculas de clase I y/o clase II. Perteneciendo con esta información de secuencia/estructural, se pueden realizar, como se detalla anteriormente, permutaciones de la secuencia determinada, y se pueden evaluar usando ensayos de células T conocidos.

En un ejemplo presentado a continuación, esta metodología se aplicó al sistema de MUC-1. Se identificó una secuencia 7-mer TSAPDTR, que corresponde a parte de la repetición central de MUC-1, como un péptido prevalente asociado con clase I. Se realizaron permutaciones lineales de esta secuencia peptídica, que incluyeron: GVTSAPDTR, VTSAPDTRP, TSAPDTRPA, SAPDTRPAP, APDTRPAPG, PDTRPAPGS y DTRPAPGST. Cada una de estas se evaluó para determinar una respuesta de célula T citotóxica específica de MUC-1, y se encontró que TSAPDTRPA se comportó excepcionalmente bien. De este modo, esta secuencia representa un antígeno preferido para generar células T activadas específicas de MUC-1 según la invención.

B. Antígeno encapsulado en liposomas

En una forma de realización de la invención, el antígeno se encapsula en un liposoma. Las técnicas para la preparación de liposomas y el encapsulamiento de diversas moléculas, incluyendo péptidos, en liposomas son bien conocidas para el experto en la materia. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean a compartimientos acuosos. Véase, generalmente, Bakker-Woudenberg *et al.*, (1993) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1): S61, y Kim, (1993) Drugs 46: 618. Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares, y, como resultado, los liposomas se pueden administrar generalmente de forma segura y son biodegradables.

Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilaminares o multilaminares, y pueden variar en tamaño, oscilando los diámetros desde 0,02 μm hasta mayor que 10 μm . Se puede encapsular una variedad de agentes en los liposomas. Los agentes hidrófobos se reparten en las bicapas, y los agentes hidrófilos se reparten en el espacio o espacios acuosos internos. Véanse, por ejemplo, Machy *et al.*, LIPOSOMES IN CELL BIOLOGY AND PHARMACOLOGY (John Libbey 1987), y Ostro *et al.*, (1989) American J. Hosp. Pharm. 46: 1576.

Los liposomas pueden absorber casi virtualmente cualquier tipo de célula, y después liberar el agente encapsulado. Como alternativa, el liposoma se fusiona con la célula diana, con lo que los contenidos del liposoma se vacían en la célula diana. Como alternativa, un liposoma absorbido puede ser endocitado por células que son fagocíticas. La endocitosis es seguida de la degradación intralisosómica de lípidos liposómicos y liberación de los agentes encapsulados. Scherphof *et al.*, (1985) Ann. N. Y. Acad. Sci. 446: 368.

El siguiente procedimiento se puede usar para preparar liposomas multilaminares (tipo MLV), insensibles al pH. La composición líquida a granel de los liposomas comprende: dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), colesterol (Chol) y dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) (Genzyme, Cambridge, MA), en una relación molar de aproximadamente 3:1:0,25 y a una concentración lipídica total final de aproximadamente 30 mM. En la mezcla lipídica se incluye monofosforil lípido A (MPLA) (RIBI Immunochem Research Inc., Hamilton, MT) (o Avanti Lipid A; Avanti Polar Lipids, Inc.; 700 Industrial Park Drive, Alabaster, AL 35007), a una concentración de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% (p/p) del lípido en masa, y la concentración de lipopéptido es de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 µg/ml. Se ha demostrado que MPLA sirve como un adyuvante eficaz para provocar una presentación incrementada de antígeno liposómico por las APC a linfocitos T específicos. Alving, C.R. 1993. Immunobiol. 187:430-446 (21).

El experto en la materia reconocerá que también son adecuados otros adyuvantes, tales como Detox, alum, QS21, adyuvante de Freund completo y/o incompleto, MDP y LipidA. Se disuelven lípidos en masa, MPLA y lipopéptido (aproximadamente 192 mg de DPPC, aproximadamente 33 mg de Chol, aproximadamente 15 mg de DMPG, aproximadamente 2,4 a 12 mg de MPLA, y aproximadamente 0,6 a 12 mg de péptido BLP-22 (25 aa de MUC-1) para aproximadamente 12 ml de producto final) en aproximadamente 5,3 ml de etanol. Como se usa en esta memoria descriptiva, un lipopéptido es un péptido que comprende un resto lipídico amino o carboxi terminal, tal como ácido palmítico, ácido mirístico, y similar.

En una forma de realización, se usa un lipopéptido tal como BLP-25 (un derivado peptídico de MUC-1 palmitoilado) como el péptido antigénico para el encapsulamiento en liposomas. De este modo, este derivado lipopeptídico de MUC-1 se encapsula en liposomas pequeños, insensibles al pH, junto con MPLA.

La disolución etanólica se calienta hasta aproximadamente 50°C y se inyecta a través de una aguja de calibre 30 en aproximadamente 1000 ml de un tampón adecuado, tal como PBS, que se agita rápidamente a la misma temperatura. La suspensión liposómica resultante (vesículas unilaminares muy pequeñas, SUV) se queda sin etanol y se concentra mediante diafiltración en una celda Sartorius con un corte de peso molecular (MWCO) de aproximadamente 300 kD. El volumen se reduce primero hasta aproximadamente 10-20 ml, y después el producto se lava mediante sustitución continua del diafiltrado por aproximadamente 100 ml de PBS. El volumen se reduce hasta menos de aproximadamente 12 ml, y se reconstituye hasta el volumen final de aproximadamente 12 ml tras la eliminación de la celda de diafiltración.

Opcionalmente, el producto se hace pasar entonces a través de una celda de presión French (SLM Aminco, Rochester, NY), 3 veces a 20.000 psi, para asegurarse de que todas las partículas liposómicas se reducen hasta un tamaño que pasaría a través de un filtro de 0,22 µ que se usa para esterilización. El análisis del tamaño muestra que el tamaño medio de las partículas está ligeramente por debajo de 0,1 µ.

También se han examinado vectores liposómicos aniónicos. Estos incluyen liposomas sensibles al pH que destruyen o se funden con la membrana endosómica tras la endocitosis y acidificación del endosoma.

Entre los vectores liposómicos, los más estudiados son los liposomas catiónicos, debido a su eficacia para mediar *in vitro* la transfección de células de mamíferos. Se usan a menudo para suministrar ácidos nucleicos, pero se pueden usar para suministrar otros compuestos terapéuticos, ya sean fármacos u hormonas.

Los lípidos catiónicos no se encuentran en la naturaleza y pueden ser citotóxicos, puesto que parece que estos complejos son incompatibles con el entorno fisiológico *in vivo* que es rico en moléculas aniónicas. Los liposomas son fagocitados preferentemente en el sistema reticuloendotelial. Sin embargo, el sistema reticuloendotelial se puede evitar por varios procedimientos, incluyendo saturación con grandes dosis de partículas liposómicas, o inactivación de macrófagos selectiva por medios farmacológicos. Classen *et al.*, (1984) Biochim. Biophys. Acta 802: 428. Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glucolípidos o con polietilenglicoles en membranas liposómicas da como resultado una captación significativamente reducida por el sistema reticuloendotelial. Allen *et al.*, (1991) Biochim. Biophys. Acta 1068: 133; Allen *et al.*, (1993) Biochim. Biophys. Acta 1150: 9.

Las preparaciones de liposomas catiónicos se pueden obtener por tecnologías convencionales. Véase, por ejemplo, Felgner *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci USA 84:7413 (1987); Schreier, J. of Liposome Res. 2:145 (1992); Chang *et al.* (1988), *más arriba*. También existen preparaciones comerciales, tales como Lipofectin® (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland USA). La cantidad de liposomas y la cantidad de ADN se pueden optimizar para cada tipo celular basándose en una curva de respuesta frente a la dosis. Felgner *et al.*, *supra*. Para algunas reseñas recientes sobre procedimientos empleados, véanse Wassef *et al.*, Immunomethods 4: 217 – 222 (1994) y Weiner, A. L., Immunomethods 4: 217 - 222 (1994).

Otros liposomas adecuados que se usan en los procedimientos de la invención incluyen vesículas multilaminares (MLV), vesículas oligolaminares (OLV), vesículas unilaminares (UV), vesículas unilaminares pequeñas (SUV), vesículas unilaminares de tamaño medio (MUV), vesículas unilaminares grandes (LUV), vesículas unilaminares gigantes (GUV), vesículas multivesiculares (MVV), vesículas individuales u oligolaminares obtenidas por un procedimiento de vaporación en fase inversa (REV), vesículas multilaminares obtenidas mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa (MLV-REV), vesículas plurilaminares estables (SPLV), MLV congeladas y descongeladas (FATMLV), vesículas preparadas por procedimientos de extrusión (VET), vesículas preparadas mediante la prensa French (FPV), vesículas preparadas mediante fusión (FUV), vesículas de deshidratación-rehidratación (DRV), y ampollomas (BSV). El experto en la materia reconocerá que las técnicas para preparar estos liposomas son bien conocidas en la técnica. Véase COLLOIDAL DRUG DELIVERY SYSTEMS, vol. 66 (J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc. 1994).

C. Células T

Se prepararon células T vírgenes, de memoria, y anérgicas usando técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, se usa el siguiente procedimiento. Para el enriquecimiento de células T, se suspenden aproximadamente $30\text{-}50 \times 10^6$ PBL en 1 ml de medio AIM-V y se cargan en columnas de lana de nailon de 5 ml (Robins Scientific, Sunnyvale, CA), que se han acondicionado previamente con el medio. Las columnas de lana de nailon cargadas se incuban a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 45 minutos, y después las células T que no se adhieren se eluyen lavando con medio AIM-V tibio (aproximadamente 37°C). Las células T eluidas se usan como células T vírgenes o anérgicas.

El experto en la materia reconocerá que se pueden usar otras técnicas bien conocidas para preparar células T. Un número de tales técnicas se describe en las páginas 3.1.2 a 3.6.4 de CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John E. Coligan, ed., John Wiley & Sons, New York, 1991). Para el enriquecimiento de células T, habitualmente se usan columnas comercialmente disponibles, algunas de las cuales son específicas para el enriquecimiento de células CD4+ y CD8+. Otros procedimientos incluyen perlas de afinidad, tales como Dynal beads (DYNAL, Lake Success, New York 11042) y MiniMACS (Milteni Biotec. Inc., Auburn, CA 95603).

D. Células presentadoras de antígenos

En una forma de realización de la invención, los linfocitos de sangre periférica (PBL) se usan como APC. Los PBL se aíslan usando procedimientos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, la "capa leucocitaria" se recoge de muestras de sangre periférica usando un procedimiento tal como la centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, que se usa para separar los PBL (linfocitos de sangre periférica) de otros componentes. Véanse las técnicas descritas en las páginas 7.0.5 a 7.1.5 de CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John E. Coligan, ed., John Wiley & Sons, New York, 1991).

E. Preparación de células T activadas

Los PBL, las células T vírgenes o anérgicas, y el antígeno encapsulado en liposomas se preparan como se describe anteriormente. Algunos de los PBL se congelan y se usan como APC autólogas para reestimulaciones posteriores. Todas las incubaciones celulares se llevan a cabo en una incubadora que tiene una temperatura de aproximadamente 37°C y está provista de CO_2 y humedad. En una realización, las células T usadas para activación, y los PBL usados para APC, son autólogos. De este modo, en una forma de realización de la invención, se usa el siguiente procedimiento para preparar células T activadas.

1) Los PBL se combinan con el antígeno encapsulado en liposomas para obtener los PBL cargados con antígeno liposómico. Por ejemplo, se añaden aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 PBL (por ejemplo, $\sim 2 \times 10^6$ PBL) en 0,9 ml de AIM V (medio linfocítico libre de suero) (Life Technologies) a una dosis de liposoma que contiene la formulación de lipopéptido (por ejemplo, aproximadamente $0,1 \mu\text{g}$ a aproximadamente 1mg de lipopéptido y aproximadamente $0,1 \mu\text{g}$ a aproximadamente 1mg de lípido, tal como MPLA, en un volumen de $0,1 \text{ml}$ en PBS), y se incuban durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 18 horas a aproximadamente 37°C en una incubadora suplementada con CO_2 . En la técnica son bien conocidos otros medios celulares adecuados. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, RPMI 1640, DMEM y McCoys. Después, los PBL se tratan con mitomicina C (o irradiación gamma a 3000rad), y se lavan a continuación.

2) Se suspenden ($\sim 1 \times 10^6$ células T y 1×10^6 PBL cargados con antígeno liposómico)/ml (procedentes de la etapa (1)) en un total de aproximadamente 10ml de medio AIM V en una vasija de cultivo tisular de 25cm^2 (tal como un matraz o una placa), y se ponen en una incubadora a 37°C . Las células T y los PBL se pueden usar en un intervalo de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^7 células por pocillo.

3) Después de aproximadamente 24 h, a la mezcla de la etapa (2) se añaden IL-7 recombinante

(10 ng/ml) (Intermedico, Markham, Ontario) e IL-12 (100 pg/ml) (R & D Systems, Minneapolis, MN), y se incuban durante 5-7 días a 37°C con CO₂. Se ha demostrado que IL-12 favorece un desplazamiento hacia el patrón de TH1 en el perfil citocínico de desarrollo de células T CD4⁺. Hsieh, *et al.* 1993. *Science*. 260:547-549 (27). El experto en la materia reconocerá que los patrones de respuestas TH1 se caracterizan por la producción de IL-2 e IFN-gamma, en ausencia relativa de IL-4, IL-6 e IL-10. IL-12 también actúa sinérgicamente en la inducción de la producción de γ -IFN durante la activación primaria de células T CD8⁺. Gajewski, *et al.* 1995. *J. Immunol.* 154:5637-5648. Se ha demostrado previamente que IL-7 recombinante (rIL-7) potencia el crecimiento y diferenciación de CTL precursor. Alderson, *et al.* 1990. *J. Exp. Med.* 172:577-587; Kos, *et al.* 1992. *Eur. J. Immunol.* 22: 3183-3185.

En esta etapa se usan asimismo otras citocinas adecuadas. Por ejemplo, se usan IL-1, IL-2, IL-4, interferón gamma o IL-15, en cualquier combinación. Las combinaciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a, IL-2 e IL-4; IL-2 e IL-5; IL-2 y gamma-IFN; IL-2 e IL-1. El experto en la materia reconocerá que las concentraciones y combinaciones de las citocinas usadas para activación variarán según las células, condiciones experimentales y citocinas escogidas. Los niveles óptimos se pueden determinar realizando ensayos en busca de la estimulación óptima de células T.

4) Tras la etapa (3), todas las células T y PBL se recogen y se añaden APC recientes, y la mezcla se incuba durante aproximadamente 24 horas. Las APC añadidas en esta etapa se cargan con liposomas que se han cargado con antígeno peptídico, como se describe en la etapa (I).

5) Después de la etapa (4), se añaden IL-7 (aproximadamente 1 a aproximadamente 50 pg/ml) e IL-12 (aproximadamente 10 a aproximadamente 500 pg/ml) adicionales al medio de cultivo. En una realización, se usan 10 ng/ml de IL-7 y 100 pg/ml de IL-12.

La mezcla celular se incuba durante aproximadamente 5-7 días en la incubadora a 37°C con CO₂ y humedad. En este punto, el sobrenadante se recoge para la identificación de las citocinas. Dicho material se mantiene a -80°C hasta que se use para la identificación.

7) Las células T activadas resultantes se recogen usando procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. En un procedimiento típico, las células y el medio presentes en el matraz de cultivo tisular se aíslan, y las células se lavan dos veces con medio AMV, y se usan como células cosechadas. Como alternativa, se separan células vivas usando un procedimiento FICOLL similar a aquel para aislar los PBL.

F. Caracterización de células T

1. Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación de células T son bien conocidos en la técnica. Tales ensayos se usan para determinar si un antígeno específico estimula la proliferación de células T. Por ejemplo, tal ensayo se monta usando placas de 96 pocillos usando aproximadamente 10⁵ células T y 5 x 10⁴ APC/pocillo/1200 μ l en medio AIM V. Se pueden usar otras concentraciones de células T y APC. Las APC se pretratan con mitomicina C para inhibir la proliferación. Las APC cargadas con péptidos solubles experimentales o de control, y los liposomas que contienen péptido o lipopéptido se usan como agentes para la estimulación de células T. Después de aproximadamente entre 5 y 6 días, las células se pulsan con ³H-Tdr (aproximadamente 1 μ Ci/pocillo). 12-18 horas después de la pulsación, las células se cosechan y se mide la incorporación de ³H-Tdr en células T.

Un cosechador celular adecuado recoge las células en un papel de filtro. La captación de radioactividad en células T se evalúa midiendo la radioactividad unida a, o atrapada en, el papel de filtro.

2. Evaluación de antígenos CD sobre la superficie de células T

Para determinar qué antígenos CD están presentes sobre la superficie de células T activadas, se usan técnicas reconocidas en la técnica. Típicamente, se usan anticuerpos anti-antígeno CD que están marcados con fluorocromos para "teñir" las células T, que se evalúan vía microscopía de fluorescencia o vía un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) usado en el modo de citometría. Véase el Volumen 1, Capítulo 5 (Immuno-fluorescence and Cell Sorting) en CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John E. Coligan, ed., John Wiley & Sons, New York, 1995).

3. Producción de citocinas

La medida de la producción de citocinas por las células se lleva a cabo usando técnicas reconocidas en la técnica. El experto en la materia sabrá que la concentración de una citocina, tal como una interleucina, o un interferón, en un medio de cultivo celular se mide usando técnicas de ELISA. Las citocinas tales como interleucinas se detectan mediante bioensayos, en los cuales una citocina dada conduce a la estimulación de un tipo celular específico. Las técnicas adecuadas de detección de citocinas son un ensayo ELISPOT, y la determinación de citocinas intracelulares usando citometría de flujo. Véase el Volumen 1, Capítulo 2 en CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John E. Coligan, ed., John Wiley & Sons, New York, 1991).

G. Técnicas de investigación

En una forma de realización de la invención, la invención se refiere a un procedimiento para identificar antígenos y epítomos que son eficaces generando una respuesta de células T específica del antígeno. Este procedimiento comprende las siguientes etapas:

- (1) cebar células cultivadas adecuadas (células T, PBL) con diversos péptidos que son candidatos antigénicos y epitópicos; y
- (2) evaluar la proliferación y la producción de citocinas de las células cebadas en la etapa (1).

La proliferación y la producción de citocinas se evalúan como se describe anteriormente. Como alternativa, la producción de citocinas se evalúa usando el siguiente procedimiento. Se usa un ensayo de ELISA de tipo sándwich, en el que un anticuerpo dirigido contra el analito (citocina a analizar) se une a la fase sólida (tal como una placa de 96 pocillos), y de este modo se usa para unirse (o capturar) a la citocina. La muestra a analizar en busca del analito se expone a la fase sólida. Después de la unión y del lavado, se añade un segundo anticuerpo anti-analito (que comprende un grupo informador). Los grupos informadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos, grupos fluorescentes, y enzimas (peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa). Los anticuerpos marcados con el informador se incuban durante un tiempo adecuado, y la fase sólida se lava para eliminar el informador no unido. Entonces se emplea la tecnología de detección apropiada para determinar la cantidad de analito en la muestra (*por ejemplo*, medida de la radioactividad; evaluación cromogénica o colorimétrica (para anticuerpo conjugado a enzima)) mediante comparación de valores de la muestra con patrones conocidos.

El experto en la materia reconocerá que se pueden usar técnicas bien conocidas para la detección y mutación de aminoácidos específicos en un anticuerpo dado. Usando tales técnicas, se identifican los epítomos requeridos para la activación deseada de las células T. Por ejemplo, se usa una técnica de cartografiado de secuencias que solapan. Típicamente, se estudian péptidos de nueve aminoácidos de longitud procedentes de un antígeno candidato en busca de la actividad estimulante de las células T. Se puede obtener una serie de péptidos obteniendo secuencias de nueve aa que solapan progresando a través de una secuencia proteica conocida, un aminoácido cada vez. De esta manera, se identifica el péptido con la actividad estimulante de células T más elevada.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para caracterizar la respuesta inmunitaria de células T, que comprende:

- (1) generar una respuesta de células T frente a un antígeno de interés; y
- (2) caracterizar la respuesta de células T evaluando la identidad del antígeno de la superficie celular, la producción de citocinas, u otros parámetros que son bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, el tipo 1, el tipo 2, el tipo 3, y el tipo 0 son tipos de respuestas de células T conocidos.

H. Procedimientos terapéuticos

Para generar vacunas celulares para inmunoterapia, se usan diversos péptidos usando un procedimiento según la invención. Tales vacunas son, por ejemplo, APC cargadas con antígeno peptídico, tales como PBL autólogos. Además, también se pueden usar para la vacunación células T estimuladas con antígenos, una técnica conocida como "terapia de transferencia de células T adoptiva". Las vacunas según la presente invención se usan para (a) la prevención del desarrollo de enfermedades tras la administración de la vacuna a un paciente, y/o (b) el tratamiento de un paciente con una enfermedad.

Por ejemplo, el antígeno peptídico BLP-25 se incorpora en un liposoma y se usa para cargar los PBL (de un paciente) con el antígeno, como se describe anteriormente. Los PBL cargados se pueden inyectar nuevamente en los pacientes como vacunas celulares. Los PBL cargados también se pueden usar para activar *in vitro* células T autólogas, como se describe anteriormente. Esto crea una amplia población de células T específicas de antígenos. Estas células T activadas se vuelven a administrar

entonces a un paciente que sufre, por ejemplo, un adenocarcinoma. Para una descripción de técnicas reconocidas en la técnica para la terapia de transferencia adoptiva de células T, véase Bartels, *et al.* *Annals of Surgical Oncology*, 3(1):67 (1996).

5 También se usa un procedimiento de activación de células T según la invención para generar respuestas de células T citotóxicas y auxiliares contra antígenos que son candidatos para uso como vacunas, en inmunoterapia, o para diversas patologías, tales como cáncer, tumores, infecciones víricas, e infecciones bacterianas. De este modo, usando un procedimiento según la invención, se selecciona un antígeno candidato, se encapsula en un liposoma, se usa para cargar PBL autólogos, y los PBL cargados se inyectan en los pacientes, o, como alternativa, los PBL se usan para activar células T autólogas. Las células T estimuladas se vuelven a administrar a un paciente que sufre uno de los trastornos mencionados anteriormente. El experto en la materia reconocerá que los antígenos peptídicos se seleccionan basándose en el tipo de enfermedad que afecta al paciente. Por ejemplo, los antígenos MUC-1 se usan para obtener células T específicas de antígenos que se usan en terapia de adenocarcinoma. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes antígenos.

15 En una forma de realización, el epítipo es un epítipo asociado a un parásito, tal como un epítipo asociado con leishmania, malaria, tripanosomiasis, babesiosis, o esquistosomiasis. Los epítipos adecuados asociados a parásitos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes.

Parásito	Epítipo	Referencias
Plasmodium falciparum (malaria) (NANP)3		Good <i>et al.</i> (1986) <i>J. Exp. Med.</i> 164:655
	Proteína circumsporoz. AA 326-343	Good <i>et al.</i> (1987) <i>Science</i> 235:1059
Leishmania donovani	Péptido repetitivo	Liew <i>et al.</i> (1990) <i>J. Exp. Med.</i> 172:1359
Leishmani major	EAEAAARLQA (código)	Esta solicitud
Toxoplasma gondii	Proteína de superficie P30	Darcy <i>et al.</i> (1992) <i>J. Immunolog.</i> 149:3636
Schistosoma mansoni	Antígeno Sm-28GST	Wolowxuket <i>et al.</i> (1991) <i>J. Immuno</i> 146: 1987

20 En otra forma de realización, el epítipo es un epítipo vírico, tal como un epítipo asociado con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de Epstein-Barr (EBV), o hepatitis. Los epítipos víricos adecuados incluyen, pero no se limitan a:

Virus	Epítipo	Referencias
HIV gp120	Bucle V3, 308-331	Jatsushita, S. <i>et al.</i> (1988) <i>J. Viro.</i> 62:2107
HIV GP120	AA 428-443	Ratner <i>et al.</i> (1985) <i>Nature</i> 313:277
HIV gp120	AA 112-124	Berzofsky <i>et al.</i> (1988) <i>Nature</i> 334:706
HIV	Transcriptasa inversa	Hosmalin <i>et al.</i> (1990) <i>PNAS USA</i> 87:2344
Flu	Nucleoproteína AA 335-349, 366-379	Townsend <i>et al.</i> (1986) <i>Cell</i> 44:959
Flu	Hemaglutinina AA48-66	Mills <i>et al.</i> (1986) <i>J. Exp. Med.</i> 163:1477
Flu	AA111-120	Hackett <i>et al.</i> (1983) <i>J. Exp. Med</i> 158:294
Flu	AA114-131	Lamb, J. and Green N. (1983) <i>Immunology</i> 50:659
Epstein-Barr	LM P43-53	Thorley-Lawson <i>et al.</i> (1987) <i>PNAS USA</i> 84:5384
Hepatitis B	Antígeno de superficie AA95-109; AA 140-154	Milich <i>et al.</i> (1985) <i>J. Immunol.</i> 134:4203
	Antígeno Pre-S AA 120-132	Milich, <i>et al.</i> (1986) <i>J. Exp. Med.</i> 164:532

Herpes simple	Proteína gD AA5-23	Jayaraman <i>et al.</i> (1993) J. Immunol. 151:5777
	Proteína gD AA241-260	Wyckoff <i>et al.</i> (1988) Immunobiology 177:134
Rabia	Glucoproteína AA32-44	MacFarlan <i>et al.</i> (1984) J. Immunol. 133:2748

Los epítomos también pueden estar asociados con un antígeno bacteriano. Los epítomos adecuados incluyen, pero no se limitan a:

Bacteria	ID del epítomo	Referencias
Tuberculosis	Proteína de 65Kd AA112-126 AA163-184 AA227-243 AA242-266 AA437-459	Lamb <i>et al.</i> (1987) EMBO J. 6:1245
Staphylococcus	Proteína de nucleasa AA61-80	Finnegan <i>et al.</i> (1986) J. Exp. Med. 164:897
E. coli	Enterotoxina estable al calor	Cardenas <i>et al.</i> (1993) Infect. Immunity 61:4629
	Enterotoxina lábil al calor	Clements <i>et al.</i> (1986) Infect. Immunity 53:685
Shigella sonnei	Antígeno de forma I	Formal <i>et al.</i> (1981) Infect. Immunity 34:746

5 De este modo, se genera *in vitro* en seres humanos una respuesta de células T eficiente frente a péptidos antigénicos propios (autocrípticos) asociados a tumores. Como se señala anteriormente, los péptidos MUC-1 se usan para tratar adenocarcinoma.

10 Se ha observado que las células T de pacientes con determinados tipos de cáncer e infecciones víricas se hacen insensibles, o anérgicas, a la estimulación con antígenos peptídicos. En un número de estudios, esta falta de sensibilidad de las células T se ha atribuido a defectos en la producción de IL-2 tras la estimulación con antígeno peptídico. Con la adición de IL-2 exógena, las células T se hacen sensibles al antígeno. Véanse Beverly, *et al.* International Immunology 4(6):661 (1992), y Wotton, *et al.* Human Immunology 42(2):95 (1995). Sin embargo, la administración de niveles elevados de IL-2 *in vivo* tiene efectos secundarios tóxicos. Estos efectos secundarios se reducen significativamente cuando la IL-2 se encapsula en un liposoma antes de la administración.

15 En consecuencia, en otra forma de realización, la invención incluye un procedimiento para reforzar la respuesta inmunitaria de células T e invertir la anergia de células T *in vitro* frente a antígenos peptídicos. Un procedimiento típico comprende cocultivar células T anérgicas o vírgenes con IL-2 libre u oncolipina (IL-2 encapsulada en un liposoma), seguido de la activación de las células T resultantes con las APC cargadas con antígenos.

20 La siguiente descripción detallada y los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero no limitan el alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

25 Este ejemplo ilustra el uso del modelo de MUC-1 para generar una respuesta de célula T citotóxica específica de antígenos restringida a clase 1.

1. Materiales y procedimientos

Péptidos. Se prepararon diversos péptidos sintéticos mediante síntesis automatizada en fase sólida con aminoácidos protegidos con Fmoc usando un sintetizador de péptidos Milligen/Bioresearch Modelo 9050 (Millipore, Marlborough, MA). Para estos estudios, se usaron los siguientes péptidos, que tenían una pureza de 95%, según se determina mediante HPLC: un péptido MUC-1 humano de 24 aminoácidos (BP24), previamente citado como p-24H (Agrawal *et al.*, Cancer Research (1995) (secuencia de aminoácidos para BP24: TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP); BP-25 (secuencia de aminoácidos para BP-25: STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP), un péptido MUC-1 de ratón de 24 aminoácidos (BP-24M) DSTSSPVHSGTSSPATSAPEDSTS; conteniendo cualquiera de los péptidos anteriores un grupo palmitoilo en un resto de lisina añadido al extremo carboxiterminal del péptido (lipopéptidos). Por ejemplo, BLP-24 y BLP-25 son versiones lipopeptídicas de BP-24 y BP-25, respectivamente, que tienen un grupo palmitoilo en el grupo amino épsilon de una lisina añadida cerca del término carboxi. BLP-25 tiene la secuencia de aminoácidos de BP-25 más los restos de lisina y glicina adicionales, y BLP-24 es el mismo análogo de BP-24.

Anticuerpos. Para bloquear las respuestas de células T, se usaron los anticuerpos W6/32 (anticuerpo pan anti-HLA clase I), OKT8 (anti-CD8) y OKT4 (anti-CD4). Los anticuerpos (W6/32, OKT4, OKT8) y sus anticuerpos de control de isotipo se purificaron de los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas obtenidos de ATCC. Para la tinción para FACS, se obtuvieron anticuerpos anti-CD4-FITC/anti-CD8-PE, anti-CD25-PE y anti-CD3-PE, anti-CD28-PE, anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC, CD4-FITC, CD8-FITC, CD3-FITC, CD69-PE y de control de isotipo, de Becton and Dickinson (Mountain View, CA).

Preparación de liposomas – proceso de inyección de etanol. La composición líquida a granel de liposomas consistió en dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), colesterol (Chol) y dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) (Genzyme, Cambridge, MA) en una relación molar de 3:1:0,25 y a una concentración lipídica total final de 30 mM. En la mezcla de lípidos se incluyó monofosforil lípido A (MPLA) (RIBI Immunochem Research Inc., Hamilton, MT) a una concentración de 1 a 5% (p/p) de lípido en masa, y la concentración de lipopéptido fue 50 a 1000 $\mu\text{g/ml}$. Los lípidos en masa, MPLA y lipopéptido (192 mg de DPPC, 33 mg de Chol, 15 mg de DMPG, 2,4 a 12 mg de MPLA y 0,6 a 12 mg de lipopéptido) para 12 ml de producto final se disolvieron en 5,3 ml de etanol. La disolución etanólica se calentó hasta 50°C y se inyectó a través de una aguja de calibre 30 en 100 ml de PBS que se agitó rápidamente a la misma temperatura. La suspensión liposómica resultante (vesículas unilaminares muy pequeñas, SUV) se queda sin etanol y se concentró mediante diafiltración en una celda Sartorius con un corte de peso molecular (MWCO) de aproximadamente 300 kD. El volumen se redujo primero hasta aproximadamente 10-20 ml, y después el producto se lavó mediante sustitución continua del diafiltrado por 100 ml de PBS. El volumen se redujo a menos de 12 ml, y se reconstituyó hasta el volumen final de 12 ml tras eliminar la celda de diafiltración. El producto se hizo pasar entonces a través de una celda de prensa French (SLM Aminco, Rochester, NY), 3 veces a 20.000 psi para asegurarse de que todas las partículas liposómicas se redujesen hasta un tamaño que pasase a través de un filtro de 0,22 μ que se usó para esterilización. El análisis de los tamaños mostró que el tamaño medio de las partículas era ligeramente inferior a 0,1 μ .

Citocinas. Las citocinas recombinantes humanas, IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-7 (Intermedico, Markham, Ontario), se diluyeron en medio AIM-V libre de suero (Life Technologies), justo antes del uso.

Procedimientos generales para cargar APC con péptido encapsulado en liposomas. Los linfocitos de sangre periférica humana (PBL) se purificaron a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala Suecia). La capa de la interfaz Ficoll-sangre obtenida mediante centrifugación se recogió y se lavó dos veces con RPMI antes del uso.

De forma breve, a $2-10 \times 10^6$ PBL en 0,9 ml de medio AIM-V, se añadió una dosis de liposoma que contiene formulación de lipopéptido, y los PBL se incubaron toda la noche a 37°C con una incubadora suplementada con CO₂. Tras la incubación, los PBL se trataron con mitomicina C o se irradiaron con radiación γ (3000 rads), seguido del lavado con medio AIM-V.

Cultivo de células T en la masa. Para el enriquecimiento de células T, se suspendieron $30-50 \times 10^6$ PBL en 1 ml de medio AIM-V y se cargaron en columnas de lana de nailon de 5 ml preacondicionadas con medio (Robins Scientific, Sunnyvale, CA). Las columnas de lana de nailon cargadas se incubaron a 37°C durante 45 minutos, y después las células T que no se adhieren se eluyeron lavando con medio AIM-V tibio (37°C). Inicialmente, el cultivo en masa se inició en un matraz estéril de cultivo tisular de 25 cm² (Corning Glass, Corning, NY). Se cultivaron 10^7 células T en presencia de 10^7 PBL autólogos irradiados con radiación gamma, cargados con antígeno, en un volumen total de 10 ml en medio AIM-V durante 16-24 horas, en cuyo momento el cultivo se alimentó con rIL-7 humana (10 $\mu\text{g/ml}$) y r-IL-12 humana (100 pg/ml), y se dejó durante 6-8 días más. Al final de los 7-10 días de cultivo, las células T que sobreviven se recogieron y se volvieron a estimular con las APC autólogas cargadas con antígeno liposómico. Después de dos ciclos consecutivos de reestimulación (14-16 días), las células T se recogieron, y se contaron. El sobrenadante se recogió de los cultivos en masa a 14 días para la identificación de citocinas, y se

mantuvo congelado a -80°C hasta que se usó para el ensayo. Se evitó la congelación/descongelación repetidas.

5 Ensayo de proliferación de células T. Células T ($5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$), obtenidas al final de los 14-16 días de cultivo, como se describe anteriormente, se incubaron en presencia de diversos liposomas que contienen antígeno, BP24 soluble, BLP-24M soluble, liposomas autólogos cargados o no cargados, y APC tratadas con mitomicina C ($5 \times 10^4 - 10^5$), en un volumen total de 200 μl en medio AIM-V, en placas de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos – durante un periodo de 5 días a 37°C , 7% de CO_2 y humedad. Cada grupo se cultivó en 5 pocillos duplicados. Al final de los 5 días, se recogieron 100 μl de sobrenadante de cultivo procedente de cada pocillo, y se ensayaron para determinar la presencia de γ -IFN o IL-4 mediante ELISA, como se describe más abajo. Después de recoger el sobrenadante para citocinas, se añadió 1 μCi de $^3\text{H-Tdr}$ (Amersham Canada Limited Oakville, Ontario) a cada pocillo, y se incubó toda la noche. La incorporación de $^3\text{H-Tdr}$ en ADN de células que proliferan se midió después de cosechar las placas y contar en el contador beta Matrix.

15 Ensayos de linfocitos T citotóxicos. Para el ensayo de CTL, se usaron tres PBL de donantes normales (HLA.A2⁺)– Las células T se hicieron crecer durante dos semanas en cultivos en masa, como se describe anteriormente. Al final de las dos semanas, las células T vivas se cosecharon de los matraces y se contaron. Las dianas fueron células T2 mutantes. Houbiers *et al.*, Eur. J. Immunol 23:2072-2077 (1993); Stauss *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:7871-7875 (1992). Se examinó el aumento de la expresión de HLA.A2 en células T2, mediada por el péptido MUC-1, usando los péptidos 9-meros MUC-1 ATAPPAHGV y SAPDTRPAP, usando procedimientos conocidos. Townsend *et al.*, Nature 346:476 (1989). Células T2 se cargaron toda la noche con diversos péptidos sintéticos MUC-1 a 200 μM en presencia de $\beta 2\text{m}$ exógena. Houbiers *et al.*, Eur. J. Immunol 23:2072-2077 (1993); Stauss *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:7871-7875 (1992). Estas células diana T2 cargadas con péptidos se cargaron entonces con ^{51}Cr (usando NaCrO_4) durante 90 minutos, y se lavaron frecuentemente. Los ensayos de CTL se realizaron como se describe previamente. Agrawal *et al.*, J. Immunol. 157 2089 (1996). El porcentaje de muerte específica se calculó como: liberación experimental - liberación espontánea/liberación máxima – liberación espontánea x 100. Las relaciones de efector frente a diana usadas fueron 10:1, 20:1, 60:1 y 120:1. Cada grupo se experimentó por cuadruplicado, y se calculó el porcentaje medio de muerte específica.

30 Estimación mediante ELISA de γ -IFN, IL-10 e IL-4 producidos en sobrenadante de cultivo. Las fracciones de los sobrenadantes recogidas de los cultivos en masa se examinaron separadamente para determinar γ -IFN e IL-4 e IL-10. En la placa del ensayo de proliferación, los sobrenadantes se recogieron individualmente y después se ensayaron para determinar la presencia de γ -IFN e IL-4.

35 Para el ensayo de γ -IFN, se revistieron placas de ELISA Nunc de 96 pocillos toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal anti- γ -IFN humano de ratón (Genzyme, Cambridge, MA) en tampón de NaHCO_3 (0,1 M, pH 9,5). Entonces se incubaron durante 2 horas la muestra de ensayo así como los patrones de referencia de γ -IFN humano de control positivo (R&D Systems) y de γ -IFN recombinante, seguido de un segundo anticuerpo (anti- γ -IFN humano de cabra) durante dos horas, seguido de la incubación con el tercer anticuerpo (anti-IgG de cabra de burro conjugado con biotina) durante 45 minutos a temperatura ambiente. A esta etapa de incubación le siguió la incubación con conjugado (estreptavidina conjugada con peroxidasa, Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME) durante 30 minutos, y la adición de sustrato de ABTS peroxidasa y H_2O_2 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). En este momento, las placas se leyeron en el lector de ELISA (Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA) en modo cinético [longitud de onda dual (405-490 nm) de Molecular Thermomax].

45 Para el ensayo de IL-4, el ELISA consistió en un procedimiento de dos etapas, y la etapa de la estreptavidina conjugada a peroxidasa siguió a la incubación con el segundo anticuerpo (anti-IL-4 humana de ratón conjugado con biotina). La mayoría de los reactivos y anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Pharmingen (San Diego, CA). El intervalo de cuantificación de citocina detectada fue 31-1000 pg/ml para IL-4, y 25-800 pg/ml para γ -IFN-

50 Para el ensayo de IL-10, el ELISA fue un procedimiento de dos etapas en el que la incubación con el segundo anticuerpo (anticuerpo policlonal anti-IL-10 humana y vírica de rata conjugado con biotina) fue seguida de la incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Todos los anticuerpos monoclonales y policlonales se adquirieron de Pharmingen (San Diego, CA). El intervalo de detección de IL-10 fue 100-6400 pg/ml.

55 Tinción de inmunofluorescencia de la superficie celular. Para la detección de antígenos de la superficie celular, las células T cosechadas del cultivo en masa (como se describe previamente) se lavaron una vez en PBS fría que contiene 1% de BSA, seguido de la adición de 10 μl de Ig de cabra (3 mg/ml) al pelete celular, y se incubó durante 10 minutos en hielo, a lo que se añadió 50 μl de PBS que contiene 1% de BSA y 3% de suero AB humano.

Para la tinción indirecta, las células se cultivaron con anticuerpo de ensayo o con anticuerpo de control de isotipo ($2 \mu\text{g}$ de 5×10^5 células T) durante 30-45 minutos en hielo. Se añadieron $100 \mu\text{l}$ de PBS que contiene 10% de BSA, y las células se lavaron una vez en PBS fría a 4°C . Se añadió el anticuerpo secundario, anti-IgG1 de ratón-PE de cabra ($70 \mu\text{l}$ de dilución 1:100) diluido en PBS que contiene 1% de BSA y 3% de suero AB humano, y se incubó durante 30-45 minutos en hielo a 4°C . Se añadió PBS que contiene 10% de BSA ($200 \mu\text{l}$), y las células se lavaron una vez en PBS a 4°C . Para el anticuerpo de ensayo marcado directamente, sólo se llevó a cabo una única etapa de incubación. Para la tinción individual, las células se resuspendieron en PBS que contiene paraformaldehído al 2% (PFA). Para la tinción doble, se añadieron $10 \mu\text{l}$ de IgG de ratón (3 mg/ml) al pelete celular, y se dejó en hielo durante 10 minutos y se añadió con $50 \mu\text{l}$ de PBS que contiene 1% de BSA y 3% de suero AB humano. Se añadieron $10 \mu\text{l}$ del segundo anticuerpo marcado directamente, y se incubó durante 35-45 minutos en hielo, seguido de la adición de $10 \mu\text{l}$ de PBS que contiene 10% de BSA, lavando una vez en PBS fría y resuspendiendo en PBS que contiene PFA al 2%. En paralelo, para teñir las células de manera similar, siempre se usó anticuerpo de control de isotipo apropiado. Las muestras se usaron y analizaron generalmente mediante citometría de flujo usando FACSort[®] (Becton & Dickinson). El porcentaje de células positivas se definió como la fracción de células que muestra densidades de fluorescencia más allá de una región que se establece para excluir por lo menos 98% de las células teñidas con anticuerpo emparejado con isotipo de control.

2. Resultados

A. Inducción de respuesta de células T *in vitro* frente a lipopéptido MUC-1 sintético

El lipopéptido MUC-1 sintético (BLP-25) usado en estos estudios se escogió debido al hecho de que tiene la capacidad de unirse a varias moléculas de HLA clase I, por ejemplo HLA-A11, A3, A2.1 y A1. Domenech *et al.*, (1995) *J. Immunol.* 155:4766. Además, se ha demostrado que el péptido MUC-1 BP-24 (que está contenido en la secuencia de BLP-25) es un epítipo permisivo para la respuesta de células T CD4^+ restringida a HLA clase II. Agrawal *et al.*, *Cancer Res.* 55, *más arriba*. BLP-25 es la secuencia de aminoácidos de BP-25, con una cadena palmitoílica unida al extremo carboxiterminal del péptido. La cadena lateral lipídica facilita la unión del péptido BP-25 a un liposoma.

BP-24 carece de la serina amino terminal de BLP-25 (y BP-25). Se demostró previamente que la serina amino terminal presente en BLP-25 (y BP-25) le da una capacidad adicional para unirse a varias moléculas de HLA clase I. Domenech *et al.*, *más arriba*.

Se midió la respuesta proliferativa de células T *in vitro* primaria, secundaria y terciaria de los PBL aislados de capas leucocitarias de donantes normales de la Cruz Roja ($n = 4$) frente a BLP-25 en forma soluble, usando el procedimiento descrito en Agrawal *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55:2257. En todas las estimulaciones 1^a, 2^a y 3^a, no se observó proliferación significativa de células T específicas de antígenos (S.I. < 3).

Usando el procedimiento de inyección de etanol descrito anteriormente, se prepararon SUV que contienen lipopéptido BLP-25 y monofosforil lípido A (MPLA). Se aislaron células T vírgenes de los PBL de donantes normales de la Cruz Roja como se describe anteriormente, y se cultivaron en presencia de PBL autólogos cargados con liposomas SUV que contienen BLP-25 o antígeno de control. Las células T se cultivaron con PBL autólogos tratados con mitomicina C que se habían cargado previamente con una preparación liposómica de BLP-25 que contiene diversas concentraciones del péptido. El cultivo se llevó a cabo durante 1 semana, 2 semanas o 3 semanas, con una reestimulación semanal con APC autólogas (cargadas con antígeno BLP-25/liposoma).

Cuando se usó un antígeno peptídico soluble para estimular células T vírgenes, no se observó ninguna respuesta proliferativa específica de péptidos durante las estimulaciones 1^a y 2^a. Sin embargo, cuando las células T se estimularon dos veces con PBL autólogos cargados con antígeno-liposoma en un período de tiempo de dos semanas, y después se ensayaron para determinar la respuesta proliferativa frente a un número de APC autólogas cargadas con liposomas que contienen el péptido antigénico de ensayo o de control, hubo una potente respuesta proliferativa de células T específica del antígeno, según se mide por la incorporación de ^3H -timidina. La respuesta proliferativa de células T dependió de la dosis del péptido antigénico BLP-25 en las preparaciones liposómicas. De este modo, se observó una potente respuesta proliferativa en células T vírgenes tratadas con un péptido MUC-1 encapsulado en liposomas.

Se usaron los siguientes controles. La respuesta de células T cultivadas con APC cargadas con liposoma que contiene BLP-25 se comparó con (1) péptidos antigénicos solubles: BP24, BP24M y (2) liposomas que contienen un homólogo de BLP-25 de ratón, el lipopéptido BLP-24M. No hubo ninguna respuesta proliferativa de células T frente a estos péptidos antigénicos de control. Las respuestas proliferativas de las células T procedentes de PBL de donantes frente a BLP-25/liposomas se categorizaron en tres grupos. De los 17 donantes, 6 "respondieron bien" a BLP-25 (Fig. 1A); 7 donantes tuvieron una "respuesta de tipo medio" (Fig. 1B), y las células T de 4 donantes no mostraron ninguna respuesta proliferativa de células T frente a BLP-25 (Fig. 1C). La diferencia en la capacidad de respuesta

de las células T se puede atribuir a diferentes haplotipos de MHC de los donantes individuales.

Con la estimulación de células T procedentes de donantes que responden bien con péptido BLP-25 soluble, no se observó ninguna proliferación específica del péptido.

5 Se llevó a cabo otro experimento para estudiar la respuesta de células T cultivadas en presencia de (1) PBL autólogos cargados con liposomas que contienen BLP-25; (2) PBL autólogos cargados con liposomas que contienen BLP-24; y (3) liposomas que contienen BLP-24M (Figura 3A y 3B). Se observó que hubo una respuesta proliferativa frente a los liposomas cargados con BLP-24, pero no frente al liposoma cargado con BLP-24M. La respuesta a BLP-24 no fue tan fuerte como la respuesta a BLP-25. Esto puede ser debido a epítomos adicionales proporcionados por el resto de serina amino terminal en BLP-25. Se sabe que este resto de serina confiere una capacidad de unión a HLA adicional en BLP-25. Domenech *et al.*, *más arriba*.

B. Células T sensibles a péptido MUC-1 BLP-25 producen citocinas de tipo 1 en el sobrenadante de una manera dependiente del antígeno.

15 Se recogieron sobrenadantes de cultivo a partir del medio de células T cultivadas en masa que se habían estimulado con PBL autólogos cargados con liposomas que contienen BLP-25, al final de 2 estimulaciones (es decir, después de 2 semanas de cultivo). El sobrenadante se evaluó para determinar la presencia de citocinas segregadas γ -IFN, IL-4, e IL-10 mediante ensayos ELISA, como se describe anteriormente. Hubo una concentración significativa de γ -IFN y algo de IL-10 (Tabla 1). Sólo se detectaron cantidades indetectables o pequeñas de IL-4 en el sobrenadante del cultivo. La cantidad de γ -IFN se correlaciona con la dosis y especificidad de los péptidos antigénicos.

Tabla I: Citocinas producidas en el sobrenadante de cultivos en masa de células T cultivadas en presencia de APC autólogas cargadas con liposomas que contienen lipopéptido MUC-1

Antígenos estimulantes	IFN- γ (pg/ml) \pm S.D.	IL-4 (pg/ml) \pm S.D.	IL-10 (pg/ml) \pm S.D.
Sin lipopéptido	105,10 \pm 57	36,02 \pm 45	< 100,00
BLP 25, 1 ug	63,55 \pm 45	37,06 \pm 6	< 100,00
BLP 25, 10 ug	452,40 \pm 6,00	< 31,00	289,50 \pm 3,00
BLP 25, 100 ug	1244,00 \pm 359,00	74,09 \pm 3,00	206,9 \pm 17,00
BLP 24, 10 ug	517,0 \pm 30,00	< 31,00	199,10 \pm 10,00
BLP 24, 100 ug	722,50 \pm 119,00	< 31,00	217,90 \pm 0,0

25 Los datos mostrados en esta tabla son representativos de >3 experimentos repetidos (con 3 donantes diferentes que responden bien). Los intervalos de sensibilidad de los ensayos ELISA de las citocinas fueron 25-1600 pg/ml (para IFN- γ), 31-2000 pg/ml (para IL-4) y 100-6400 pg/ml (para IL-10). El sobrenadante se recogió a aproximadamente dos semanas de cultivo *in vitro* en presencia de las APC autólogas cargadas con los antígenos señalados.

30 Hubo significativamente menos γ -IFN (\sim 100-200 pg/ml) producido en el sobrenadante de cultivo de grupos de células T sin respuesta. El sobrenadante de las células T cultivadas en presencia de PBL autólogos cargados con liposomas vacíos (con MPLA, pero sin péptido) tuvo un nivel muy bajo de γ -IFN (\sim 100 pg/ml), en contraste con el sobrenadante de células cultivadas con PBL cargados con liposomas que contienen péptido (niveles de γ -IFN de aproximadamente 450 a aproximadamente 1200 pg/ml).

35 La Tabla II muestra las citocinas segregadas en los sobrenadantes en la placa de microtitulación de 96 pocillos durante los ensayos de proliferación. La cantidad de γ -IFN producido estaba de acuerdo con la dosis y especificidad de la respuesta proliferativa de células T específica de péptidos. Sin embargo, se produjo un nivel bajo de producción de γ -IFN (\sim 200 pg/ml) en células T estimuladas con liposomas sin controles de péptido o de péptido soluble, probablemente debido a la presencia de MPLA en la preparación liposómica usada para estimular estos cultivos de células T. En conjunto, la cantidad de IL-4 producida en el sobrenadante fue mucho menor en comparación con γ -IFN, y estaba en el intervalo de < 100 pg/ml (Tabla II).

Tabla II. Citocinas segregadas en el sobrenadante de los pocillos de microtitulación de la placa de 96 pocillos en el ensayo de proliferación de células T estimuladas con PBL autólogos cargados con liposomas que contienen BLP-25, dosis de 100 ug.

45

Antígenos estimulantes	IFN- γ (pg/ml) \pm S.D.	IL-4 (pg/ml) \pm S.D.
Formulación liposómica		
Sin lipopéptido	244 \pm 2	< 31,00
BLP 25,1 ug	399 \pm 8	<31,00
BLP 25,10 ug	496 \pm 59	<31,00
BLP 25, 100 ug	983 \pm 140	< 31,00
BLP 24,10 ug	466 \pm 9	<31,00
BLP 24,100 ug	492 \pm 10	<31,00
Péptidos solubles^a		
Péptido BP-24 (100 ug)	131 \pm 0	35 \pm 15
Péptido BLP-25 e (100 ug)	152 \pm 7	61 \pm 22
BP-24M (100 ug)	193 \pm 79	< 31,00

Los datos representados en esta tabla son representativos de > 3 experimentos repetidos (con 3 donantes diferentes que responden bien). El intervalo de sensibilidad de los ensayos ELISA de las citocinas fue 25-1600 pg/ml (para IFN- γ), 31-2000 pg/ml (para IL-4). El sobrenadante se recogió en el 6^o día del ensayo de proliferación a partir de pocillos individuales de 4-5 pocillos replicados, y los resultados se muestran como media \pm S.D. Células T que se hicieron crecer con APC cargadas con antígeno liposómico durante dos semanas se cultivaron en presencia de las APC autólogas cargadas con péptidos solubles en placas de 96 pocillos en el 6^o día del cultivo, el sobrenadante se recogió y se estudió para determinar la presencia de citocinas segregadas.

C. Bloqueo de la respuesta proliferativa de células T específica del péptido BLP-25 por anticuerpos monoclonales contra CD4 y CD8.

En los ensayos de proliferación se usaron anticuerpos monoclonales (mAbs) frente a moléculas (1) CD4; (2) CD8; y (3) HLA clase I, y sus anticuerpos de control de isotipo respectivos, para examinar los tipos de células T que responden al péptido BLP-25 en cultivos *in vitro*. Como se muestra en la Fig. 4, los mAb tanto anti-CD4 como anti-CD8 bloquearon parcialmente las respuestas proliferativas de células T específicas de antígenos. El anticuerpo anti-HLA clase I (W6/32) también bloqueó parcialmente la respuesta proliferativa de las células T. Como controles, los anticuerpos de control de isotipo respectivos no bloquearon la respuesta proliferativa de células T. Estos resultados indicaron que se generaron respuestas de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺.

D. Fenotipo de células T que responden al péptido BLP-25 presentado como PBL autólogos tratados con liposomas como APC.

Se realizaron experimentos de citometría de flujo para examinar el fenotipo de células T en los cultivos que responden (Fig. 5A y 5B). Se examinó la presencia de marcadores de la activación CD25 y CD69 en el contexto de células T CD4⁺ o CD8⁺. El experto en la materia reconocerá que CD3 y $\alpha\beta$ TCR son marcadores para las células T. CD28 es un ligando para B7.1 y B7.2. CD69 es un antígeno de la activación de células T "temprano". CD25 (receptor de IL-2) es también un antígeno de la activación de células T, que tiene una elevada afinidad por IL-2.

La presencia de CD3, $\alpha\beta$ TCR, y CD28 sobre la superficie de células T cultivadas *in vitro* sugiere que, en los presentes estudios que usan técnicas *in vitro*, se generan células T normales, que también son específicas de antígenos. Esto también indica que la presente metodología no produce artefactos no fisiológicos. La presencia de CD25 (receptor de IL-2) de alta densidad en células T cultivadas, que se determinó usando citometría de flujo, sugiere que estas células están activadas y responden a IL-2.

Además, se examinaron las células T procedentes de cultivos que responden a BLP-25, en busca de la presencia de $\alpha\beta$ TCR y la expresión de moléculas CD28 (Fig. 5A y 5B). La mayoría de las células T CD3⁺ fueron TCR $\alpha\beta$ ⁺ y CD28⁺. La relación CD4/CD8 en estos cultivos *in vitro* fue aproximadamente 2:1 (Fig. 5A). Entre la población de células CD4⁺, aproximadamente 50% de las células

fueron CD25⁺, y 25% de las células fueron CD69⁺ (Fig. 5B). Entre la población de células T CD8⁺, aproximadamente 30-40% de las células fueron CD25⁺, y aproximadamente 50-60% de las células fueron CD69⁺. Toda la población de células CD4⁺ y CD8⁺ fue TCRαβ⁺ y CD28⁺.

5 También se determinó que el porcentaje de células T activadas con expresión de CD25 y CD69 en un tiempo dado en el cultivo es mayor en cultivos que han sido estimulados con APC autólogas cargadas con péptido antigénico liposómico, cuando se compara con cultivos tratados con péptido MUC-1 soluble. Véase también Agrawal *et al.*, J. Immunol., *supra*.

10 Agrawal *et al.* dieron a conocer que un porcentaje relativamente bajo de células T estimuladas fueron CD69⁺. Sin embargo, ahora se ha demostrado que CD69⁺, reconocido previamente como un marcador de la activación temprana en células T, está correlacionado con la estimulación antigénica. Gibbons, *et al.* 1996. Cytometry. 23:260-261. Se demostró que las células Testimuladas con PHA muestran una expresión elevada de CD69 a los 30 minutos, y la expresión de CD69 es manifiesta hasta 3-4 días de cultivo. En contraste con la respuesta a PHA, en células T estimuladas con antígenos, CD69 no es expresada en períodos de tiempo tempranos (1 hora-3 días), mientras que se encontró una expresión elevada de CD69 sobre las superficies de células T después de aproximadamente 6 días de cultivo *in vitro*. Se encontró que, en células T específicas del antígeno MUC-1, la expresión de CD69 a los 6 días después de la estimulación se correlaciona con la expresión de CD8 y CD4 en estas células T.

20 Los presentes estudios demuestran la generación de una población mixta de células T específicas de antígenos, algunas de las cuales son CD4⁺, y algunas de las cuales son CD8⁺. Debido a que la respuesta proliferativa fue bloqueada por anticuerpos tanto anti-CD4 como anti-CD8, esto sugiere que las células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ responden a la estimulación antigénica. El experto en la materia reconocerá que, en general, las células T tanto CD4⁺ (T auxiliares) como CD8⁺ (T citotóxicas) son necesarias para generar una respuesta protectora eficaz frente a un patógeno, es decir, para conferir inmunidad frente a un tumor. Sin embargo, el experto en la materia también reconocerá que ciertas células T CD4⁺ son eficaces frente a patógenos, sin la ayuda de una célula T CD8⁺.

25 Existen dos tipos de células T auxiliares CD4⁺. Las células CD4⁺ tipo 1 producen citocinas que ayudan en la respuesta de células T CD8⁺ (respuesta citotóxica). Las células T CD4⁺ tipo 2 ayudan a las células B a producir anticuerpos. Dependiendo de la naturaleza de los patógenos, se necesitan células T CD4⁺ de tipo 1 o de tipo 2; sin embargo, algunas células T CD4⁺ son ellas mismas citotóxicas, y pueden producir la función efectora.

E. Respuestas citotóxicas in vitro de células T estimuladas con APC incubadas con liposomas que contienen péptido MUC-1 (BLP-25)

35 Usando los procedimientos anteriores, se determinó la actividad citotóxica de células T estimuladas con APC autólogas pulsadas con BLP-25 liposómico. La fuente de células T fueron los PBL procedentes de tres donantes HLA.A2⁺. Células T2 diana (HLA.A2⁺) se cargaron con péptidos 9-méricos (STAPPAHGV, SAPDTRPAP) que están contenidos en la secuencia peptídica de BLP-25. Se observó que la carga con STAPPAHGV condujo a un mayor aumento de la expresión de HLA.A2 en células T2 que lo hizo SAPDTRPAP (Fig. 6A).

40 Entre los tres donantes, las células T estimuladas con BLP-25 liposómico tuvieron la capacidad de lisar dianas T2 a diversas relaciones efector:diana (Fig. 6B). El control negativo fue un péptido 8-mérico de ovoalbúmina (OVA) (SIINFEKL), que aumenta fuertemente la expresión de HLA.A2 en células T2 (Fig. 6A). Además, la adición del mAb pan anti-HLA clase I (W6/32), pero no el anticuerpo de control de isotipo (IgG₁), redujo la muerte específica de células T2 cargadas con STAPPAHGV (Fig. 6C). Estos datos confirman que los presentes procedimientos se pueden usar para generar respuestas de células T específicas, biológicamente relevantes, tales como citotoxicidad.

EJEMPLO 2

50 Este ejemplo proporciona una técnica ilustrativa para determinar la identificación de porciones antigénicas más pequeñas de antígenos de células T. Como se ha explicado anteriormente, los antígenos más pequeños tienen el beneficio de una respuesta de células T más directa, y una producción más económica. Estos procedimientos implican básicamente aislar moléculas de clase I o clase II a partir de células, y determinar qué porciones del antígeno procesado son presentadas a las células T. Una vez que se determinan las estructuras de estos antígenos procesados, pueden formar la base para un refinamiento posterior de un epítipo de células T.

1. Materiales y Procedimientos

55 Productos químicos. El anticuerpo anti-IgG_{2b} de ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (GaM-IgG_{2b}HRPO) se adquirió de Southern Biotechnology Associates Inc. (Birmingham, AL), y se usó según las especificaciones del fabricante. La esteptavidina conjugada con HRPO, el sustrato de H₂O₂ y el cromógeno ABTS se obtuvieron como un kit de Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.

(Gaithersburg, MD). Las placas de microtitulación Maxisorb procedían de NUNC (Roskilde, Dinamarca).

NP40, aprotinina, leupeptina procedían de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), la yodoacetamida se obtuvo de Merck (Frankfurter Strasse, Darmstadt), PMSF de Boehringer Mannheim (Laval, Quebec, Canadá). CNBr-Sepharose y Sepharose 4b se adquirieron de Pharmacia LKB Biotechnology AB (Uppsala, Suecia), y la dietanolamina se adquirió de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). Todos los otros productos químicos se adquirieron de BDH (Toronto, Ontario, Canadá).

Aislamiento de HLA clase I a partir de estirpes celulares de carcinoma. Se hicieron crecer aproximadamente $2-3 \times 10^9$ células de cada estirpe celular de carcinoma en botellas giratorias. Después de un lavado con PBS, las células se lisaron en botellas giratorias haciéndolas girar durante 45 minutos a $2-8^\circ\text{C}$ con 10 ml de tampón de lisis (PBS que contiene 1 mg/ml de NaN_3 , 1% de NP40, 10 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina y aprotinina, 1 mM de PMSF, y 1,8 mg/ml de yodoacetamida). Los lisados se reunieron y se hicieron girar a 3600 g durante 15 minutos; el sobrenadante se hizo girar entonces a 100.000 g a 28°C durante 45 minutos. El lisado aclarado se almacenó congelado, a -20°C , hasta el uso posterior. Se hizo crecer DAUDI (no adherente) en matraces giratorios; las células se recogieron mediante centrifugación, se lavaron con PBS, y se extrajeron mediante detergente con el tampón de lisis como se describe anteriormente.

Los procedimientos para el aislamiento de HLA clase I se adaptaron de los procedimientos de Meshner *et al.*, Methods in Enzymology 92:86 (1983). Se prepararon columnas de afinidad específicas de HLA clase I (W6/32 y MA2.1) acoplando 10 mg de anticuerpo monoclonal a 5 ml de CNBr-Sepharose hinchada, siguiendo las especificaciones del fabricante. Se acopló una precolumna de Sepharose 4b en tándem con la columna de afinidad específica de HLA clase I, se equilibró con tampón de lavado de columna (PBS que contiene 1 mg/ml de NaN_3 , y 0,1% de NP40), se preeluyó con el tampón de elución (50 mM de dietanolamina con 0,1% de NP40, 0,15 M de NaCl pH 11,0), y después se volvió a equilibrar en el tampón de lavado de columna. Para CAPAN-1, se usó el mAb específico de HLA.A2, BB7.2, en tándem con una columna de W6/32.

El lisado se descongeló, y se cargó a través de las columnas a 0,3 ml/min. Después de desconectar la precolumna, las columnas de afinidad se lavaron frecuentemente con tampón de lavado de columna, después se eluyeron individualmente con el tampón de elución, se recogieron fracciones de 1 ml, y se neutralizaron inmediatamente con 1 M de Tris/HCl, no valorado. La actividad de HLA clase I en las fracciones se monitorizó mediante un ensayo ELISA de dos sitios, usando generalmente el mismo anticuerpo que la columna de afinidad como el captor de fase sólida, y 9H1 biotinilado (anti- β 2-microglobulina) o W6/32 biotinilado (cuando sea apropiado, anti-HLA clase I-A,B,C monomérico) como detector. Las fracciones obtenidas mediante ELISA reactivas a clase I se reunieron, se llevaron hasta a una concentración final de mM de PMSF, y se congelaron hasta uso posterior.

Aislamiento e identificación de péptidos MUC-1 a partir del material de HLA clase I purificado por afinidad procedente de estirpes celulares de carcinoma. Los procedimientos usados variaron ligeramente de una estirpe celular a otra, como se describe a continuación. En general, el material de HLA clase I purificado por afinidad se descongeló y se acidificó hasta pH 1 a 2 con ácido trifluoroacético al 10% (TFA), y después se filtró a través de 0,45 μ , seguido de 0,22 μ , para eliminar el precipitado. En algunos casos, se usó un filtro Centricon 3 (Millipore, Marlborough, MA) (corte 3000 daltons) para eliminar del eluato ácido cualesquiera proteínas de peso molecular elevado. Los péptidos liberados se separaron mediante HPLC de fase inversa, en una columna Zorbax C8, 4,6 x 250 mm, en un HPLC Waters 600E con un detector Waters 996DA (Millipore Corp., Milford, MA). La muestra se cargó en la fase móvil (TFA al 0,05%), y se eluyó con un gradiente de 0-60% de acetonitrilo en la misma fase móvil, durante 30 minutos, a un caudal de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml y se estudiaron para determinar la actividad de MUC-1 en un ELISA directo revistiendo las fracciones a una dilución 1/10 en pocillos de microtitulación (diluidos para contener < 15% de acetonitrilo), toda la noche.

Los pocillos revestidos con las fracciones se sondaron con anticuerpo monoclonal BCP8 20 ng/pocillo, en diluyente de ELISA. Las fracciones positivas a BCP8 se detectaron mediante $\text{G}\alpha\text{M}$ IgG2b HRPO (Southern Biotech). Estas se reunieron, se liofilizaron, y se resuspendieron en un pequeño volumen de TFA al 0,05% antes de la RP-HPLC secundaria. La HPLC secundaria fue una repetición de la HPLC primaria, o usó una columna Hypersil C18 de orificio estrecho equilibrada en hexafluoroacetona (HFA) al 0,1% pH 8,1 en H_2O , gradiente desde 0 hasta 100% de acetonitrilo durante 50 minutos, en el mismo modificador, a un caudal de 200 $\mu\text{l/min}$. Nijman *et al.*, J. Immunol 23: 1215 (1993); Henderson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:10275 (1983). Las fracciones se evaluaron nuevamente para determinar la actividad frente a BCP8 en ELISA directo, se reunieron y se liofilizaron, como se describe anteriormente.

La RP-HPLC secundaria (fracciones reunidas) se purificaron por afinidad en disolución con el anticuerpo monoclonal BCP8. Las fracciones reunidas liofilizadas se resuspendieron en un pequeño volumen de PBS. El material se hizo girar toda la noche a $2-8^\circ\text{C}$ con 250-300 μg de BCP8. El BCP8 y los péptidos unidos se separaron de los péptidos libres en una columna de 1 ml de proteína G-Sepharose, después se eluyó con ácido acético al 8%, pH 2. Las fracciones eluidas con la proteína G se volvieron a

cromatografiar usando la columna Zorbax C8 de la misma manera que para la RP-HPLC secundaria. Las fracciones reactivas a BCP8 mediante ELISA se analizaron mediante espectrometría de masas con electropulverización.

5 Análisis espectral de masas y secuenciación de péptidos. Los análisis espectrales de masas de las fracciones eluidas se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Micromass VG Quattro con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) que funciona en modo de ion positivo.

10 Secuenciación espectral de masas. La secuenciación de los fragmentos peptídicos se llevó a cabo en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con electropulverización Sciex ajustado con una celda de colisión en el segundo cuadrupolo. Las características de las secuencias de estos fragmentos se examinaron en una celda de colisión a través de la desintegración activada por colisión, y las secuencias se calcularon a partir de los iones hijos, analizados en el tercer cuadrupolo.

15 Inhibición competitiva de la unión de MAb BCP8 a motivos del péptido MUC-1 putativos aislados de MHC de clase I por péptidos MUC-1 sintéticos. Para mostrar la especificidad de la unión del anticuerpo BCP8 a los péptidos aislados de MCF-7, una fracción que eluye a 19 minutos después de la HPLC secundaria se diluyó 1/6 con PBS y se revistió sobre pocillos de microtitulación toda la noche, y después se bloqueó como se describe anteriormente. Los pocillos se incubaron con 2 ng de BCP8 en 100 µl de diluyente de ELISA, que también contiene cantidades de péptido que varían de 0 a 10 µM. Los péptidos usados en este experimento fueron los 9 meros, SAPDTRPAP y GVTSAPDTRF, y el 16 mero GVTSAPDTRPAPGSTA. El ELISA se procesó entonces como se describe anteriormente.

20 Confirmación de la especificidad por el péptido del MAb BCP8 en fases sólidas revestidas con el péptido. Se revistieron péptidos sintéticos en placas de microtitulación a 0-4000 nmoles/pocillo en 100 µl de PBS que contienen 1 mg/ml de NaN₃, toda la noche. Se llevó a cabo un ELISA directo como se describe anteriormente, excepto que se usaron 50 ng/pocillo de anticuerpo BCP8.

25 Cultivo de células T2. La estirpe celular mutante T2 fue proporcionada amablemente por Dr. Kevin Kane, Departamento de Inmunología, Universidad de Alberta, Edmonton, Canadá. La estirpe celular T2 se cultivó en RPMI 1640 con 5% de FBS, 1% de Nutridoma-HU (Boehringer-Mannheim, San Diego, CA), 1% de L-glutamina.

30 Péptidos sintéticos. En estos experimentos se usaron los siguientes péptidos sintéticos: los péptidos MUC-1 fueron secuencias corregidas procedentes de la repetición en tándem de MUC-1 (Tabla III): 9 meros: GVTSAPDTR, VTSAPDTRP, TSAPDTRPA, SAPDTRPAP, APDTRPAPG, PDTRPAPGS; 10 meros: GVTSAPDTRP, VTSAPDTRPA, TSAPDTRPAP, SAPDTRPAPG, APDTRPAPGS, PDTRPAPGST; 7 mer: TSAPDTR; péptido de control positivo (procedente del virus de la gripe): FLPSDYFPSV y de ovoalbúmina SIINFEKL. Péptido MUC-1 humano de 25 aminoácidos STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP, y su derivado lipopeptídico que contiene un grupo palmitoilo en el resto de lisina carboxi terminal, como se describe anteriormente. Se prepararon diversos péptidos sintéticos mediante síntesis automatizada en fase sólida con aminoácidos protegidos con Fmoc usando el sintetizador de péptidos Milligen/Bioresearch Modelo 9500 (Millipore, Marlborough, MA). Los péptidos tuvieron una pureza > 95%, como se determina mediante HPLC.

40 **Tabla III.** Péptidos sintéticos MUC-1 usados en el ensayo de células T2, y su posición en la repetición en tándem de MUC-1

		% de cambio ^a en la intensidad media del canal
Repetición en tándem deGVTSAPDTRPAPGSTAPPAH MUC-1		
9 meros	GVTSAPDTR	12
	VTSAPDTRP	29
	TSAPDTRPA	256
	SAPDTRPAP	48
	APDTRPAPG	66
	PDTRPAPGS	3
	DTRPAPGST	52

^a El % de cambio en la intensidad media del canal del control positivo (FLPSDYFPSV) fue 428.

Experimento de alimentación de T2 y análisis mediante FACS. Antes de los experimentos de alimentación de los péptidos, las células T2 se hicieron girar y se resuspendieron en RPMI 1640 con 1% de Nutridoma, 1% de L-glutamina, y 0, 5, 10 ó 20 µg/ml de β2-microglobulina. Las células se colocaron en placas de microtitulación a 3 x 10⁵ células/pocillo con 0-160 µmoles de péptido, toda la noche a 37°C y 7% de CO₂. Las células se tiñeron entonces con 0,5 µg/pocillo de MA2.1 o un IgG₁, control negativo. El anticuerpo monoclonal MA2.1 unido se detectó mediante incubación con GαM IgG₁, FITC. La fluorescencia se midió a 488 nm en un citómetro de flujo FACSort (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) en 5 días.

Antígenos liposómicos. El antígeno liposómico se formuló usando un derivado lipopeptídico del péptido MUC-1 de 25 aminoácidos humano STAPPAHGVTSPDTRPAPGSTAPP. El vehículo lipídico consistió en dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), colesterol (Chol) y dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG) (Genzyme, Cambridge, MA). Como un adyuvante, se incluyó monofosforil lípido A (MPLA) (Ribi Immunochem Research Inc., Hamilton, MT) en la mezcla lipídica.

Incubación de péptido liposómico con las APC. Los liposomas se cargaron con péptido como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

Cultivo de células T en masa. El cultivo de células T fue como se describió anteriormente en el Ejemplo 1.

Ensayos de linfocitos T citotóxicos. Para el ensayo de CTL, se usaron PBL de tres donantes normales (HLA.A2⁺). Las células T se hicieron crecer durante dos semanas en cultivos en masa como se describe anteriormente. Al final de las dos semanas, las células T vivas se cosecharon de los matraces y se contaron. Las células T usadas como dianas de CTL se cargaron toda la noche con diversos péptidos sintéticos MUC-1 a 200 µM en presencia de β2m exógena. Houbiers *et al.*, Eur. J. Immunol 23:2072-2077 (1993); Stauss *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:7871-7875 (1992). Estas células diana T2 cargadas con péptidos se cargaron entonces con ⁵¹Cr (usando NaCrO₄) durante 90 minutos, y se lavaron frecuentemente. Se realizaron ensayos de CTL como se describe previamente. Agrawal *et al.*, *más arriba*. El porcentaje de muerte específica se calculó como: liberación experimental – liberación espontánea/liberación máxima – liberación espontánea x 100. La relación de efector frente a diana se usó como (1, 10, 50, 100 y 150). Cada grupo se montó en cuatro réplicas, y se calculó el porcentaje medio de muerte específica. Como control negativo, en el ensayo citotóxico se usaron células T2 diana cargadas con el péptido de OVA SIINFEKL, y el porcentaje de muerte específica de las dianas cargadas con SIINFEKL se restó de cada punto de dato para obtener el porcentaje de muerte específica específico del péptido MUC-1.

2. Resultados

A. Péptidos asociados a MHC clase I aislados de estirpes celulares tumorales MUC-1⁺.

Tras la purificación mediante afinidad con W6/32 de las moléculas de MHC clase I procedentes de las células MCF-7, los péptidos en el pico positivo a W6/32 se liberaron mediante acidificación, y se separaron mediante RP-HPLC. Un cromatograma típico medido a 210 nm mostró una fuerte reactividad con el anticuerpo BCP8 en las fracciones que eluyen a 18-23 minutos (Fig. 7). No se observó reactividad con un anticuerpo de control negativo B195.3. Liu *et al.*, Glycoconjugate Journal 12:607-617 (1995); Reddish *et al.*, Glycoconjugate Journal 13: 1-12 (1996). Las fracciones 18-23 se volvieron a cromatografiar en una columna Zorbax C8 en las mismas condiciones, dando como resultado un cromatograma mucho más limpio con un pico visible a 17 a 17,5 min. con una fuerte reactividad a BCP8 en fracciones que eluyen a 16,5 a 17,5 min. (Fig. 8). El perfil de elución ligeramente diferente de la segunda HPLC es debido al uso de una elución en gradiente ligeramente diferente en la segunda HPLC (véase Materiales y Procedimientos). Nuevamente, no se observó reactividad con el MAb de control negativo B195.3.

El análisis espectral de masas de los conjuntos peptídicos procedentes de las fracciones reactivas a BCP8 mostró una gran cantidad de variación tanto en la longitud como en el número de péptidos. De los pesos moleculares, parece que estos péptidos oscilan entre 5 y 20 aminoácidos de longitud, cayendo la mayoría de ellos entre 10 y 20 aminoácidos de longitud. Se ensayó la especificidad de MAb BCP8 por los péptidos MUC-1 asociados a clase I eluidos. Se demostró en un reciente seminario de ISOBM (M.R. Price *et al.*, Summary Report on the ISOBM TD-4 Workshop: Analysis of 56 Monoclonal Antibodies Against MUC-1 Mucin, Tumor Biology 19:1-20 (1998)) que el MAb BCP8 anti-MUC-1 (Xing *et al.*, Cancer Res. 52:2310-7 (1992)) reacciona con el epítipo mínimo PDTRPA. La Fig. 9 demuestra que los dos péptidos sintéticos que contienen el epítipo mínimo PDTRPA inhibieron la unión de BCP8 a los péptidos MUC-1 aislados, mientras que el péptido sintético GVTSAPDTR no inhibió la unión.

En un segundo enfoque, el material positivo a W6/32 procedente de MCF-7 se trató con ácido,

después se neutralizó y se purificó por afinidad con BCP8. En las fracciones del pico A280, obtenidas tras la elución de una columna con proteína G, los péptidos purificados por afinidad se liberaron del anticuerpo mediante acidificación, y se separaron en la columna de RP-HPLC Zorbax C8 como se describe anteriormente. Las fracciones que eluyen a 17-18 min. tuvieron una potente reactividad a BCP8, y se sometieron a análisis espectral de masas y a secuenciación.

El espectro de masas (Fig. 10) mostró tres fragmentos prominentes que parecen ser productos de degradación de un péptido más grande de por lo menos 7 aminoácidos de longitud. Aunque la longitud de esta secuencia, que probablemente comienza con TSA, sigue siendo ambigua, los dos fragmentos tripeptídicos, H⁺ (TSA) y H⁺ (DTR), indican que constituyen los fragmentos N-terminal y C-terminal de una secuencia de siete aminoácidos de la repetición en tándem de MUC-1, respectivamente. La presencia del fragmento H⁺ (TSAPDT) y la ausencia de cualquier otro fragmento más allá de arginina conducen a la conclusión de que el péptido puede ser un 7 mero (TSAPDTR) o un péptido más largo.

El protocolo para CAPAN-1 (HLA.A2) fue realizar purificaciones de afinidad secuenciales de moléculas de clase I usando W6/32, seguido del MAb específico de HLA2.1, MA2.2. Los péptidos eluidos con ácido se hicieron girar entonces a través de un filtro giratorio Centricon 3 de 3000 dalton para eliminar posibles contaminantes de pesos moleculares más elevados. Este eluato peptídico se sometió a RP-HPLC en la columna Zorbax C8, que también reveló un único pico de reactividad del péptido MUC-1 detectado mediante MAb BCP8, nuevamente a 17-18 min.

B. Células de control negativo de MUC-1.

Se demostró que las células Daudi (mediante análisis de FACS) son negativas para la expresión de MUC1, pero positivas para la cadena pesada (W6/32 anti-HLA clase I A, B, C) y para la cadena ligera (9H1 anti-β2-microglobulina humana) de HLA clase I. Se procesaron de forma idéntica a la estirpe celular CAPAN-1, excepto para las modificaciones debido a su patrón de crecimiento no adherente. Después de la purificación mediante afinidad con W6/32, de la acidificación, seguido de la exclusión por tamaños (giro Centricon 3), y RP-HPLC del filtrado en la columna Zorbax C8, no se observó reactividad significativa con BCP8.

C. Aumento de la expresión de HLA.A2 en la superficie de células mutantes T2 por péptidos sintéticos derivados de MUC-1.

En experimentos con formato de damero, se determinó que la concentración óptima de β2-microglobulina para el aumento de clase I en células T2 era 20 μg/ml (de acuerdo con Nijman *et al.*, Eur. J. Immunol 23:1215 (1993)), y la cantidad de péptido se optimizó como 20 μmoles/pocillo (resultados no mostrados). Basándose en el hallazgo de la secuencia del péptido 7 mérico TSAPDTR MUC-1 asociado a MHC clase I mediante espectrometría de masas por electropulverización (Fig. 10), se examinó si el péptido TSAPDTR sintético puede aumentar la expresión de HLA.A2 en células T2. El péptido sintético TSAPDTR se usó en exceso a 50 μM/pocillo, junto con otras condiciones similares para otros péptidos 9 y 10 méricos. El péptido 7 mérico TSAPDTR no aumentó significativamente la expresión de HLA.A2 en la superficie de las células T2 (δMCI = 2, datos no mostrados). Entonces se determinó si el 9 mero TSAPDTRPA podría aumentar la expresión de clase I en células T2. La Fig. 11 muestra que el 9 mero TSA provocó un fuerte aumento de la expresión de clase I. Experimentos repetidos confirmaron el fuerte aumento de la expresión de clase I en células T2 por el 9 mero TSA, que es más fuerte que el aumento de la expresión de clase I por otros 9 meros de MUC1 (Tabla III):

D. Respuesta de linfocitos T citotóxicos *in vitro*.

Se realizaron ensayos de CTL *in vitro* para determinar si los péptidos MUC-1, que se ha demostrado que son capaces de unirse a HLA.A2 en células mutantes T2, pueden ser reconocidos como epítopos de CTL en el contexto de moléculas HLA.A2 del MHC clase I en células diana. Células T procedentes de PBL de tres donantes HLA.A2⁺ se cebaron *in vitro* frente al antígeno MUC-1 usando un derivado lipopeptídico de péptido MUC-1 de 25 aminoácidos encapsulado en PBL autólogos pulsados con liposoma como APC. Las células T estimuladas se cosecharon después de dos semanas de cultivo *in vitro* (con reestimulaciones bisemanales), y se ensayaron para determinar su actividad citotóxica frente a células T2 cargadas con péptido sintético derivado de MUC-1 (9 meros y 7 mero) como diana en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 5 h (Figura 6). Entre los siete péptidos sintéticos derivados de MUC-1 ensayados, las dianas cargadas con los péptidos 9 méricos TSA... y SAP... fueron exterminadas específicamente hasta el grado más elevado por los mismos dos donantes. Las dianas cargadas con el péptido 7 mérico TSA... fueron exterminadas débilmente por el donante 2 a mayores relaciones E/D. Otras dianas T2 cargadas con los péptidos mostraron un grado bajo a intermedio de muerte específica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biomira, Inc.

<120> Procedimiento para generar células T activadas y células presentadoras de antígenos

pulsadas con antígenos

<130> P008083EPA CJS

<140> EP 05076809.2

<141> 04/08/2005

5 <150> EP 98921011.7

<151> 07/05/1998

<150> PCT/US98/09288

<151> 07/05/1998

<150> US 60/045,949

10 <151> 08/05/1997

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val

1 5

<210> 2

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro

1 5

25 <210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: control de péptido de ovoalbúmina 8-mérico"

<400> 3

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
1 5 10 15

Ala His Gly Val

5 **20**

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 9

Gly Val Thr Ser

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Ser Ala Pro

1

<210> 11

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Asp Thr Arg

1

<210> 12

25 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>12

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
1 5 10 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser
1 5

5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr
1 5

10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> *Plasmodium falciparum*

15

<400> 20

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

20

<213> *Leishmania major*

<400> 21

Glu Ala Glu Glu Ala Ala Arg Leu Gln Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 24

25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 22

Asp Ser Thr Ser Ser Pro Val His Ser Gly Thr Ser Ser Pro Ala Thr
1 5 10 15

Ser Ala Pro Glu Asp Ser Thr Ser
20

ES 2 357 960 T3

<210> 23
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

5

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro
20

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

10

Ala Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val
1 5

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25

15

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
1 5 10

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

20

Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala
1 5 10

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

25

Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 29

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser
1 5 10

<210> 30

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr
1 5 10

20 <210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Thr Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

25 <210> 32

<211>4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 32

Asp Thr Arg Pro

1

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

5

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro

1

5

<210> 34

<211> 6

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Pro Asp Thr Arg Pro Ala

1

5

REIVINDICACIONES

1. Péptido MUC-1 modificado covalentemente con un resto lipídico, en el que el péptido MUC-1:
- (a) genera una respuesta de célula T específica del antígeno; y
- 5 (b) comprende una secuencia de 7 a 20 aminoácidos de la secuencia STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEC ID nº 5), en el que el péptido está lipidado con un grupo acilo graso monoinsaturado o poliinsaturado.
2. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según la reivindicación 1, en el que el péptido MUC-1 consiste en una secuencia de 7 a 20 aminoácidos de la secuencia
- 10 TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEC ID nº 23).
3. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según la reivindicación 1 o reivindicación 2, que presenta una secuencia de aminoácidos constituida por entre una y tres copias de un péptido de 7-20 aminoácidos de longitud obtenido del péptido STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEC ID nº 5).
4. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que
- 15 presenta una secuencia de aminoácidos constituida por entre una y tres copias del péptido STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEC ID nº 5).
5. Derivado de MUC-1 modificado por un lípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el lípido se selecciona de entre el grupo constituido por restos de palmitoílo, miristoílo, estearoílo y decanoílo.
- 20 6. Derivado de MUC-1 modificado por un lípido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el lípido es un resto de palmitoílo.
7. Composición que comprende un derivado de MUC-1 modificado por un lípido asociado liposómicamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que el liposoma es un liposoma multilaminar.
- 25 9. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP (SEC ID nº 5).
10. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según la reivindicación 9, que comprende además (a) un resto de lisina palmitoilada añadido al extremo carboxiterminal del péptido, y (b) un resto de glicina adicional.
- 30 11. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia TSAPDTRPA (SEC ID nº: 16).
12. Péptido MUC-1 modificado por un lípido según la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por: PDTRPA (SEC ID nº: 34), SAPDTRPAP (SEC ID nº: 2), TSAPDTR (SEC ID nº: 13), TSAPDTRPA (SEC ID nº: 16) y STAPPAHGV (SEC ID nº: 1).