



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 802**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06777167 .5**
96 Fecha de presentación : **05.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1922334**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2008**

54 Título: **Péptidos asociados a tumores unidos a moléculas del antígeno de leucocito humano (HLA) de clase I o II y vacunas contra el cáncer relacionadas.**

30 Prioridad: **05.09.2005 EP 05019255**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73 Titular/es: **IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GmbH**
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es: **Singh, Harpreet;**
Emmerich, Niels;
Walter, Steffen y
Weinschenk, Toni

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 802 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

Péptidos asociados a tumores unidos a moléculas del antígeno de leucocito humano (HLA) de clase I o II y vacunas contra el cáncer relacionadas.

5 La presente invención se refiere a métodos inmunoterapéuticos y a moléculas y a células para su uso en métodos inmunoterapéuticos. En concreto, la presente invención se refiere a la inmunoterapia del cáncer y, en particular, al cáncer renal. La presente invención se refiere, además, a epítomos peptídicos de linfocitos T colaboradores asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que actúan como ingredientes activos de vacunas que estimulan las respuestas inmunológicas contra los tumores. En particular, la presente invención se refiere a dos novedosas secuencias peptídicas derivadas de moléculas HLA de clase I y II de líneas celulares tumorales humanas, que puede ser usada en la composición de vacunas para provocar respuestas inmunológicas antitumorales.

Antecedentes de la invención

15 La estimulación de la respuesta inmunológica depende de la presencia de antígenos, reconocidos como extraños por el sistema inmune huésped. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha abierto la posibilidad de utilizar el sistema inmune del huésped para intervenir en el crecimiento del tumor. En la inmunoterapia del cáncer, actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las ramas humorales y celulares del sistema inmune.

20 Determinados elementos de la respuesta inmunológica celular son capaces de reconocer y destruir células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos de poblaciones de células destructoras de tumores o de sangre periférica sugiere que estos linfocitos tienen un papel importante en la defensa inmunológica natural contra el cáncer (Cheever y col, «Annals N.Y. Acad. Sci.» 1993 690: 101-112). En particular, los linfocitos T CD8⁺ (TCD8⁺), que reconocen péptidos que alojan moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de, normalmente, 8 a 10 residuos derivados de proteínas ubicadas en el citosol, tienen un papel importante en esta respuesta. Las moléculas MHC humanas también se designan antígenos de leucocito humano (HLA).

25 Existen dos clases de moléculas MHC: las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de las células con un núcleo con péptidos resultantes de la división proteolítica de proteínas endógenas y péptidos más largos; las moléculas MHC de clase II, que sólo se encuentran en células profesionales presentadoras de antígenos (APC). Presentan péptidos de proteínas exógenas que son absorbidos por las APC durante el proceso de endocitosis y, posteriormente, son procesadas. Los complejos de péptido y MHC de clase I son reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Los complejos de péptido y MHC de clase II son reconocidos por linfocitos T colaboradores CD4⁺.

30 Los linfocitos T colaboradores CD4⁺ tienen un papel importante en la organización de las funciones efectoras de las respuestas antitumorales de los linfocitos T y, por esta razón, la identificación de epítomos de linfocitos T CD4⁺ derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) puede ser de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunes antitumorales (Kobayashi H, R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herrera, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta y E. Celis; 2002; *Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen*; «Clin. Cancer Res»; 8: 3219-3225. Gnjatic, S, D. Atanackovic, E. Jäger, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth y L. J. Old; 2003; *Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses*; «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.»; 100(15):8862-7).

40 En muestras de mamíferos como, por ejemplo, ratones, se mostró que, incluso en ausencia de linfocitos T citotóxicos (CTL) efectores (es decir, de linfocitos T CD8⁺), los linfocitos T CD4⁺ son suficientes para inhibir la manifestación de tumores por medio de la inhibición de la angiogénesis por secreción de interferón- γ (IFN γ) (Qin, Z. y T. Blankenstein; 2000; *CD4+ T-cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells*; «Immunity»; 12: 677-686). Adicionalmente, se mostró que los linfocitos T CD4⁺ que reconocen péptidos de antígenos asociados a tumores presentados por moléculas HLA de clase II pueden contrarrestar la progresión del tumor por medio de la inducción de un anticuerpo (Ac) (Kennedy, R. C, M. H. Shearer, A. M. Watts y R. K. Bright; 2003; *CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen*. «Cancer Res.» 63:1040-1045). A diferencia de los péptidos asociados a tumores unidos a moléculas HLA de clase I, hasta ahora sólo se han descrito un pequeño número de ligandos de TAA de clase II (www.cancerimmunity.org, www.syfpeithi.de). Debido a que la expresión constitutiva de moléculas HLA de clase II normalmente está limitada a células del sistema inmune (Mach, B, V. Steimle, E. Martínez-Soria y W. Reith; 1996; *Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease*; «Annu. Rev. Immunol.» 14:301-331), no se consideró posible el aislamiento de péptidos de clase II directamente de tumores primarios. Por lo tanto, se han descrito numerosas estrategias para dirigir antígenos a la vía de procesamiento de clase II de células presentadoras de antígenos (APC). Por ejemplo, la incubación de APC con el antígeno en cuestión para permitir que sea absorbido, procesado y presentado (Chaux, P, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon y P. van der Bruggen; 1999. *Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes*; «J. Exp. Med.»; 189: 767-778); o la transfección de células con genes o minigenes codificantes del antígeno en cuestión y fusionados con la cadena invariante, que media en la translocación de antígenos al compartimento lisosomal de procesamiento y unión del MHC de clase II (MIIC).

Para que un péptido provoque una respuesta inmunológica celular, debe estar unido a una molécula MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de polimorfismos específicos de la secuencia de los aminoácidos del péptido. Los péptidos de unión a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 residuos y contienen dos residuos conservados en su secuencia que interactúan con el surco de unión correspondiente de la molécula MHC.

- 5 En ausencia de inflamación, la expresión de moléculas MHC de clase II está restringida principalmente a células del sistema inmune, especialmente a células profesionales presentadoras de antígenos (APC) como, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos o células dendríticas.

10 Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos de tumores, es decir, sus epítomos, pueden ser moléculas derivadas de cualquier clase de proteínas, como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. Además, los antígenos asociados a tumores también pueden estar presentes sólo en células tumorales como, por ejemplo, como producto de genes mutados. Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son las estructuras específicas de tejidos, como los antígenos CT (testículo canceroso) que son expresados en distintos tipos de tumor y en tejido sano del testículo.

15 Se han identificado diversos antígenos asociados a tumores. Además, se están dedicando muchos esfuerzos a la identificación de antígenos adicionales asociados a tumores. Algunos grupos de antígenos asociados a tumores, también llamados por los expertos «antígenos específicos de tumor», son específicos de tejidos. Algunos ejemplos incluyen, sin limitarse a ellos, la tirosinasa para el melanoma, el PSA y PSMA para el cáncer de próstata y los cruzamientos cromosómicos (translocaciones) como el bcr/abl, en el linfoma. Sin embargo, muchos de los antígenos asociados a tumores que se han identificado tienen lugar en muchos tipos de tumores y, algunos, como las proteínas oncógenas y/o los genes supresores de tumores (los genes supresores de tumores para el cáncer renal, por ejemplo, son analizados en Linehan, W. M., M. M. Walther, B. Zbar; *The genetic basis of cancer of the kidney*; «J Urol»; dic. 2003;170 (6 Pt 1): 2163-72), que son los que realmente causan el evento de transformación, tienen lugar en casi todos los tipos de tumor. Por ejemplo, las proteínas celulares normales que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, como las p53 (que es un ejemplo de gen supresor de tumor), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones y resultar en una regulación ascendente de la expresión de estos productos genéticos, transformándolos así en oncógenos (McCartey y col; «Cancer Research»; 1998; 15: 58 2601-5. Disis y col; «Ciba Found. Symp»; 1994; 187: 198-211).

30 La mucina-1 (MUC1) es una glucoproteína transmembrana de tipo I altamente glicosilada que está abundantemente sobreexpresada en la superficie celular de numerosos adenocarcinomas humanos como los cánceres de mama y de ovario. La deglicosilación aberrante en malignidades es común y desenmascara epítomos en células tumorales que podrían no presentarse en células normales. Además, la expresión de la MUC1 se ha demostrado en el mieloma múltiple y en algunos linfomas no hodgkinianos de linfocitos B (ADDIN). (Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, and Burchell J. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263:12820-12823 (1988); Siddiqui 1988; Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, and Taylor-Papadimitriou J. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer* 43:1072-1076 (1989); Brossart 1999; Duperray 1989; Mark 1989; Delsol 1988; Apostolopoulos V and McKenzie IF. Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev. Immunol.* 14:293-309 (1994); Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, and Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 145:61-89 (1995)). Diversos informes recientes (Apostolopoulos V and McKenzie IF. Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev. Immunol.* 14:293-309 (1994); Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, and Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 145:61-89 (1995); Barnd 1989; Takahashi 1994; Noto 1997) han demostrado que los linfocitos T MHC no restringidos de MHC citotóxicos de tumores ováricos, mamarios, pancreáticos y mielomas múltiples pueden reconocer epítomos del centro proteico MUC1 localizado en la repetición en tándem. Dos epítomos de linfocitos T restringidos de HLA-A2 derivados de la proteína MUC1 se han identificado (Brossart 1999, EP 1484397). Un péptido deriva de la región de la repetición en tándem de la proteína MUC1. El segundo péptido se localiza dentro de la secuencia de señal de MUC1. La inducción de respuestas de linfocitos T citotóxicos in vivo tras realizar vacunaciones con células dendríticas sensibilizadas de forma reiterada con el péptido en pacientes con cáncer avanzado de mama y ovario mediante esos péptidos se ha realizado con éxito (Brossart 2000) (Wierecky 2005). Con respecto al carcinoma de células renales, la expresión de MUC1 es común en tumores convencionales y se ha informado que están asociados con el grado y etapa (Fujita 1999; Kraus 2002; Leroy 2002; Bamias 2003; Cao 2000). Con MUC1, la sobreexpresión proteínica no está relacionada con la sobreexpresión de ARNm.

55 La adipofilina es un marcador para las células diferenciadas especializadas que contengan gotas de lípidos y para enfermedades asociadas a células que acumulen grasa (Heid 1998). La adipofilina tiene lugar en una amplia gama de líneas celulares cultivadas, incluyendo fibroblastos y células epiteliales y endoteliales. En los tejidos, sin embargo, la expresión de la adipofilina está restringida a determinados tipos de células, como a las células epiteliales mamarias lactantes, células Sertoli y Leydig del sistema reproductor masculino y esteatosis o hepatocitos de modificación grasa en cirrosis alcohólica de hígado (Heid 1998). Se ha informado que la adipofilina está sobreexpresada en el cáncer colorrectal (Saha 2001), el carcinoma hepatocelular (Kurokawa 2004) y en el carcinoma de células renales (RCC) (Young 2001).

c-Met codifica un receptor transmembranoso heterodimérico con actividad de tirosina-quinasa que está compuesta de una cadena alfa unida por disulfuro a una subunidad beta (Bottaro 1991; Rubin 1993). Ambas subunidades se expresan en la superficie, la subunidad beta pesada es responsable de la unión del ligando, la subunidad beta pesada es responsable de la unión del ligando, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), la subunidad alfa contiene un dominio intracelular que media en la activación de distintas vías de transducción de señal. La señalización de c-Met participa en la regeneración de órganos, como se ha demostrado con el hígado y el hígado, la embriogénesis, la hematopoyesis, el desarrollo muscular y en la regulación de la migración y adhesión de monocitos y linfocitos B activados normalmente (Zarnegar 1995; Naldini 1991; Montesano 1998; Schmidt 1995; Uehara 1995; Bladt 1995; Takayama 1996; Mizuno 1993; van, V 1997; Beilmann 2000). Además, numerosos estudios han indicado la participación de la sobreexpresión de c-Met en la transformación maligna y en la capacidad de invasión de las células malignas.

c-Met media en las actividades potencialmente oncogénicas y multifuncionales del HGF/factor esparcido, incluyendo la promoción del crecimiento celular, motilidad, supervivencia, disolución de matriz extracelular y angiogénesis (Bottaro 1991; Rubin 1993; Zarnegar 1995). La unión del HGF al receptor induce la autofosforilación de c-Met y activa los eventos de señalización en dirección 3', incluyendo las vías relacionadas con proteínas quinasas mitógeno activadas, fosfolipasas C γ , fosfatidilinositol 3-quinasa y ras (Naldini 1991; Montesano 1998; Furge 2000; Ponzetto 1993; Dong 2001; Furge 2001). El gen c-Met se expresa predominantemente en células epiteliales y se encuentra sobreexpresado en varias líneas celulares y tejidos malignos (Di Renzo 1995; Ferracini 1995; Tuck 1996; Koochekpour 1997; Li 2001; Fischer 1998; Maulik 2002; Qian 2002; Ramirez 2000). Un número cada vez mayor de informes ha mostrado que las células no epiteliales como las esqueléticas, neurales y hematopoyéticas responden a malignidades hematológicas y HGF como el mieloma múltiple, la enfermedad de Hodgkin, la leucemia y el linfoma expresa la proteína c-Met (Gherardi 1991; Teofili 2001; Borset 1999; Jucker 1994; Pons 1998). El control desregulado del fenotipo de crecimiento invasivo por c-Met activado oncógicamente provocado por mutaciones de activación de c-Met, amplificación/sobreexpresión de c-Met, y adquisición de asas autocrinas de c-Met/HGF confiere propiedades invasivas y metastáticas a las células malignas. Cabe destacar que la activación constitutiva del c-Met en ratones transgénicos con sobreexpresión de HGF promueve la génesis de tumores (Wang 2001; Takayama 1997).

El regulador de la proteína G señalizadora 5 (RGS5) es un regulador negativo de las vías de señalización de la proteína G heterotrimérica, aunque su función in vivo todavía no se conoce. Las proteínas RGS comprenden una familia de moléculas con una misma función catalítica pero con una distribución del tejido que varía. Estimulan la actividad intrínseca de guanosina trifosfatasa (GTPase) de subunidades G α activadas y, así, aceleran la inactivación de la proteína G. De esta forma, las moléculas RGS inhiben la dirección 3' de señalización de receptores acoplados a la proteína G (De 2000). Recientemente, se ha demostrado que la inducción del regulador de proteína G señalizadora 5 en pericitos coincide con la remodelación activa de los vasos durante la neovascularización del tumor. En un modelo de ratón de carcinogénesis de células del islote pancreático, así como en astrocitomas altamente angiogénicos, se ha demostrado la sobreexpresión del RGS5 en pericitos durante el cambio angiogénico que acompaña la remodelación activa de los vasos. La sobreexpresión estaba restringida a la vasculatura del tumor, en comparación con un islote de Langerhans normal. Sin embargo, también se da una regulación ascendente del RGS5 durante la curación de heridas y la ovulación (Berger 2005).

La expresión del RGS5 también aumenta en el RCC (Rae 2000). En otro estudio, el RT-PCR mostró una fuerte expresión del RGS5 en todos los RCC examinados, mientras que era muy débil o inexistente en los riñones normales (6.6:1 por PCR en tiempo real). Las células endoteliales del tumor fueron la ubicación principal del RGS5 en el RCC (Furuya 2004). Además, se ha informado que el RGS5 es un marcador celular endotelial sinusoidal en el carcinoma hepatocelular (Chen 2004).

La apolipoproteína L1 (APOL1) es una lipoproteína de alta densidad que se une a la apolipoproteína A-I. La apolipoproteína A-I es una proteína de plasma relativamente abundante y la principal apoproteína de las HDL. Participa en la formación de la mayoría de los ésteres de colesterol en el plasma y promueve la salida del colesterol de las células. Es posible que la apolipoproteína L1 tenga una función en el transporte e intercambio de lípidos en el organismo, así como en el transporte de colesterol inverso desde las células periféricas al hígado. La proteína de plasma es un polipéptido de cadena única con una masa molecular aparente de unos 40 kDa (Duchateau 1997; Duchateau 2001). El ADNc de la APOL1 se aisló de la genoteca de ADNc de la célula endotelial activada, mostrando una regulación ascendente por el TNF- α , que es una potente citoquina inflamatoria. (Monajemi 2002).

KIAA0367 se identificó en el proyecto de ADNc Kazusa, creado para identificar largos transcritos humanos desconocidos que codifican supuestas proteínas (Ohara 1997). Aunque la función del producto proteico largo del supuesto aminoácido 820 de KIAA0367 se desconoce, contiene un lípido CRAL-TRIO que une el dominio en el C-terminal que une pequeñas moléculas hidrofóbicas y que está presente en varios factores de intercambio de nucleótidos y en el BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína-proteína de interacción 2 (BNIP-2). BNIP-2 participa en el control de diversas funciones celulares incluyendo la morfología, migración y endocitosis celular y la evolución del ciclo celular (Zhou 2005). KIAA0367 se encuentra en la región cromosómica 9q21. Esta región se describe en muchos tumores como una diana común en la eliminación homocigótica (Gursky 2001; Weber 2001) o pérdida heterocigótica (Louhelainen 2000; Tripathi 2003).

La guanilato ciclasa soluble (sGC), proteína heterodimérica constituida por una subunidad alfa y otra beta (1 grupo hemo), cataliza la conversión de GTP al segundo mensajero cGMP y actúa como el receptor principal de medicamentos

nitrovasodilatadores y de óxido nítrico. GUCYa3 y b3 están sobreexpresados en los gliomas humanos. La transfección de GUCY1A3 o GUCY1B3 antisentido redujo la vascularización y el crecimiento del tumor en ratones desnudos. Esto podría deberse a que VEGF es inducido por cGMP (Saino 2004). GUCY1A3 promueve la migración de células de tumor en líneas celulares de tumor mamario del ratón (Jadeski 2003).

- 5 La ciclina D1 pertenece a la familia de ciclinas de alta conservación; más específicamente, a la subfamilia de ciclina D (Xiong 1991; Lew 1991). Las ciclinas actúan como reguladores de CDK (quinasas ciclina-dependientes). Cada ciclina exhibe un modelo diferenciado de degradación y expresión que contribuye a la coordinación temporal de cada mitosis (Deshpande 2005). La ciclina D1 forma un complejo que actúa como subunidad de regulación de CDK4 o CDK6, cuya actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. CCND1 forma, con CDK4 y CDK6, un complejo de
- 10 holoenzima de serina/treonina quinasa que aporta especificidad de sustrato al complejo (Bates 1994). Se ha demostrado que la proteína interactúa con la proteína Rb supresora de tumor (Loden 2002); la expresión de este gen es regulada positivamente por Rb (Halaban 1999). Las mutaciones, la amplificación y la sobreexpresión de este gen, que altera la progresión del ciclo celular, se observan con frecuencia en una variedad de tumores y es posible que contribuyan a la génesis de tumores (Hedberg 1999; Vasef 1999; Troussard 2000).
- 15 Las proteínas de la familia de la metaloproteínasa de la matriz (MMP) participan en la ruptura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejido, así como en procesos patológicos como la artritis y la metástasis (Mott 2004). La metaloproteínasa 7 de la matriz (MMP7) es secretada como proproteína inactiva de 29,6 kDa, que se activa cuando es hendida por proteinasas extracelulares. La enzima activa tiene un peso molecular de 19,1 kDa y une dos iones de zinc y dos iones de calcio por subunidad
- 20 (Miyazaki 1990; Browner 1995). MMP7 degrada gelatinas, fibronectina y caseína (Miyazaki 1990; Quantin 1989) y se diferencia de la mayoría de los miembros de la familia MMP en que carece de dominio C-terminal conservado (Gaire 1994). MMP7 se encuentra a menudo sobreexpresado en tejido maligno (Lin 2004; Bramhall 1997; Denys 2004) y se ha sugerido que facilita la invasión in vivo de células tumorales (Wang 2005).

Estas proteínas pueden ser el blanco de una respuesta inmune específica de tumor en muchos tipos de cáncer.

- 25 El péptido del antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B HBV-001 no deriva de un antígeno humano endógeno asociado a tumor, sino del antígeno de núcleo del virus de la hepatitis B. En primer lugar, permite comparar cuantitativamente la magnitud de las repuestas de los linfocitos T inducidas por péptidos asociados a tumor (TUMAP) y, por tanto, obtener conclusiones sobre la capacidad de provocar repuestas contra los tumores. En segundo lugar, actúa como importante control positivo en caso de carencia de repuestas de linfocitos T en el paciente. Y, en tercer lugar,
- 30 también permite obtener conclusiones sobre el estado de inmunocompetencia del paciente.

- La infección del virus de hepatitis B (HBV) es una de las principales causas de enfermedad de hígado, que afecta a, aproximadamente, 350 millones de personas en todo el mundo (Rehermann 2005). Debido a la facilidad de transmisión tanto horizontal como vertical y al potencial de enfermedad crónica que puede resultar en cirrosis de hígado y carcinoma hepatocelular, el HBV supone un impacto en los sistemas de salud públicos de muchos países. El genoma del HBV
- 35 (Previsani 2002) comprende ADN circular parcialmente bicatenario. En viriones de HBV, aparece junto con la proteína nuclear HBc y otras proteínas para formar la nucleocápsida, rodeada de una envoltura exterior que contiene lípidos y la familia de proteínas de superficie HBs (también llamadas proteínas de envoltura). Los determinantes antigénicos asociados con HBc y HBs se indican con las siglas HVCag y HBsAg, respectivamente. Estos antígenos están asociados a repuestas serológicas -es decir, de anticuerpos- encontradas en la sangre del paciente y se encuentran entre los
- 40 sistemas antígeno-anticuerpo clínicamente más útiles para el diagnóstico de la infección por HBV. HBc representará un novedoso antígeno para los individuos sin historia previa de infección de HBV. Debido a que los péptidos inmunógenos para este antígeno se conocen bien (Bertoletti 1993; Livingston 1997), se seleccionó un péptido de diez aminoácidos de HBcAg como antígeno de control positivo dentro de IMA: La inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de péptidos HBc se utilizará entonces como marcador de la inmunocompetencia del paciente y para la vacunación correcta.

- 45 La inmunoterapia en pacientes de cáncer busca activar células específicas del sistema inmune, especialmente los llamados linfocitos T citotóxicos (CTL, también conocidos como «linfocitos destructores» o linfocitos T CD8⁺), contra células del tumor, pero no contra tejido sano. Las células de tumor difieren de las células sanas por la expresión de la proteínas asociadas al tumor. Las moléculas de HLA de la superficie celular presentan el contenido de la célula al exterior, permitiendo así que un linfocito T citotóxico diferencia entre una célula de tumor y una sana. Esto se lleva a
- 50 cabo rompiendo todas las proteínas dentro de la célula en péptidos cortos, que se unen entonces a las moléculas de HLA y son presentadas en la superficie celular (Rammensee 1993). Los péptidos que son presentados en células de tumor pero no en células sanas del organismo, o en mucha menor medida, se denominan péptidos asociados a tumor (TUMAP).

- 55 Los primeros ensayos clínicos con péptidos asociados a tumores fueron realizados a mediados de los 90 por Boon y sus colegas, principalmente para el melanoma de indicación. Las repuestas clínicas en los mejores ensayos oscilan entre un 10% y un 30%. En ningún ensayo clínico con monoterapia de vacuna basada en péptidos se han registrado efectos secundarios graves ni autoinmunidad grave. En algunos pacientes tratados con péptidos asociados a melanomas se detectaron formas suaves de vitiligo.

Sin embargo, la sensibilización de un tipo de CTL no suele ser suficiente para eliminar todas las células del tumor. Los tumores son muy mutagénicos y, por tanto, son capaces de responder rápidamente a los ataques de los CTL modificando su modelo proteico para no ser reconocidos por los CTL. Con el fin de contraatacar a los mecanismos de evasión del tumor, se utiliza un variedad de péptidos específicos para la vacunación. En este sentido, se puede realizar un amplio ataque simultáneo contra el tumor usando varios clones de CTL de forma simultánea. Esto puede reducir las posibilidades del tumor de evadir la respuesta inmune. Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente en un estudio clínico para el tratamiento de pacientes con melanoma en fase tardía. Con sólo algunas excepciones, los pacientes que tuvieron al menos tres respuestas diferenciadas de linfocitos T mostraron respuesta clínica objetiva o enfermedad estable (Banchereau 2001) así como una mayor supervivencia (comunicación personal de J. Banchereau), mientras que la inmensa mayoría de pacientes con menos de 3 respuestas de linfocitos T fueron diagnosticados de enfermedad progresiva.

Hasta ahora, se han descrito numerosas estrategias para direccionalizar antígenos al sistema de procesamiento de clase I o II. Es posible incubar células presentadoras de antígenos (APC) con el antígeno deseado para que sea absorbido y procesado (Chaux, P., Vantomme, V., Stroobant, V., Thielemans, K., Corthals, J., Luiten, R., Eggermont, A. M., Boon, T. & van der, B. P. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 767-778. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M, Kreyborg K, Altenberend F, Brandenburg J, Kalbacher H, Brock R, Driessen C, Rammensee HG, Stevanovic S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 31;102(22):7922-7.). Otras estrategias usan las proteínas de fusión, que contienen secuencias blanco lisosomales. Expresadas en APC, estas proteínas de fusión dirigen a los antígenos al compartimento de procesamiento de clase II (Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J. & Bonifacino, J. S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351-369, Rodriguez, F., Harkins, S., Redwine, J. M., de Pereda, J. M. & Whitton, J. L. (2001) *J. Virol.* **75**, 10421-10430).

Para que las proteínas puedan ser reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos de tumores específicos, y para que se puedan utilizar en terapia, deben cumplirse una serie de requisitos. El antígeno debe estar expresado principalmente por células tumorales, y no por tejidos sanos normales o en pequeñas cantidades. También es deseable, no sólo que el antígeno correspondiente esté presente en un tipo de tumor, sino que, además, aparezca en concentraciones altas (en número de copias por célula, por ejemplo). La presencia de epítomos en la secuencia de aminoácidos del antígeno es esencial, ya que el péptido («péptido inmunógeno») que deriva de un antígeno asociado a un tumor debe inducir una respuesta de los linfocitos T in vitro o in vivo.

Un 30% de los pacientes, aproximadamente, sufre enfermedad metastática en la presentación; otro 25%, tumor local avanzado. El 40% de los individuos que se someten a resección quirúrgica terminan por desarrollar metástasis. Entre los individuos con enfermedad metastática, aproximadamente el 75% exhibe metástasis de pulmón; en el 36% se da participación del ganglio linfático o del tejido blando; en el 20%, de hueso y en el 18%, de hígado. La tasa de supervivencia de cinco años varía según el tipo en la clasificación Robson. En suma, el RCC se mantiene fatal en casi el 80% de los pacientes (Senn HJ, Drings P, Glaus A, Jungi WF, Pralle HB, Sauer R, and Schlag PM. *Checkliste Onkologie*, 5th edition. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/Nueva York (2001), Vokes EE y Golomb HM. *Oncologic Therapies*, 2ª edición. «Springer-Verlag», Berlin/Heidelberg, 2003).

La clasificación del carcinoma de células renales se está haciendo según la clasificación TNM (Guinan P. *TNM Staging of Renal Cell carcinoma*. Presentado en *Diagnosis and prognosis of Renal Cell Carcinoma: Workshop, 1997*, Rochester, Minnesota, 21 y 22 de marzo, comunicación de la UICC [Union Internationale Contre le Cancer] y la AJCC [American Joint Committee on Cancer], publicado por ASC [American Society Cancer] (1997), comunicación de la UICC). Véanse las tablas A y B más abajo.

Tabla A: Clasificación TNM del carcinoma de células renales

T1	<= 7,0 cm, limitado al riñón	N1	ganglio linfático regional aislado
T2	> 7,0 cm, limitado al riñón	N2	más de un ganglio linfático regional
T3	en venas principales, invasión perinéfrica o adrenal	M0	sin metástasis distante
T4	invade más allá de la fascia de Gerota	M1	metástasis distante

Clasificación AJCC	Clasificación TNM		
Fase I	T1	N0	M0
Fase II	T2	N0	M0
Fase III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0

Fase IV	T4	N0,N1	M0
	AnyT	N2	M0
	AnyT	AnyN	M1

Tabla B: Clasificación de Robson del carcinoma de células renales y supervivencia de cinco años

Clasificación de Robson Tasas de supervivencia de cinco años

Fase I / II	75% - 86%
Fase III	41% - 64%
Fase IV (T4)	15% - 18%
Fase IV (M1)	0% - 3%

* *American Foundation for Urologic Disease* (Fundación Americana de la Enfermedad Urológica)

5 El tratamiento estándar para el RCC en la nefrectomía radical (en todas las fases). La terapia de radiación puede utilizarse para reducir la propagación del cáncer, pero los carcinomas de células renales suelen ser resistentes a la radiación. La terapia hormonal puede reducir el crecimiento del tumor en algunos casos (menos del 10%). La quimioterapia actual no ha tenido una actividad significativa en esta enfermedad. La vinblastina, el 5-fluorouracilo (5-FU) y la floxuridina (FUDR) son los medicamentos de quimioterapia que más se han estudiado, pero sólo 5-FU y su metabolito FUDR han mostrado una tasa de actividad del 10%-12% (Vokes EE, y Golomb HM *Oncologic Therapies*, 2ª edición. «Springer-Verlag», Berlin/Heidelberg, 2003). La combinación de gemcitabina y 5-FU resultó en una tasa de respuesta del 17%.

10 Las autoridades de control de EE UU y Europa han evaluado en años recientes los tratamientos inmunológicos como el interferón alfa (IFN α) o la interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento de RCC avanzado. El tratamiento de IL-2 en dosis altas es, hasta la fecha, el único régimen inmunológico aprobado por la FDA. La monoterapia con IFN α registró inicialmente una tasa de respuesta del 25% al 30%, pero muchos ensayos adicionales han sugerido que la auténtica tasa es de tan sólo el 10% (Vokes EE y Golomb HM. *Oncologic Therapies*, 2ª edición. «Springer-Verlag», Berlin/Heidelberg, 2003). IL-2 parece tener una respuesta general similar comparada con el IFN α , con una tasa aproximada del 5% de pacientes que logran remisión completa durable (Rosenberg 1987). Un metaanálisis reciente de más de 6.000 pacientes con RCC avanzado llegó a la conclusión de que, como término medio, sólo se puede alcanzar una tasa respuesta clínica del 12,9% con terapia de citocina (por ejemplo, IFN α , inyecciones rápidas de IL-2 en dosis altas o inhalación de IL-2). El mismo análisis mostró una respuesta del 4,3% para el placebo y una respuesta del 2,5% en arcos de control sin inmunoterapia (Cochrane Database Syst Rev. 2000;(3):CD001425. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. Coppin C, Porzolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T).

15 Aunque, en los últimos años, se han desarrollado nuevas terapias que han mostrado eficacia clínica en muchas entidades tumorales, las tasas de supervivencia para el carcinoma de células renales no ha variado de forma significativa en la última década. Los posibles tratamientos sistémicos disponibles actualmente, la quimioterapia así como los tratamientos inmunológicos, han mostrado una eficacia relativamente baja y, lo que es más importante, están limitados por toxicidad sistémica significativa. Por lo tanto, existe una necesidad real de nuevas opciones de tratamiento para el carcinoma de células renales.

20 En la inmunización contra los tumores, los linfocitos T colaboradores desempeñan una función importante en la organización de la función efectora de los CTL. Los epítomos de linfocitos T colaboradores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T colaboradores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8 $^{+}$, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra células tumorales que presentan MHC/péptidos asociados a tumores en sus superficies. De esta forma, los epítomos peptídicos de linfocitos T colaboradores asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden actuar como ingredientes activos de vacunas que estimulen las respuestas inmunológicas contra los tumores.

25 El principal objetivo en el desarrollo de una vacuna tumoral es, por tanto, la identificación y caracterización de antígenos novedosos asociados a tumores y epítomos inmunógenos de linfocitos T colaboradores derivados de los mismos, que puedan ser reconocidos por linfocitos T CD8 $^{+}$ o CD4 $^{+}$ y, en particular, linfocitos T CD4 $^{+}$ de tipo TH1. Un objeto de la presente invención es, por tanto, proporcionar novedosas secuencias de aminoácidos para los péptidos que tienen la habilidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I (HLA de clase I). Otro objeto de la presente invención es proporcionar una vacuna efectiva contra el cáncer basada, al menos en parte, en dichos novedosos péptidos.

30 Conforme a la presente invención, el primer objetivo se consigue proporcionando un péptido asociado a tumor que comprende una secuencia conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2 del listado de secuencias adjunto o un péptido conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2, donde las cadenas laterales de uno o dos residuos de aminoácidos están

alterados, en donde el mencionado péptido posee la habilidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I (HLA de clase I) HLA-A*02.

En la presente invención, los inventores demuestran que es posible aislar y caracterizar péptidos unidos a moléculas HLA de clase II directamente de tumores de mamíferos, preferentemente tumores humanos y, más preferentemente, carcinomas de células renales.

La presente invención describe péptidos provenientes de antígenos asociados a la génesis de tumores y con la habilidad de unirse a moléculas HLA de clase II para desencadenar una respuesta inmune de leucocitos humanos, especialmente linfocitos, especialmente linfocitos T, especialmente linfocitos T CD4⁺, especialmente linfocitos T CD4⁺ mediadores de respuestas inmunes de tipo TH1.

La presente invención proporciona péptidos provenientes de antígenos HLA-A*02 asociados a la génesis de tumores y con la habilidad de unirse a moléculas HLA de clase I HLA-A*02 para desencadenar una respuesta inmune de leucocitos humanos, especialmente linfocitos, más especialmente linfocitos T y, más especialmente, linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

Los péptidos provienen de antígenos asociados a tumores, especialmente de antígenos asociados a tumores que participan, por ejemplo, en la proteólisis, la angiogénesis, la regulación del ciclo celular, la división celular, la regulación de la transcripción, la regulación de la traducción, la invasión de tejidos, incluyendo, por ejemplo, péptidos asociados a tumores de la metaloproteína 7 de la matriz (MMP7; SEQ ID n.º 1) y la Apolipoproteína L1 (APOL1; SEQ ID n.º 4).

En la presente invención, los inventores también proporcionan pruebas definitivas de que los péptidos asociados a tumores unidos de forma promiscua a moléculas HLA de clase II, especialmente a los alelos HLA de clase II codificados genéticamente por locus HLA-DR del genoma humano, son capaces de provocar respuestas inmunes mediadas por linfocitos T CD4⁺ humanos. Se aislaron linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica humana, demostrándose que los péptidos en cuestión son adecuados para desencadenar respuestas de linfocitos T del sistema inmune humano contra péptidos seleccionados del peptidoma de la célula tumoral. Tal y como se ejemplificó con un péptido de MMP7 (SEQ ID n.º 1), se descubrió que estos péptidos asociados a tumores y unidos promiscuamente a HLA-DR son reconocidos por linfocitos T CD4⁺.

De forma similar, se descubrió que los péptidos asociados a tumores unidos a moléculas HLA de clase I son capaces de provocar respuestas inmunes mediadas por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos humanos, demostrándose también que los péptidos reivindicados son adecuados para desencadenar respuestas del sistema inmune humano contra péptidos seleccionados del peptidoma de la célula tumoral.

Teniendo en cuenta que los péptidos pueden ser sintetizados químicamente y usados como ingredientes activos de preparaciones farmacéuticas, los péptidos proporcionados en la presente invención pueden ser usados para inmunoterapia, preferiblemente para inmunoterapia del cáncer.

Con el fin de identificar ligandos HLA de clase I o II del antígeno asociado al tumor (TAA) para el desarrollo de una inmunoterapia basada en péptidos, los inventores procedieron a aislar directamente los péptidos de tumores sólidos, en particular del carcinoma de células renales (RCC) (véanse ejemplos más abajo).

Las razones para centrarse en el RCC para demostrar técnicamente el concepto fueron las siguientes: alrededor de 150.000 personas en todo el mundo son diagnosticadas cada año de RCC. La enfermedad está asociada a una elevada tasa de mortalidad que resulta en, aproximadamente, 78.000 muertes al año (C. P. Pavlovich y L. S. Schmidt; 2004; *Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma*; «Nat. Rev. Cancer» 4: 381-393). Si se diagnostican metástasis, el índice de supervivencia de un año disminuye a, aproximadamente, un 60% (A. Jemal, R. C. Tiwari, T. Murray, A. Ghafoor, A. Samuels, E. Ward, E. J. Feuer y M. J. Thun; 2004; *Cancer statistics, 2004*; «CA Cancer J. Clin.» 54: 8-29), lo que subraya la gran necesidad médica sin cubrir. Debido a que el RCC parece ser un tumor inmunógeno (Oliver R. T. D, A. Mehta, M. J. Barnett; *A phase 2 study of surveillance in patients with metastatic renal cell carcinoma and assessment of response of such patients to therapy on progression*; «Mol Biother»; 1988;1:14-20. Gleave, M, M. Elhilali, Y. Frodet y col; *Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal cell carcinoma*; «N Engl J Med.» 1998;338:1265), tal y como indica la existencia de CTL reactivos ante tumores y destructores de los mismos (Finke, J.H., P. Rayman, J. Alexander, M. Edinger, R.R. Tubbs, R. Connelly, E. Pontes, y R. Bukowski; 1990; *Characterization of the cytolytic activity of CD4-positive and CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell carcinoma*; «Cancer Res.» 50: 2363-2370), se han iniciado ensayos clínicos para desarrollar vacunas contra tumores basadas en péptidos (Wierecky J, M. Mueller y P. Brossart; *Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1*; «Cancer Immunol Immunother»; 28 de abr. 2005). Sin embargo, debido a la falta de epitopos de linfocitos T colaboradores de TAA, las vacunas definidas molecularmente suelen comprender péptidos que funcionan sólo como ligandos de clase I.

El segundo objeto de la presente invención se resuelve proporcionando una preparación farmacéutica, preferiblemente en forma de vacuna, que es efectiva contra las células de cáncer, en particular contra las células de tumores sólidos, que comprende una cantidad efectiva de un péptido conforme a la invención, o que comprende un ácido nucleico que codifica dicho péptido. La vacuna puede contener, además, péptidos adicionales y/o excipientes para aumentar su eficacia, tal y como se explicará más adelante.

El péptido o el ácido nucleico codificador del péptido también puede constituir una vacuna contra el tumor o el cáncer. Puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o sistémicamente; o aplicarse *ex vivo* en células del paciente o de una línea celular humana que después se administra al paciente; o usada *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunes del paciente, al que luego se le vuelven a administrar.

5 En un primer aspecto de la invención se proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2, (VMAGDIYSV).

10 Tal y como se describe más abajo, los péptidos que forman la base de la presente invención han sido identificados como presentados por células portadoras de MHC de clase I (RCC). Por tanto, estos péptidos particulares, así como otros péptidos que contengan la secuencia (a saber, péptidos derivados), provocan una respuesta específica de los linfocitos T, si bien el alcance de dicha respuesta podría variar de un péptido a otro. Podrían producirse diferencias debido a mutaciones en los mencionados péptidos, por ejemplo (véase más abajo). El experto en la materia conoce bien los métodos que se pueden aplicar para determinar el alcance de una respuesta inducida por un péptido individual, en particular con respecto a los ejemplos contenidos aquí y en la literatura sobre la materia.

15 Preferiblemente, un péptido conforme a la presente invención está compuesto por una secuencia de aminoácidos conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2.

20 «Compuesto esencialmente de» significa que un péptido, además de la secuencia conforme a cualquiera de las secuencias SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 11, o una variante de las mismas, contiene fragmentos adicionales de aminoácidos ubicados en extremos N y/o C que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como secuencia central del péptido que comprende el motivo de unión y como un epítipo inmunógeno de linfocitos T colaboradores.

25 Sin embargo, estos fragmentos pueden ser importantes para proporcionar una introducción efectiva del péptido en las células conforme a la presente invención. En una forma de realización de la presente invención, el péptido de la presente invención comprende los 80 aminoácidos de extremo N de la cadena invariante asociada al antígeno HLA-DR (p33, «li» en adelante), como se deriva del NCBI, número de registro del GenBank X00497 (Strubin, M., B. Mach y E. O. Long; «The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity» *EMBO J.*, 3 [4], 869-872 [1984]).

30 Por «variante» de la secuencia de aminoácidos dada queremos decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos son alteradas (reemplazándolas, por ejemplo, con la cadena lateral de otro residuo natural de aminoácido u otra cadena lateral) de forma que el péptido todavía puede unirse a una molécula HLA básicamente de la misma forma que un péptido que esté compuesto por la secuencia de aminoácidos dada. Por ejemplo, un péptido puede ser modificado de forma que al menos mantenga, o mejore, la habilidad para interactuar y unirse a una molécula MHC adecuada, como la HLA-DRB1 en el caso de las moléculas HLA de clase II, o la HLA-A2 en el caso de las moléculas de clase I, y de forma que al menos mantenga, o mejore, la habilidad para generar CTL activados que puedan reconocer y destruir células que expresen de forma aberrante un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos como la definida en los aspectos de la invención, o la habilidad para estimular linfocitos T colaboradores que puedan proporcionar ayuda a linfocitos T CD8⁺ o atacar directamente a las células diana por medio de la secreción de citocinas. Como puede derivarse de la base de datos aquí descrita, determinadas posiciones de péptidos de unión de HLA-DR son residuos conservados que forman una secuencia central que se ajusta al motivo de unión del surco de unión del HLA. Las modificaciones de éstos y otros residuos que participan en la unión de HLA-DR pueden mejorar la unión sin alterar el reconocimiento de los CTL.

45 Los residuos de aminoácidos que no son esenciales para interactuar con el receptor del linfocito T pueden ser modificados mediante el reemplazo con otro aminoácido cuya incorporación no afecte de forma sustancial a la reactividad del linfocito T ni elimine la unión con el MHC relevante. Por lo tanto, aparte de la condición dada, el péptido de la invención podrá ser cualquier péptido (en cuya definición incluimos a los oligopéptidos y a los polipéptidos) que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o variante de las mismas, tal y como se ha especificado.

50 Se sabe, además, que los péptidos presentados por MHC de clase II están compuestos de una «secuencia central» con un determinado motivo de aminoácidos específico de HLA y, opcionalmente, extensiones N- y/o C-terminal que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, son considerados irrelevantes en la interacción del péptido y el linfocito T). Las extensiones N- y/o C-terminal pueden tener una longitud de entre 1 y 10 aminoácidos, respectivamente. Por lo tanto, un péptido preferido exhibe una longitud de entre 9 y 100 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 30 y, más preferiblemente, entre 9 y 16. Este péptido puede ser usado o bien directamente, para cargar moléculas MHC de clase II, o bien la secuencia puede ser clonada en los vectores según la descripción que se detalla más abajo. Puesto que estos péptidos forman el producto final del procesamiento de péptidos más largos dentro de la célula, también pueden usarse péptidos más largos. Los péptidos pueden ser de cualquier tamaño, aunque normalmente su peso molecular es inferior a 100.000 Da, preferiblemente inferior a 50.000 Da, más preferiblemente inferior a 10.000 Da y de, normalmente, unos 5.000 Da. Con respecto al número de residuos de aminoácidos, los péptidos pueden tener menos de 1000 residuos, preferiblemente menos de 500 residuos y, más preferiblemente, menos de 100 residuos.

En el aspecto fundamental de la presente invención, similar a la situación explicada más arriba para las moléculas MHC de clase II, los péptidos de la invención pueden ser usados para desencadenar una respuesta específica del MHC de clase I. Un péptido preferido específico de MHC de clase I exhibe una longitud total de entre 9 y 16 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 12 aminoácidos. Debe interpretarse que dichos péptidos podrían ser usados (en una vacuna, por ejemplo) como péptidos más largos, similares a los péptidos MHC de clase II. Los expertos en la materia conocen los métodos para identificar «secuencias centrales» específicas de MHC de clase I, con un motivo de aminoácido específico de HLA para moléculas HLA de clase I, y pueden predecirlos por medio de programas informáticos como, por ejemplo, el PAPROC (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) o el SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) (véase más abajo).

Los péptidos de la invención son particularmente útiles en métodos inmunoterapéuticos para permitir a los linfocitos T el reconocimiento de células que expresen de forma aberrante polipéptidos que forman la base de los péptidos de la invención. Debido a que estos péptidos específicos compuestos por las secuencias de aminoácidos dadas se unen a moléculas HLA de clase I HLA-A*02, se prefiere que sean aquellos de la invención que unan moléculas HLA de clase I HLA-A*02 -y que, una vez formado, el complejo HLA-péptido, cuando esté presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada, sea capaz de provocar la estimulación de linfocitos T que reconozcan células que expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos dada.

Si un péptido que es mayor de unos 12 residuos de aminoácidos es usado directamente para unirse a una molécula MHC, se prefiere que los residuos que flanquean la región central de unión de HLA sean los que no afecten de forma sustancial a la habilidad del péptido de unirse específicamente al surco de unión de la molécula MHC o de presentar al péptido a los linfocitos T. Sin embargo, tal y como se indicó anteriormente, se apreciará que pueden usarse péptidos más largos, especialmente si están codificados por un polinucleótido, ya que estos péptidos más largos pueden ser fragmentados por células presentadoras de antígenos adecuadas.

Se pueden derivar ejemplos de péptidos de variantes, motivos y ligandos de MHC, así como determinados ejemplos de extensiones N- y/o C-terminal en la base de datos SYFPEITHI (Rammensee H, J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor y S. Stevanovic; *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*; «Immunogenetics»; noviembre de 1999; 50 [3-4]: 213-9. Review) en <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com> y en las referencias allí citadas.

Algunos ejemplos de péptidos para el HLA-DR en la base de datos son: K H K V Y A C E V T H Q G L S S derivado de la cadena Ig kappa 188-203 (Kovats y col; «Eur J Immunol.»; abril de 1997; 27 [4]: 1014-21); K V Q W K V D N A L Q S G N S derivado de la cadena Ig kappa 145-159 (Kovats y col; «Eur J Immunol.»; abril de 1997; 27 [4]: 1014-21); L P R L I A F T S E H S H F derivado de GAD65 270-283 (Endl y col; «J Clin Invest»; mayo de 1997; 15, 99 [10]: 2405-15) o F F R M V I S N P A A T H Q D I D F L I derivado de GAD65 556-575 (Endl y col; «J Clin Invest»; mayo de 1997; 15, 99 [10]: 2405-15). Además, los péptidos también pueden derivarse de secuencias mutadas de antígenos, como en el caso del A T G F K Q S S K A L Q R P V A S, derivado de la proteína de fusión bcr-abl de 210 kD (Bosch y col; «Blood»; noviembre de 1996; 1, 88 [9]: 3522-7), G Y K V L V L N P S V A A T, derivado de HCV-1 NS3 28-41 (Diepolder y col; «J Virol»; agosto de 1997; 71 [8]: 6011-9), o F R K Q N P D I V I Q Y M D D L Y V G, derivado de HIV-1 (HXB2) RT 326-345 (van der Burg y col; «J Immunol.» enero de 1999; 1, 162 [1]: 152-60). Todos los aminoácidos de «anclaje» (como ejemplos de HLA-DR4, véase Friede y col; «Biochim Biophys Acta»; Junio de 1996; 7, 1316 [2]: 85-101. Sette y col; «J Immunol.» septiembre de 1993 15,151[6]:3163-70. Hammer y col; «Cell»; julio de 1993 16,74[1]:197-203. Hammer y col; «J. Exp. Med»; mayo de 1995; 1, 181 [5]: 1847-55) se han indicado en negrita y las supuestas secuencias centrales se han subrayado.

Todos los péptidos descritos anteriormente están englobados en el término «variantes» de la secuencia de aminoácidos dada.

En el concepto «péptido» los inventores no sólo incluyen moléculas en las que los residuos de aminoácidos están unidas por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también moléculas en las que el enlace peptídico está invertido. Estas formas *retro-inverso* pueden hacerse usando métodos conocidos por los especialistas en la materia, como los descritos por Meziere y col. (1997); «J. Immunol»; 159, 3230-3237. Este enfoque implica hacer pseudopéptidos que contengan modificaciones en el esqueleto y no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y col. (1997) muestran que, al menos para respuestas de linfocitos T colaboradores y MHC de clase II, estos pseudopéptidos son útiles. Los péptidos de tipo *retro-inverso*, que contienen uniones NH-CO en lugar de uniones peptídicas CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Normalmente, el péptido de la invención es aquel que, si está expresado en una célula presentadora de antígenos, puede ser procesado de forma que se produce un fragmento capaz de unirse a una molécula MHC adecuada y puede ser presentado por la célula apropiada y provocar una respuesta de linfocitos T adecuada. Se apreciará que un fragmento producido a partir del péptido puede ser también un péptido de la invención. Convenientemente, el péptido de la invención contiene una porción que incluye la secuencia de aminoácidos dada y otra porción más que le confiere alguna propiedad deseable. Por ejemplo, la porción añadida puede incluir otro epítipo de linfocito T (independientemente de que derive o no del mismo polipéptido que la primera porción que contiene el epítipo de linfocito T) o una proteína o un péptido portadores. De esta forma, el péptido de la invención, en una de sus modalidades, es una proteína de fusión de un fragmento de proteína y de una o más secuencias de aminoácidos de la invención.

En una modalidad especialmente preferida, los péptidos de la invención incluyen las secuencias de aminoácidos de la invención y, al menos, un epítipo de linfocito T más, en donde el epítipo de linfocito T es capaz de facilitar la producción de una respuesta del linfocito T dirigida al tipo de tumor que expresa de forma aberrante un antígeno asociado a un tumor. Por lo tanto, los péptidos de la invención incluyen cadenas perladas de polipéptidos que también pueden ser usadas como vacunas. Dichos péptidos pueden apartarse con ligadores químicos, que podrían contener aminoácidos (como cadenas G), pero que pueden –de forma adicional o alternativa– comprender grupos de ligamiento químicos (es decir, que no tienen una función, salvo la de proporcionar un espaciado concreto).

En el término «expresado de forma aberrante» incluimos el significado de que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen es silencioso en el tejido del que deriva el tumor pero sí se expresa en el tumor. Con el término «sobreexpresado» queremos decir que el polipéptido está presente a un nivel al menos 1,2 veces mayor que en tejido normal. Preferentemente a un nivel 2 veces mayor y, más preferentemente, a un nivel 5 o 10 veces mayor que en el tejido normal.

Los péptidos (al menos los que contienen enlaces peptídicos entre residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados por el modo de poliamida Fmoc de síntesis de péptidos de fase sólida, tal y como describen Lu y col. (1981) «J. Org. Chem» 46, 3433-3436 y las referencias ahí contenidas. La protección temporal del grupo N-amino se debe al grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La división repetitiva de este grupo de protección de alta base lábil se consigue utilizando piperidina al 20% en N, N-dimetilformamida. Las funcionalidades de la cadena lateral pueden estar protegidas como sus butil éteres (en el caso de la serina treonina y de la tirosina), butil ésteres (en el caso del ácido glutámico y del ácido aspártico), derivado del butiloxicarbonilo (en el caso de la lisina y la histidina), derivado del tritilo (en el caso de la cisteína) y de 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de la arginina). En donde la glutamina o la asparagina son residuos C-terminales, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxibencidrido para la protección de las funcionalidades amido de la cadena lateral. El apoyo de la fase sólida se basa en un polímero polidimetil-acrilamido constituido a partir de los tres monómeros dimetilacrilamido (monómero esqueleto), bisacriloleileno diamino (interconector) y acrilolsarcosino metil éster (agente funcionalizador). El agente ligado divisible péptido-resina usado es el derivado del ácido 4-hidroxi-metil-fenoxiacético ácido lábil. Todos los derivados de aminoácidos se añaden como sus derivados anhídridos simétricos preformados, con la excepción de la asparagina y la glutamina, que se añaden usando un procedimiento inverso de acoplamiento mediado por N, N-diciclohexil-carbodiimida/1hidroxi-benzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección son controladas usando procedimientos analíticos de isotina, ácido trinitrobenzenosulfónico o ninhidrina. Al completarse la síntesis, los péptidos se separan de la resina con eliminación concomitante de los grupos de protección de la cadena lateral por medio del tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% que contenga una mezcla depuradora al 50%. Los depuradores utilizados normalmente son etanoditol, fenol, anisol y agua. La elección exacta depende de los aminoácidos constituyentes del péptido que se esté sintetizando.

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío, con la posterior trituración con éter dietílico, proporcionando el péptido crudo. Los depuradores se eliminan por un procedimiento de extracción simple que, en la liofilización de la fase acuosa, proporciona un péptido crudo libre de depuradores. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden adquirir en Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UK.

La purificación se puede realizar mediante técnicas, o combinación de técnicas, como la cromatografía de exclusión, la cromatografía de intercambio de iones y, normalmente, la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida.

El análisis de los péptidos puede llevarse a cabo por medio de la cromatografía en capa delgada, la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida, el análisis de los aminoácidos después de la hidrólisis ácida, el análisis de espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos y el análisis de espectrometría de masa MALDI y ESI-Q-TOF.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (es decir, un polinucleótido) que codifica un péptido de la invención. El ácido nucleico conforme a la presente invención puede ser ADN, ADNc, PNA, CNA, ARN o combinaciones de los mismos y puede contener o no contener intrones siempre que codifique para el péptido. Naturalmente, sólo son codificables por el polinucleótido los péptidos que contienen residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídico naturales. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la invención.

Se han desarrollado una variedad de métodos para ligar polinucleótidos, especialmente ADN, con vectores; por ejemplo, mediante extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, se pueden añadir extensiones complementarias del homopolímero al segmento de ADN que se vaya a insertar en el ADN vector. El vector y el segmento de ADN se unen entonces, mediante un enlace de hidrógeno, entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Los conectores sintéticos que contengan uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores. El segmento de ADN, generado por digestión de restricción de endonucleasa como se describió anteriormente, es tratado con la ADN polimerasa T4 bacteriófaga o la ADN polimerasa I de E. coli, enzimas que eliminan los extremos 3' monocatenarios con sus actividades exonucleolíticas 3'-5' y rellenan los extremos 3' con sus actividades de polimerización.

La combinación de estas actividades genera, por tanto, segmentos de ADN de extremo romo. Los segmentos de extremo romo se incuban entonces con exceso molar de moléculas de conexión, en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la unión de moléculas de ADN de extremo romo, como la ADN ligasa T4 bacteriófaga. Por tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN que portan secuencias de ligador polimérico en sus extremos. Estos segmentos de ADN son divididos entonces con la enzima de restricción apropiada y ligados a un vector de expresión que ha sido dividido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.

Los ligadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasa de restricción se pueden adquirir de diversas fuentes, incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, EUA.

Una forma deseable de modificar el ADN codificante del polipéptido de la invención es usar la reacción en cadena de la polimerasa descrita por Saiki y col. (1988) «Science» 239, 487-491. Este método puede usarse para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo manipulando los sitios de restricción apropiados, o puede usarse para modificar en ADN de otras formas útiles conocidas por los expertos en la materia. En este método, para que el ADN sea amplificado enzimáticamente es flanqueado por dos cebadores específicos que se incorporan al ADN amplificado. Estos cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que pueden ser usados para la clonación en vectores de expresión mediante métodos conocidos por los expertos en la materia.

El ADN (o, en el caso de los vectores retrovirales, el ARN) se expresa entonces en un huésped apropiado para producir un polipéptido que comprende el compuesto de la invención. Así, el ADN que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede ser usado de acuerdo con técnicas conocidas, modificadas convenientemente en vista de las enseñanzas contenidas en la presente invención, para construir un vector de expresión que entonces es usado para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Dichas técnicas incluyen las descritas en las patentes de EUA n.º 4.440.859, concedida el 3 de abril de 1984 a Rutter y col; 4.530.901, concedida el 23 de julio de 1985 a Weissman; 4.582.800, concedida el 15 de abril de 1986 a Crowl; 4.677.063, concedida del 30 de junio de 1987 a Mark y col; 4.678.751, concedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel; 4.704.362, concedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura y col; 4.710.463, concedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray; 4.757.006, concedida el 12 de julio de 1988 a Toole Jr. y col; 4.766.075, concedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel y col. y 4.810.648, concedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker.

El ADN (o, en el caso de los vectores retrovirales, el ARN) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede unirse a una amplia variedad de secuencias de ADN para su introducción en el huésped adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del huésped, de la forma de introducción del ADN en el huésped y de si se desea la integración o el mantenimiento episomal.

Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión como, por ejemplo, un vector plasmídico, con la orientación adecuada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede unirse a las secuencias adecuadas de nucleótidos de control regulador de traducción y transcripción reconocidas por el huésped deseado, aunque tales controles suelen estar disponibles en el vector de expresión. El vector se introduce entonces en el huésped mediante las técnicas habituales. Generalmente, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar las células huésped transformadas. Una de las técnicas de selección implica la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios, que codifique un carácter seleccionable en la célula transformada como, por ejemplo, la resistencia a antibióticos.

De forma alternativa, el gen para dicho carácter seleccionable puede estar en otro vector, que es usado para cotransformar la célula huésped deseada.

Las células huésped que han sido transformadas por el ADN recombinante de la invención son cultivadas entonces durante el tiempo necesario y en las condiciones apropiadas, conocidas por los expertos en la materia en vista de las enseñanzas descritas en la presente invención, para permitir la expresión del polipéptido, que entonces puede ser recuperado.

Se conocen muchos sistemas de expresión, entre los que se encuentran bacterias (*E. coli* y *Bacillus subtilis*, por ejemplo), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo), hongos filamentosos (*Aspergillus*, por ejemplo) y células de plantas, animales e insectos. Con preferencia, el sistema puede ser un carcinoma de células renales (RCC) o células Awells.

Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite que tengan lugar la unión de la ARN polimerasa y la transcripción. Las secuencias de promotores compatibles con huéspedes bacterianos se encuentran normalmente en los vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción adecuados para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención. Algunos vectores plasmídicos procarióticos típicos son pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329, que se pueden adquirir en Biorad Laboratories, (Richmond, CA, EUA); y pTrc99A y pKK223-3, que se pueden adquirir en Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA

Un vector plasmídico típico de células de mamíferos es el pSVL, que se puede adquirir en Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA Este vector usa el promotor tardío SV40 para llevar a cabo la expresión de los genes clonados, habiéndose encontrado el mayor nivel de expresión en las células productoras de antígenos T, como las células COS-1. Un ejemplo de vector de expresión inducible de mamífero es el pMSG, que también puede adquirirse en Pharmacia. Este vector usa

el promotor inducido por glucocorticoide del duplicado del terminal largo del virus del tumor mamario del ratón para llevar a cabo la expresión del gen clonado. Los vectores plasmídicos de levadura pRS403-406 y pRS413-416 son útiles y, normalmente, pueden adquirirse en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración de levadura (Ylps) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómero de levadura (Ycps). Se conocen otros vectores y sistemas de expresión para ser usados con una variedad de células huésped.

La presente invención también hace referencia a una célula huésped transformada con un constructo vector polinucleótido de la presente invención. La célula huésped puede ser procariótica o eucariótica. En algunas circunstancias, las células bacterianas pueden ser preferentemente células huésped procarióticas y, normalmente, son una cepa de *E. coli* como, por ejemplo, las cepas *E. coli* DH5, que pueden adquirirse en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EUA, y RR1, que se puede adquirir en la *American Type Culture Collection* (ATCC) de Rockville, MD, EUA (No ATCC 31343). Las células huésped eucarióticas preferidas incluyen células de levadura, insectos y mamíferos y, con preferencia, células de vertebrados como, por ejemplo, de ratón, rata, mono o líneas celulares humanas de riñón o fibroblásticas. Las células huésped de levadura incluyen las YPH499, YPH500 y YPH501, que normalmente pueden adquirirse en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EUA Las células huésped de mamíferos preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), disponibles en la ATCC, como CCL61; células embrionarias de ratón suizo NIH NIH/3T3, disponibles en la ATCC, como CRL 1658; células COS-1 derivadas de riñón de mono, disponibles en la ATCC, como CRL 1650 y 293 células de riñón embrionario humano. Las células de insecto preferida son las células Sf9 que pueden sufrir transfección con vectores de expresión de baculovirus.

La transformación de los huéspedes celulares apropiados con un constructo de ADN de la presente invención se lleva a cabo con métodos bien conocidos que suelen depender del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de las células huésped procarióticas, véase, por ejemplo, Cohen y col. (1972) «Proc. Natl. Acad. Sci.» EE. UU, 69, 2110 y *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* de Sambrook y col. (1989) «Cold Spring Harbor Laboratory», Cold Spring Harbor, NY. La transformación de las células de levadura se describe en *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual* de Sherman y col. (1986) «Cold Spring Harbor» NY. También es útil *The method of Beggs* (1978) «Nature» 275, 104-109. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles para la transfección de dichas células como, por ejemplo, el fosfato cálcico y el dextran DEAE o las formulaciones de liposomas, se pueden adquirir en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EUA La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células, y se conoce bien su uso para la transformación de células de levadura, bacterias, insectos y vertebrados.

Las células transformadas correctamente, es decir, las que contienen un constructo de ADN de la presente invención, pueden ser identificadas por medio de técnicas conocidas. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de un constructo de expresión de la presente invención pueden cultivarse para producir un polipéptido de la invención. Las células pueden ser cultivadas y lisadas, y el contenido de su ADN puede ser examinado en busca de la presencia de ADN usando un método como el descrito por Southern (1975), «J. Mol. Biol.» 98,503 o por Berent y col. (1985), «Biotech.» 3,208. De forma alternativa, la presencia la proteína en el sobrenadante puede ser detectada usando anticuerpos, como se describe más abajo.

Además del análisis directo de la presencia de ADN recombinante, la transformación puede confirmarse por medio de métodos inmunológicos bien conocidos cuando el ADN recombinante es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, las células transformadas con un vector de expresión producen proteínas que presentan la antigenicidad apropiada. Las muestras de células que puedan haber sufrido transformación se cultivan y analizan en busca de la proteína utilizando los anticuerpos adecuados. Así, además de las propias células huésped transformadas, la presente invención también contempla el cultivo de dichas células, preferentemente monoclonal (clonalmente homogéneo) o derivado de un cultivo monoclonal, en un medio de nutrientes.

Se apreciará que algunas células huésped de la invención son útiles en la preparación de péptidos de la invención como, por ejemplo, células de bacterias, levadura e insectos. Sin embargo, también podrán ser útiles para ciertos métodos terapéuticos otras células huésped. Por ejemplo, las células presentadora de antígenos, como las células dendríticas, pueden ser usadas para expresar los péptidos de la invención de forma que sean cargadas en las moléculas MHC adecuadas.

Las células huésped preferidas son RCC o células Awells. Se prefiere un método de producción de un péptido asociado a un tumor conforme a la presente invención, método que comprende el cultivo de la célula huésped conforme a la presente invención y el aislamiento del péptido de la célula huésped o de su medio de cultivo, conforme a los métodos estándar.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un péptido para su absorción oral, rectal, nasal o lingual o inyección intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Las formas preferidas de inyección del péptido son las s.c, i.d, i.p, i.m e i.v. Las formas preferidas de inyección de ADN son las i.d, i.m, s.c, i.p e i.v. Se usarán dosis de entre 0,1 y 500 mg de péptido o ADN, tal y como se destaca más abajo.

Otro aspecto de la invención hace referencia al uso en medicina de un péptido asociado a un tumor conforme a la invención, un ácido nucleico conforme a la invención o un vector de expresión conforme a la invención.

5 El objeto de la presente invención, en otro de sus aspectos, se resuelve mediante una composición farmacéutica que contiene, al menos, un péptido asociado a un tumor conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2 conforme a la invención, un ácido nucleico conforme a la invención o un vector de expresión conforme a la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición se administra por vía parenteral como, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o por vía oral. Para ello, los péptidos son disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable y preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes como soluciones reguladoras, aglutinantes, agentes blásticos, diluyentes, aromas, lubricantes, etc.

10 Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias estimulantes de la respuesta inmune, como las citocinas. Una lista completa de excipientes que pueden usarse para esta composición aparece, por ejemplo, en A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», 3. Ed., 2000, *American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press*. La composición puede usarse para la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades adenomatosas o cancerosas.

15 La preparación farmacéutica que contiene al menos uno de los péptidos de la presente invención conforme a la SEQ ID n.º 2, un ácido nucleico conforme a la invención o un vector de expresión conforme a la invención, se administra a un paciente que sufre una enfermedad adenomatosa o cancerosa asociada al péptido o antígeno correspondiente. Así puede desencadenarse una respuesta inmune mediada por linfocitos T. La composición farmacéutica conforme a la presente invención también comprende preferiblemente al menos un péptido adicional asociado a tumor que comprende una secuencia conforme a cualquiera de las secuencias SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 10, el ácido nucleico correspondiente o el vector de expresión correspondiente.

20

En general, los péptidos presentes en la composición farmacéutica conforme a la invención tienen las mismas propiedades que se describen más arriba para los péptidos de la presente invención conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2. Pueden tener una longitud total de entre 9 y 100 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 30, y más preferiblemente entre 9 y 16 aminoácidos. Además, al menos un péptido conforme a cualquiera de las secuencias SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 11 puede tener enlaces no peptídicos. Además, los ácidos nucleicos correspondientes pueden codificar entre 9 y 100 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 30 y, más preferiblemente, entre 9 y 16 aminoácidos.

25

Se prefiere una composición farmacéutica conforme a la invención que comprenda péptidos (asociados a tumores, en particular) compuestos por secuencias de aminoácidos conformes a las secuencias SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 2 y SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 11.

30

Se prefiere una composición farmacéutica conforme a la invención, en la que la cantidad de péptido(s) (en particular, péptidos asociados a tumores), de ácido(s) nucleico(s) conformes a la invención o de vector(es) de expresión conformes a la invención presentes en la mencionada composición es/son específicos de tejido, cáncer y/o paciente.

El péptido también podrá estar etiquetado, o ser una proteína de fusión o una molécula híbrida.

35 El péptido puede ser sustancialmente puro o estar combinado con un adyuvante inmunoestimulante, o puede ser utilizado en combinación con citocinas inmunoestimulantes o administrado con un sistema de liberación adecuado como, por ejemplo, liposomas. Otros adyuvantes adecuados son el estimulón QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EUA), derivado de la saponina; extractos micobacterianos y pared bacteriana mimética sintética y adyuvantes registrados como el Detox. Quil A, otro adyuvante derivado de la saponina, también puede ser usado (Superfos, Dinamarca). Otros adyuvantes, como el adyuvante de Freund, también pueden ser útiles. También puede ser útil administrar el péptido conjugado con un vehículo apropiado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase el documento WO 95/18145 y Longenecker y col. (1993) «Ann. NY Acad. Sci.» 690, 276-291). Puesto que un adyuvante se define como una sustancia que potencia la respuesta inmune a un antígeno (Diccionario Médico MedlinePlus®, NIH), se pueden usar otras sustancias con esta función, incluyendo, sin limitarse a ellas, agonistas de receptores de tipo Toll (agonistas TLR), preferiblemente sustancias que interaccionan de forma agonística con TLR 3, 7, 8 y 9; más preferiblemente TLR 9, como el RNA estabilizador de la protamina, oligonucleótidos CpG, oligonucleótidos CpR, DNA bacteriano, imidazoquinolinas, etc.

40

45

Otras sustancias conocidas por los expertos en la materia por su adecuación para potenciar una respuesta inmune incluyen, sin limitarse a ellas: inhibidores de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), arginasa (ARG1), indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ciclooxigenasa-2 (COX-2), receptor I de TGF-beta (TGF-beta-RI). Tales inhibidores pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra las mencionadas moléculas o contra moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas y los anticuerpos monoclonales que se sabe que tienen una función inhibitoria hacia los factores mencionados más arriba y, por lo tanto, un efecto que potencia la respuesta inmune son, por ejemplo: 1-MT, NCX-4016, rofecoxib, celebrex, BEC, ABH, nor-NOHA, SB-505124, SD-208, LY580276, AMD3100, axitinib, bevacizumab, JSI-124, CPA-7, XL-999, ZD2171, pazopanib, CP-547632 y VEGF Trap.

50

55

Asimismo, las sustancias que reducen el número de linfocitos T reguladores (CD 4+, CD 25+, Fox P3+) son adecuados como adyuvantes. Entre estas se incluyen, sin limitarse a ellas: ciclofosfamida (Cytoxan), ONTAK (denileukina diftitox), Sunitinib, anti-CTLA-4 (MDX-010, CP-675206), anti-CD25, anti-CCL22 y anti-GITR.

5 En otra modalidad preferida, la vacuna es una vacuna de ácidos nucleicos. Se sabe que la inoculación con una vacuna de ácidos nucleicos, como una vacuna de DNA, que codifica un polipéptido lleva a una respuesta de linfocitos T. Puede administrarse directamente al paciente, al órgano afectado o sistémicamente, o aplicado ex vivo a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que, a continuación, se administran al paciente o son usadas in vitro para seleccionar una subpoblación de células inmunes derivadas del paciente que entonces se vuelven a administrar al paciente. Si el ácido nucleico se administra a células in vitro, puede ser útil que las células se transfecten de forma que
10 co-expresen citocinas estimulantes del sistema inmune, como la interleucina 2 o el GM-CSF.

La vacuna de ácidos nucleicos también puede ser administrada con un adyuvante como BCG o alum. Sin embargo, se prefiere que la vacuna de ácidos nucleicos se administre sin adyuvantes.

15 El polinucleótido puede ser substancialmente puro o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuados. Entre los vectores y los sistemas de liberación adecuados se encuentran los virales, como los sistemas basados en adenovirus, virus de la vaccinia, retrovirus, virus del herpes, virus adenoasociados o híbridos que contengan elementos de más de un virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos, conocidos por los expertos en la liberación de ADN. La liberación física por medio de una «pistola genética», por ejemplo, también puede usarse. El péptido o el péptido codificado por el ácido nucleico puede ser una proteína de fusión, con un epitopo del toxoide tetánico que estimule los linfocitos T CD4⁺, por ejemplo.

20 Cualquier ácido nucleico administrado al paciente es estéril y apirógeno. El ADN desnudo puede ser administrado por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea. Los péptidos pueden ser administrados por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea.

25 Convenientemente, la vacuna de ácidos nucleicos puede comprender cualquier medio de liberación adecuado del ácido nucleico. El ácido nucleico, preferentemente ADN, puede estar desnudo (es decir, sin ningún otro componente sustancial para ser administrado) o puede ser liberado en un liposoma o como parte de un sistema de liberación de un vector viral.

30 Se cree que la absorción del ácido nucleico y la expresión del polipéptido codificado por células especializadas en la presentación de antígenos como las células dendríticas puede ser el mecanismo para activar la respuesta inmune. Sin embargo, las células dendríticas pueden no estar transfectadas pero aún así son importantes, ya que pueden detectar péptidos expresados de células transfectadas en el tejido («reactividad cruzada», por ejemplo, Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. *Mesothelin-specific CD8(+) T-cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients*. «J Exp Med». 2 de agosto de 2004; 200(3):297-306).

35 Se prefiere que la vacuna de ácidos nucleicos, como la vacuna de ADN, se administre en el músculo, mientras que las vacunas de péptidos se administran preferiblemente por vía subcutánea o intradérmica. También se prefiere que la vacuna se administre en la piel. La vacuna de ácidos nucleicos puede administrarse sin adyuvante. La vacuna de ácidos nucleicos también puede administrarse con un adyuvante como BCG o alum. Otros adyuvantes adecuados son el estimulón QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EUA), derivado de la saponina; extractos micobacterianos y pared bacteriana mimética sintética y adyuvantes registrados como el Detox. Quil A, otro adyuvante derivado de la saponina, también puede ser usado (Superfos, Dinamarca). Se prefiere que la vacuna de ácidos nucleicos se administre
40 sin adyuvantes. Otros adyuvantes, como el adyuvante de Freund, también pueden ser útiles. También puede ser útil administrar el péptido conjugado con la hemocianina de lapa californiana, preferentemente también con un adyuvante.

45 La terapia de inmunización contra el cáncer por medio de un polinucleótido se describe en Conry y col. (1996) «Seminars in Oncology» 23,135-147; Condon y col. (1996) «Nature Medicine» 2,1122-1127; Gong y col. (1997) «Nature Medicine» 3,558-561; Zhai y col. (1996) «J. Immunol.» 156,700-710; Graham y col. (1996) «Int J. Cancer» 65,664-670; y Burchell y col. (1996) pp 309-313 *In: Breast Cancer, Advances in biology and therapeutics*, Calvo y col. (eds), John Libbey Eurotext.

50 También puede ser útil la direccionalización de la vacuna hacia poblaciones específicas de células como, por ejemplo, hacia células presentadoras de antígenos, bien por medio de inyecciones, vectores de direccionalización y sistemas de liberación; o por purificación selectiva de dicha población de células del paciente y administración *ex vivo* del péptido o del ácido nucleico (las células dendríticas, por ejemplo, pueden clasificarse tal y como se describe en Zhoy y col. [1995] «Blood» 86,3295-3301; o en Roth y col. [1996] «Scand. J. Immunology» 43,646-651). Por ejemplo, los vectores de direccionalización pueden comprender un promotor específico de tumor o de tejido que dirige la expresión del antígeno al lugar adecuado.

55 La invención, en otro de sus aspectos, hace referencia a una composición farmacéutica que contiene un péptido o más de los mencionados péptidos conformes a la invención. Esta composición se administra por vía parenteral como, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular o por vía oral. Para ello, los péptidos son disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable y preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener

excipientes como soluciones reguladoras, aglutinantes, agentes blásticos, diluyentes, aromas, lubricantes, etc. Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias estimulantes de la respuesta inmune, como las citocinas. Una lista completa de excipientes que pueden usarse para esta composición aparece, por ejemplo, en A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», 3. Ed., 2000, *American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press*. La composición puede usarse para la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades adenomatosas o cancerosas.

La preparación farmacéutica que contiene, al menos, uno de los péptidos de la presente invención conforme a la SEQ ID n.º 2 se administra a un paciente que sufre una enfermedad adenomatosa o cancerosa asociada al péptido o antígeno correspondiente. Así puede desencadenarse una respuesta inmune específica de CTL.

En otro aspecto de la presente invención, una combinación de dos o más péptidos conformes a la presente invención puede usarse como vacuna, tanto en combinación directa como dentro del mismo régimen de tratamiento. Además, pueden usarse combinaciones con otros péptidos como, por ejemplo, péptidos específicos de MHC de clase I o II. El experto en la materia será capaz de seleccionar las combinaciones preferidas de péptidos inmunógenos por medio del análisis, por ejemplo, de la generación de linfocitos T *in vitro* así como su eficacia y presencia global, la proliferación, afinidad y expansión de determinados linfocitos T para determinados péptidos, y la funcionalidad de los linfocitos T; por ejemplo, analizando la producción de IFN- γ (véanse también los ejemplos más abajo). Normalmente, los péptidos más eficaces son entonces combinados como vacuna para los propósitos descritos más arriba.

Una vacuna adecuada contendrá preferiblemente entre 1 y 20 péptidos; más preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 péptidos distintos; aún más preferiblemente 6, 7, 8, 9, 10 o 11 péptidos distintos y, de máxima preferencia, 11 péptidos distintos. La longitud del péptido para una vacuna contra el cáncer puede ser cualquier péptido apropiado. En particular, puede ser un péptido apropiado de 9, 7, 8, 10, 11 o 12 meros. Los péptidos más largos también pueden ser apropiados. Se prefieren los de 9 o 10 meros, tal y como se describe en la tabla 1 adjunta, para los péptidos MHC de clase I.

El/Los péptido(s) constituye(n) una vacuna contra un tumor o un cáncer. Puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o sistémicamente; o aplicarse *ex vivo* en células del paciente o de una línea celular humana que después se administra al paciente; o usada *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunes del paciente, al que luego se le vuelven a administrar. El péptido también podrá conjugarse con un vehículo apropiado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase el documento WO 95/18145 y Longenecker y col. (1993) «Ann. NY Acad. Sci.» 690,276-291). La vacuna de péptidos puede administrarse sin adyuvante. La vacuna de péptidos también puede administrarse con un adyuvante como BCG o alum. Otros adyuvantes adecuados son el estímulo QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EUA), derivado de la saponina; extractos micobacterianos y pared bacteriana mimética sintética y adyuvantes registrados como el Detox. Quil A, otro adyuvante derivado de la saponina, también puede ser usado (Superfos, Dinamarca). Otros adyuvantes, como el adyuvante de Freund, también pueden ser útiles. También puede ser útil administrar el péptido conjugado con la hemocianina de lapa californiana, preferentemente también con un adyuvante. También se pueden usar otros adyuvantes, como los mencionados más arriba. El péptido también podrá estar etiquetado, o ser una proteína de fusión o ser una molécula híbrida. Los péptidos cuya secuencia se da en la presente invención han de estimular el linfocito T citotóxico CD8⁺. Sin embargo, la estimulación es más eficiente con la ayuda de linfocitos T CD4⁺. Así, las secciones de fusión de una molécula híbrida proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4⁺. Estos epítopos son conocidos por los expertos en la materia e incluyen a los identificados en el toxoide tetánico.

En una modalidad particularmente preferida de la vacuna de péptidos conforme a la invención, dicha vacuna es una vacuna de múltiples péptidos para el tratamiento del carcinoma de células renales. Preferiblemente, dicha vacuna comprende un grupo de péptidos asociados a tumores conforme a las secuencias SEQ ID n.º 1 a 10 que se encuentran y han sido identificadas en células primarias de cáncer renal. Este grupo incluye péptidos HLA de clase I y II. El grupo de péptidos también puede contener al menos un péptido, como el del antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B, utilizado como control positivo que actúa como marcador inmunitario para probar la eficiencia de la administración intradérmica. En una modalidad particular, la vacuna está compuesta por 11 péptidos individuales (conforme a las secuencias SEQ ID n.º 1 a 11) de entre 1500 μ g y 75 μ g; preferiblemente entre 1000 μ g y 750 μ g; más preferiblemente, entre 500 μ g y 600 μ g y, de mayor preferencia, unos 578 μ g de cada péptido. Todos ellos pueden ser purificados por HPLC y cromatografía de intercambio de iones y aparecer como polvo blanco o blanco hueso. El liofilizado se disuelve preferentemente en hidrogenocarbonato de sodio y es utilizado para su inyección intradérmica 30 minutos después de su reconstitución a temperatura ambiente. Conforme a la presente invención, las cantidades preferidas de péptidos pueden variar entre unos 0,1 y 100 mg, preferentemente entre unos 0,1 y 1 mg y, con mayor preferencia, entre unos 300 μ g y 800 μ g por 500 μ l de solución. Con el término «unos» implicamos un porcentaje de +/- 10 del valor dado, si no se establece de otra forma. El experto en la materia sabrá ajustar la cantidad real de péptido necesaria basándose en diversos factores como, por ejemplo, el estado inmunitario del paciente individual y/o la cantidad de TUMAP presentado en un tipo particular de cáncer. Los péptidos de la presente invención podrían suministrarse en otras formas adecuadas (soluciones estériles, etc.), en lugar de en un liofilizado.

Algunos de los péptidos cuya secuencia se da en la presente invención han de estimular linfocitos T citotóxicos CD8⁺. Sin embargo, la estimulación es más eficiente con la ayuda de linfocitos T CD4⁺. Así, las secciones de fusión de una molécula híbrida proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4⁺. Los epítopos estimulantes de CD4⁺ son

bien conocidos en la materia e incluyen a los identificados en el toxoide tetánico o el péptido del MMP7 proporcionado por esta invención.

- 5 Finalmente, la vacuna conforme a la invención puede depender del tipo de cáncer específico que el paciente sufra así como del estado de la enfermedad, regímenes de tratamiento anteriores, el estado inmune del paciente y, naturalmente, el haplotipo HLA del paciente. Además, la vacuna conforme a la invención puede contener componentes individualizados, conforme a las necesidades personales del paciente. Ejemplos de ello son distintas cantidades de péptidos conforme a la expresión de los TAA relacionados en dichos pacientes, efectos secundarios no deseados debido a alergias del paciente u otros tratamientos y ajustes para tratamientos secundarios después de una primera ronda o esquema de tratamiento.
- 10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un péptido según la invención, o de un polinucleótido o un vector de expresión que codifique dicho péptido, en la fabricación de un medicamento para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. Se prefiere el uso en forma de composición farmacéutica que es una vacuna contra el cáncer.
- 15 Otro aspecto más de la presente invención proporciona el uso de un péptido conforme a la invención, o de un polinucleótido o un vector de expresión que codifica dicho péptido, para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta inmune celular y, más particularmente, una respuesta inmune mediada por linfocitos T contra células de tumores sólidos cuyas células expresan una molécula MHC de clase I humana en su superficie y presentan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención.
- 20 En el contexto de la presente invención se ha descubierto de forma inesperada que las células de tumores sólidos, en comparación con las células sanas del mismo tejido, expresan la molécula humana HLA de clase II en su superficie. Este hecho sólo ha sido descrito una vez por Brasanac y col. (D. Brasanac, J. Markovic-Lipkovski, J. Hadzi-Djokic, G. A. Muller, C. A. Muller; Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma: *correlation with clinical and histopathological data*. «Neoplasma» 1999; 46(3): 173-8), en el que se
- 25 estudiaron secciones de criostato de 37 carcinomas de células renales (RCC) –25 de células claras, 10 granulares y 2 cromóforas– con el método indirecto de inmunoperoxidasa, aplicándose anticuerpos monoclonales (AcMo) a los antígenos HLA-DR, -DP y -DQ para el análisis de antígenos HLA de clase II, y AcMo anti-CD14, -CD3, -CD4 y -CD8 para células mononucleares destructoras de tumores (TIM). El número de células positivas se calculó semi-cuantitativamente y se estableció una correlación entre los resultados de la investigación inmunohistoquímica y las
- 30 características clínicas (edad y sexo del paciente, tamaño del tumor y clasificación TNM) e histopatológicas (citología, histología, grado) del RCC. Todos los RCC expresaron antígenos HLA-DR, un 92% de -DQ y un 73% de -DP con una jerarquía en el nivel de expresión de -DR>-DQ>-DP, pero no se pudo establecer una correlación de importancia estadística con ninguno de los parámetros clínicos o histopatológicos analizados. Los monocitos fueron más abundantes que los linfocitos T y los linfocitos T CD4⁺ más que los CD8⁺, mientras que los tumores con predominancia de linfocitos T y con aproximadamente el mismo número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tuvieron el mayor diámetro medio. La
- 35 activación inadecuada de los linfocitos T por células tumorales (a pesar de su capacidad para presentar antígenos) pudo ser la razón para una asociación de parámetros que indica un comportamiento tumoral más agresivo con expresión aberrante del antígeno HLA de clase II en RCC.
- 40 Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un péptido conforme a la invención, o de un polinucleótido o de un vector de expresión que codifica tal péptido, en la fabricación de un medicamento para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la dada en cualquiera de las secuencias SEQ ID n.º 2.
- Otro aspecto de la invención proporciona, por lo tanto, métodos para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados in vivo o in vitro, en donde uno de los métodos comprende el contacto in vitro de los linfocitos T con moléculas humanas
- 45 MHC de clase I con carga de antígenos, expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada durante un periodo de tiempo suficiente para activar, de una forma propia de los antígenos, dichos linfocitos T, en donde el antígeno es un péptido conforme a la invención. Un segundo método, que se prefiere al anterior, es descrito por Walter y col. (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. *Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres*. «J Immunol.» 15 de noviembre de 2003 ; 171(10):4974-8.).
- 50 Las moléculas MHC de clase II pueden ser expresadas en la superficie de cualquier célula adecuada. Se prefiere que dicha célula no exprese de forma natural moléculas MHC de clase II (en cuyo caso, se realiza la transfección en la célula para que exprese dicha molécula) o, si lo hace, sea defectuosa en las vías de procesamiento o de presentación de los antígenos. En este sentido, es posible que la célula que expresa la molécula MHC de clase II sea sensibilizada completamente con un antígeno del péptido antes de activar los CTL.
- 55 La célula presentadora de antígenos (o célula estimulante) se caracteriza por tener en su superficie una molécula MHC de clase I o II y, preferentemente, no ser capaz de realizar por sí misma la carga de dicha molécula con el antígeno seleccionado. Tal y como se describe más abajo, la molécula MHC de clase I o II puede cargarse fácilmente *in vitro* con el antígeno seleccionado.

Preferentemente, la célula del mamífero carece o tiene un nivel o función reducida del transportador peptídico TAP. Entre las células adecuadas que carecen del transportador TAP se incluyen las T2, RMA-s y Drosophila. TAP es el transportador asociado al procesamiento antigénico.

5 La línea celular humana T2 con carga peptídica defectuosa está disponible en la ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EUA, con el n.º de catálogo CRL 1992. La línea 2 de Drosophila de Schneider está disponible en la ATCC, con el número de catálogo CRL 19863. La línea celular del ratón RMA-S se describe en Karre y Ljunggren (1985), «J.Exp.Med.», 162, 1745.

10 Convenientemente, la célula huésped, antes de la transfección, no expresa moléculas MHC de clase I de forma sustancial. También se prefiere que la célula estimulante exprese una molécula importante para la estimulación conjunta del linfocito T como, por ejemplo, cualquiera de las B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3.

En otra modalidad, también se pueden utilizar combinaciones de moléculas HLA.

15 El uso de vacunas de poliepítopos recombinantes para la liberación de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ múltiples se describe en Thomson y col. (1996) «J. Immunol.» 157, 822-826 y en el documento WO 96/03144. En relación con la presente invención, es deseable y ventajoso incluir en una única vacuna un péptido (o un ácido nucleico que codifique un péptido) que incluya, en cualquier orden, una secuencia de aminoácidos de la presente invención y otro epítipo estimulante de los linfocitos T CD4⁺ (como de MMP7). Esta vacuna sería particularmente útil en el tratamiento del cáncer.

20 Pueden usarse otros métodos para generar linfocitos T citotóxicos in vitro. Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples y col. (1995) «Proc. Natl. Acad. Sci.», EE. UU., 92,432-436 y en Kawakami y col. (1992) «J. Immunol.» 148 usan linfocitos autólogos destructores de tumores en la generación de linfocitos T citotóxicos. En Plebanski y col. (1995) «Eur. J. Immunol.» 25, 1783-1787, se hace uso de linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) en la preparación de linfocitos T citotóxicos. En Jochmus y col. (1997) «J. Gen. Virol.» 78,1689-1695, se describe la producción de linfocitos T citotóxicos autólogos por medio de la utilización de células dendríticas sensibilizadas de forma reiterada con péptidos o polipéptidos o por medio de la infección con un virus recombinante. Hill y col. (1995) «J. Exp. Med.» 181, 2221-2228 y Jerome y col. (1993) «J. Immunol.» 151,1654-1662, usan linfocitos B en la producción de linfocitos T citotóxicos autólogos. Adicionalmente, en la preparación de CTL autólogos también pueden usarse macrófagos sensibilizados de manera repetida con péptidos o polipéptidos, o infectados con virus recombinante.

30 Las células alogénicas también pueden ser usadas en la preparación de linfocitos T citotóxicos. Este método se describe en detalle en el documento WO 97/26328. Por ejemplo, además de las células de Drosophila y T2, pueden usarse otras células para presentar antígenos, como las células CHO, las células de insecto infectadas por baculovirus o células diana de bacterias, levadura o infectadas por vaccinia. Adicionalmente, pueden usarse virus de plantas. Véase, por ejemplo, Porta y col. (1994) «Virology» 202, 449-955, en donde se describe el desarrollo del virus del mosaico del garbanzo como un sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos foráneos.

35 Preferiblemente, en el método conforme a la presente invención, la célula presentadora de antígenos comprende un vector de expresión como se ha indicado anteriormente.

Los linfocitos T activados que son dirigidos contra los péptidos de la invención son útiles para terapia.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T activados que pueden obtenerse mediante los métodos mencionados en la invención.

40 Otro aspecto más de la invención proporciona linfocitos T activados que reconocen de manera selectiva una célula que expresa de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. Preferiblemente, los linfocitos T reconocen la mencionada célula mediante la interacción con el complejo HLA/péptido (por ejemplo, mediante unión). Los linfocitos T son útiles en un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, donde al paciente se le administra un número efectivo de los linfocitos T activados. Los linfocitos T que se administran al paciente pueden derivar del paciente y activarse como se describe más arriba (es decir, son linfocitos T autólogos). De forma alternativa, los linfocitos T no son del paciente, sino de otro individuo. Naturalmente, se prefiere que el individuo sea un individuo sano. Por «individuo sano», los inventores entienden un individuo con una buena salud general, preferiblemente con un sistema inmune competente y, más preferiblemente, que no sufre de ninguna enfermedad que pueda detectarse con facilidad.

50 Los linfocitos T activados expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que se encarga de reconocer células que expresan al polipéptido aberrante. Es útil que el cDNA que codifica el TCR se clonado a partir de los linfocitos T activados y se transfiera a otros linfocitos T para su expresión.

55 In vivo, las células diana para los linfocitos T CD4⁺ conforme a una modalidad de la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células de estroma que rodean al tumor (células tumorales) (que a veces también expresan MHC de clase II).

Los TCR de los clones de los linfocitos T de la invención específicos de los péptidos de la invención son clonados. El uso de los TCR en los clones de los linfocitos T se determina usando (i) anticuerpos monoclonales específicos de región variable y (ii) RT PCR con cebadores específicos para las familias de genes Va y Vp. Se prepara una genoteca de ADNc a partir de ARNm poli-A extraído de los clones de linfocitos T. Se usan los cebadores específicos para la porción C-terminal de las cadenas a y P de TCR y para la porción N-terminal de los segmentos Va y P identificados. El ADNc completo para la cadena a y b de TCR se amplifica con una ADN-polimerasa de alta fidelidad y los productos amplificados son clonados a un vector de clonación adecuado. Los genes clonados de las cadenas a y P pueden ser unidos en un TCR de cadena única por medio del método descrito por Chung y col. (1994) «Proc. Natl. Acad. Sci.» EE. UU. 91, 12654-12658. En este constructo de cadena única, el segmento VaJ está seguido por el segmento V DJ, seguido a su vez por el segmento Cp, seguido a su vez por el segmento citoplasmático y la membrana de la cadena CD3. Este TCR de cadena única se inserta entonces en un vector de expresión retroviral (puede usarse un panel de vectores basado en su habilidad para infectar linfocitos T CD8⁺ humanos maduros y para mediar en la expresión génica: El sistema retroviral de vectores Kat es una de las posibilidades preferidas [véase Finer y col. (1994) «Blood» 83, 43]). Los retrovirus anfitróficos de alta valoración son usados para infectar linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ purificados, aislados de la sangre periférica de pacientes con tumor (siguiéndose el protocolo publicado por Roberts y col. (1994) en «Blood» 84, 2878-2889). Los anticuerpos Anti-CD3 son usados para desencadenar la proliferación de linfocitos T CD8⁺ purificados, lo que facilita la integración retroviral y expresión estable de TCR de cadena única. La eficacia de la transducción retroviral se determina por tinción de los linfocitos T CD8⁺ infectados con anticuerpos específicos del TCR de cadena única. El análisis in vitro de los linfocitos T CD8⁺ transducidos establece que muestran la misma toxicidad específica de tumor que con el clon de linfocitos T alo-restringido del que originalmente se clonaron las cadenas de TCR. Las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ transducidos con la especificidad esperada pueden ser usadas en la inmunoterapia adoptiva de los pacientes con tumores. Los pacientes pueden ser tratados con entre 10⁸ y 10¹¹ linfocitos T autólogos transducidos. De forma análoga a los CD8⁺, se pueden generar linfocitos T colaboradores CD4⁺ transducidos con constructos relacionados.

Otros sistemas adecuados para introducir genes en linfocitos T se describen en Moritz y col (1994), «Proc. Natl. Acad. Sci.» EE. UU., 91, 4318-4322. Eshhar y col. (1993) «Proc. Natl. Acad. Sci.» EE. UU. 90, 720-724 y Hwu y col. (1993) «J. Exp. Med.» 178, 361-366 también describen la transfección de linfocitos T. Por tanto, la invención describe un TCR que reconoce una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. El TCR se obtiene de los linfocitos T activados.

Al igual que el TCR, se describen en la invención moléculas funcionalmente equivalentes al TCR. Éstas incluyen cualquier molécula funcionalmente equivalente a un TCR, que puede realizar la misma función que el TCR. En particular, dichas moléculas incluyen TCR modificados genéticamente de cadena única y tres dominios, fabricadas por el método descrito por Chung y col. (1994) «Proc. Natl. Acad. Sci.» EE. UU. 91, 12654-12658, mencionado anteriormente. La invención también describe un polinucleótido que codifica el TCR o la molécula funcionalmente equivalente, y un vector de expresión que codifica el TCR o una molécula funcionalmente equivalente. Los vectores de expresión adecuados para la expresión del TCR incluyen los descritos más arriba en relación a la expresión de los péptidos de la invención.

Se prefiere, sin embargo, que los vectores de expresión sean capaces de expresar el TCR en linfocitos T después de la transfección.

Otro aspecto de la invención describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, método que comprende la administración al paciente de una cantidad efectiva de un péptido conforme a la invención, o una cantidad efectiva de un polinucleótido o un vector de expresión que codifica el mencionado péptido, o un número efectivo de linfocitos T como los que se definen más arriba, donde la cantidad del mencionado péptido o la cantidad del mencionado polinucleótido o vector de expresión o linfocitos T es efectiva para provocar una respuesta inmune de linfocitos anti-diana en el mencionado paciente. La célula diana es normalmente una célula de tumor o de cáncer, en particular células de tumores sólidos que expresan una molécula MHC de clase I en su superficie y presentan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la dada más arriba.

Otro aspecto más de la invención describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, método que comprende los siguientes pasos: (1) obtención de linfocitos T del paciente; (2) introducción de un polinucleótido en dichas células que codifican un TCR, o una molécula funcionalmente equivalente, como se define más arriba; y (3), la introducción en el paciente de las células producidas en el paso (2).

Otro aspecto más de la invención describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de manera aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se define más arriba, método que comprende los siguientes pasos: (1) la obtención de las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, del mencionado paciente; (2) el contacto de las mencionadas células presentadoras de antígeno con un péptido tal y como se define en los aspectos primero, segundo o tercero de la invención, o con un polinucleótido que codifica dicho péptido ex vivo; y (3) reintroducción en el paciente de dichas células presentadoras de antígenos así tratadas.

- Preferentemente, las células presentadoras de antígenos son células dendríticas. Las células dendríticas son células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetida con un péptido antigénico. El péptido antigénico puede ser cualquier péptido antigénico adecuado que desencadene una respuesta adecuada de los linfocitos T. La terapia de linfocitos T con células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetida con péptidos de un antígeno asociado a un tumor se describe en Murphy y col. (1996) «The Prostate» 29, 371-380 y en Tjua y col. (1997) «The Prostate» 32, 272-278.
- En otra modalidad, las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, son contactadas con un polinucleótido que codifica un péptido de la invención. El polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido adecuado y se prefiere que sea capaz de transducir la célula dendrítica resultante en la presentación de un péptido e inducción de inmunidad.
- Convenientemente, el polinucleótido puede estar comprendido en un polinucleótido viral o en un virus. Por ejemplo, se ha demostrado que las células dendríticas transducidas por adenovirus inducen inmunidad antitumoral específica de antígeno en relación con MUC1 (véase Gong y col. [1997] «Gene Ther. 4, 1023-1028). De forma similar, pueden usarse sistemas basados en adenovirus (véase, por ejemplo, Wan y col. [1997] «Hum. Gene Ther.» 8, 1355-1363); sistemas retrovirales (Specht y col. [1997] «J. Exp. Med.» 186, 1213-1221 y Szabolcs y col. [1997]); transferencia sanguínea mediada por partícula a células dendríticas (Tuting y col. [1997] «Eur. J. Immunol.» 27, 2702-2707) y ARN (Ashley y col. [1997] «J. Exp. Med.» 186, 1177-1182).
- Se apreciará que, con respecto a los métodos para matar células diana en un paciente, se prefiere especialmente que las células diana sean células cancerosas y, más aún, que sean células cancerosas renales o de colon.
- En una modalidad preferida, el haplotipo HLA del paciente se habrá determinado antes del tratamiento. El análisis del haplotipo HLA del paciente puede efectuarse mediante los métodos adecuados, conocidos por los expertos en la materia.
- La invención incluye en particular el uso de péptidos de la invención (o polinucleótidos que los codifiquen) para la vacunación activa in vivo; para la manipulación in vitro de células dendríticas autólogas seguida de la introducción de dichas células para activar repuestas de linfocitos T; para activar linfocitos T autólogos in vitro seguido de terapia adoptiva (es decir, los linfocitos T así manipulados son introducidos en el paciente); y para activar linfocitos T de donantes sanos (MHC apareado o desapareado) in vitro seguido por terapia adoptiva.
- En una modalidad preferida, las vacunas de la presente invención se administran a un huésped tanto solas como en combinación con otras terapias contra el cáncer para inhibir o suprimir la formación de tumores.
- La vacuna de péptidos puede administrarse sin adyuvante. La vacuna de péptidos también puede administrarse con un adyuvante como BCG o alum. Más arriba también se describen otros adyuvantes adecuados.
- Los péptidos conformes a la invención también pueden usarse como reactivos de diagnóstico. Utilizando los péptidos, se puede analizar si en una población de linfocitos T hay linfocitos T que estén dirigidos específicamente contra un péptido o inducidos por terapia. Además, el aumento de los linfocitos T precursores puede probarse con aquellos péptidos que muestran reactividad contra el péptido definido. Además, el péptido puede usarse como marcador, con el fin de controlar la progresión de la enfermedad tumoral que expresa el mencionado antígeno del que deriva el péptido.
- En la tabla 1 adjunta, se enumeran los péptidos identificados. Además, en la tabla se nombran las proteínas de las que deriva el péptido así como la posición respectiva del péptido en la proteína correspondiente. Además, se dan los números de registro respectivos vinculados al Genbank del *National Centre for Biotechnology Information* del *National Institute of Health* (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- En otra modalidad preferida, los péptidos son usados para la tinción de leucocitos, en particular de linfocitos T. Este uso es particularmente ventajoso si se prueba que en una población de CTL aparecen CTL específicos dirigidos contra un péptido. Además, el péptido puede usarse como marcador para determinar la evolución de una terapia contra una enfermedad o trastorno adenomatoso o canceroso.
- En otra modalidad preferida, los péptidos son usados para la producción de un anticuerpo. Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse de forma estándar con la inmunización de animales, por medio de la inyección del péptido y la subsiguiente purificación de la globulina inmune. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse siguiendo los protocolos estándar, como los descritos, por ejemplo, en «Methods Enzymol. (1986), 121, *Hybridoma technology and monoclonal antibodies*.
- La identificación de epítomos de linfocitos T colaboradores de TAA sigue siendo una tarea importante en la inmunoterapia contra los tumores. Hasta ahora, se han llevado a cabo distintas estrategias para la identificación de péptidos de clase I o II a partir de TAA, desde la incubación de APC con el antígeno de interés para que sea absorbido y procesado (P. Chaux, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon, y B. P. van der Bruggen; 1999. *Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes*. «J. Exp. Med.» 189:767-778) hasta diversas estrategias de transfección con proteínas de fusión (J. Dengjel, P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2004; *Identification of a naturally*

processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry; «Eur.J.Immunol.» 34: 3644-3651). Todos estos métodos llevan mucho tiempo y muchas veces no queda claro si los ligandos de HLA identificados son realmente presentados in vivo por tejido humano.

5 Los inventores identificaron un ligando unido a una secuencia central de MMP7. Los inventores descubrieron que esta proteína está sobreexpresada en los carcinomas de células renales. Además, se ha descrito como asociada a tumores (S. Miyamoto, K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, y A. Ochiai; 2004; *Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3*; «Cancer Res.» 64:665-671; Sumi, T., T. Nakatani, H. Yoshida, Y. Hyun, T. Yasui, Y. Matsumoto, E. Nakagawa, K. Sugimura, H. Kawashima y O. Ishiko. 2003. *Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma*. «Oncol. Rep». 10:567-570). Este péptido se unió indiscriminadamente a moléculas HLA de clase II y fue capaz de activar linfocitos T CD4⁺ de diferentes donantes sanos. Por lo tanto, el enfoque de los inventores ayudará en la identificación de nuevos péptidos candidatos de clase II de TAA para su uso en protocolos de vacunación clínica.

15 Ahora se describirá la invención en más detalle, haciéndose referencia a las siguientes figuras, al listado de secuencias y a los ejemplos. Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

Las secuencias SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 2 muestran secuencias de péptidos de epítomos de linfocitos T que contienen péptidos presentados por el MHC de clase I o II.

Las secuencias SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 11 muestran secuencias peptídicas de péptidos que son usados en la vacuna de la presente invención, a la que en adelante nos referiremos como «IMA».

20 La figura 1 muestra la presentación de el péptido derivado del protooncogén c-Met IMA-MET-001 en una muestra de tumor primario RCC013. La cromatografía líquida de alto rendimiento nanocapilar ESI MS se realizó en péptidos eluidos de RCC013. El cromatograma de masa para 1006,54 ±0,5 Da muestra un pico en el minuto 47,8 del tiempo de retención. El espectro de masas de la degradación inducida por colisión de m/z 1006,54 registrado en una segunda LC-MS en el tiempo de retención dado y dado en el recuadro, confirmó la presencia de IMA-MET-001 (Weinschenk 2002).

25 La figura 2 muestra la expresión de tejido del proto-oncogen c-Met (MET). La expresión se analizó con micromatrices de oligonucleótidos. Los números de copia se refieren al riñón, que está establecido en 1,0. «P» significa que el gen está presente; «A», que está ausente y «M», marginal, conforme a los algoritmos absolutos estadísticos. «I» significa que la expresión del gen está significativamente elevada; «D» representa expresión disminuida y «NC» significa que no hay modificación en la expresión. El valor de expresión con respecto al riñón se calcula a partir del ratio del registro de la señal y se muestra en la parte superior de las barras. La línea horizontal muestra la expresión más alta en tejidos normales (pulmón, en este caso).

La figura 3 muestra la destrucción de células diana cargadas de péptidos por CTL sensibilizados con IMA-MET-001.

La figura 4 muestra la destrucción de células malignas por CTL sensibilizados con IMA-MET-001.

La figura 5 muestra el análisis de inhibición de blancos fríos.

35 La figura 6 muestra el análisis tetramérico de expansiones por microesferas.

La figura 7 muestra la inmunogenicidad in vitro de IMA-MMP-001 – IFN-γ intracelular representativo contra coloraciones de CD4 de cuatro donantes sanos. Los donantes 1, 2 y 3 mostraron reactividad de linfocitos T CD4⁺ contra IMA-MMP-001 tras la tercera y la cuarta estimulaciones. El donante 4 resultó siempre negativo.

40 La figura 8 muestra una presentación de péptidos diferencial en tejido sano y de tumor – (A) El espectro de masas de dos especies de péptidos de m/z 739,96 y 741,95 derivadas de tejido de riñón normal y de carcinoma de células renales del paciente RCC100, respectivamente. El espectro de masas muestra una presentación cuadruplicada del péptido Adipofilina en el tejido del carcinoma de células renales, en comparación con el tejido normal autólogo correspondiente. (B) El análisis de la espectrometría de masas de la degradación inducida por colisión de 741,95 (tumor) reveló la secuencia de péptidos IMA-ADF-003, secuencia derivada de la Adipofilina.

45 La Figura 9 muestra inmunidad in vivo contra IMA-ADF-001 – La inmunidad del linfocitos T en dos pacientes con carcinoma de células renales contra varios péptidos no vacunados en pacientes vacunados con células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetida con dos péptidos asociados a tumor de MUC. Los linfocitos T específicos para IMA-ADF-001 («Adipofilina») no estaban presentes antes de la vacunación y se detectaron en el paciente n.º 3 (panel superior) tras 6 vacunaciones y en el paciente n.º 8 tras 8 vacunaciones.

50 La Figura 10 muestra ejemplos representativos de una respuesta de linfocitos T inducida por IMA identificada por el ensayo de ELISPOT apliado para el mismo paciente y el mismo antígeno. Las columnas superior e inferior representan al antígeno de control negativo HIV-001 y TUMAP IMA-CCN-001 únicas usadas para la lectura, respectivamente. La columna izquierda muestra el ELISPOT de muestras mezcladas tomadas antes de la vacunación el día 2 del cribado (S2) e inmediatamente antes de la primera inyección (V1). La columna derecha muestra ensayos ELISPOT de

muestras mezcladas tomadas durante el protocolo de vacunación el día 22 (V6) y el día 36 (V7). El número de células positivas se da para cada experimento.

5 La Figura 11 muestra ejemplos representativos de respuestas de linfocitos T inducidas por IMA identificadas por el ensayo de tinción del tetrámero amplificado. Los paneles superior y central son representaciones de puntos de dos dimensiones en linfocitos CD3+, los paneles inferiores, en linfocitos CD3+ y CD8+. Los pacientes, puntos temporales y tinciones se indican para cada columna. S1+V1: muestras tomadas antes de la vacunación; V4+V5: muestras tomadas los días 8 y 15; V6+V7: muestras tomadas los días 22 y 36; V8+FU: muestras tomadas el día 64 (última vacunación) y después de los días 85 a 92 (final del estudio).

10 A: datos para el paciente 03-004 que confirman la respuesta inmunológica a IMA-CCN-001 mostrada en la figura 10. Se puede identificar una población de células positiva para el tetrámero de IMA-CCN-001 y CD3+ tras la cuarta y la quinta inyección de IMA (V6+V7; panel central), responsables del 0,78% de los linfocitos (V6+V7; panel inferior). No se encontró ninguna población positiva para el tetrámero K67-001 (panel superior).

15 B: datos para el paciente 03-003 que no exhiben ninguna respuesta inmunológica contra el péptido IMA-RGS-001 (panel superior) pero que desarrollan una respuesta positiva al tetrámero IMA-CCN-001 durante el tiempo del protocolo de vacunación (panel intermedio, columnas 3 y 4), responsables del 0,8 % de los linfocitos (panel inferior; columna 3).

20 La Figura 13 muestra la cinética de las magnitudes de los linfocitos T observados en ensayos de tetrámeros amplificados en puntos de tiempo únicos. Los resultados se muestran para las lecturas de puntos únicos de tiempo para el paciente 05-001 para el que la respuesta de linfocitos T inducida por vacunas había sido detectada mediante el ensayo rutinario de tetrámero amplificado con muestras mezcladas. Se dan los resultados para todos los antígenos asociados a tumores presentes en IMA (mezcla TUMAP) y, en particular, para el péptido IMA-CCN-001. Adicionalmente, se muestran los controles HIV-001 e IMA-HBV-001 dentro del mismo ensayo del punto único del tiempo.

Ejemplos

Glosario

Término o abreviación	Descripción
AE	Acontecimiento adverso
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comité Americano de Unión sobre Cáncer)
BfArM	<i>Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte</i> (Instituto Estatal de Medicamentos y Productos Médicos)
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DC	Células dendríticas
GM-CSF	rhuGM-CSF (factor estimulante humano recombinante de colonias granulocito-macrófago)
rhuGM-CSF	
HBV	Virus de la hepatitis B
HLA	Antígeno de linfocito humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer)
IMP	Producto medicinal de investigación
INF	Interferón
MAA	Solicitud de autorización para la comercialización
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
RCC	Carcinoma de células renales
SAE	Acontecimiento adverso grave
SmPC	Resumen de las características del producto
TUMAP	Péptido asociado a tumor

I. Caracterización de los péptidos

Datos con respecto a la expresión de productos génicos de los que los péptidos IMA se derivan

Los péptidos que se identificaron a partir de tejido primario de RCC fueron seleccionados para su inclusión en la vacuna IMA (véase más abajo), conforme a un sistema de clasificación interna basado principalmente en el análisis de la expresión génica, bibliografía y búsqueda en bases de datos de propiedades conocidas de un antígeno del que se ha identificado un péptido derivado. Todos los péptidos presentados de forma natural se encuentran altamente sobreexpresados en el tejido del carcinoma de células renales, en comparación con tejido normal de riñón así como un intervalo de otros órganos vitales y tejidos. Dicha selección es necesaria (1) para seleccionar péptidos capaces de inducir linfocitos T de alta especificidad para el reconocimiento del tumor pero de ningún otro tejido, para minimizar el riesgo de autoinmunidad inducida por la vacunación de IMA; y (2), para asegurar que la mayoría de tumores de un grupo de pacientes es reconocido por el linfocito T inducido.

La prevalencia media de antígenos de los que los péptidos derivados están contenidos en IMA es del 68% (sobreexpresión en RCC contra tejidos y órganos vitales en muestras de RCC de n=24), con una oscilación del 54% al 96% para los antígenos aislados. Este porcentaje es significativamente superior que en antígenos de tumor estándar, como el Her-2/neu (prevalencia: 25-30%).

El perfil global de la expresión génica se efectuó utilizando un sistema de micromatrices de alta densidad disponible comercialmente (Affymetrix). El ARN se aisló de los tejidos, se procesó y se hibridó a micromatrices de oligonucleótidos de alta densidad. Tras la tinción y el lavado, se escanearon las matrices. La intensidad de fluorescencia de cada punto de la matriz representaba el tipo de nivel de expresión del gen emparejado a la secuencia de ADN del oligonucleótido. Varios oligonucleótidos de las matrices cubren la secuencia de cada gen. Tras un análisis estadístico un software, se pueden obtener para cada gen los valores de expresión entre dos muestras con respecto a los pares. La normalización de todos los datos de las distintas muestras utilizando una muestra constante como línea de base permite una relativa cuantificación de los niveles de expresión entre todas las muestras.

Fuentes de ARN – El ARN total de tejidos humanos se obtuvo de forma comercial (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Amsterdam, Holanda; BioChain, Heidelberg, Alemania). El ARN total de varios individuos se mezcló de forma que el ARN de cada individuo pesaba lo mismo. La calidad y la cantidad se confirmaron en Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania), utilizando el kit de ARN 6000 Nano LabChip (Agilent).

Análisis en micromatrices de oligonucleótidos de alta densidad – Se sintetizó ADN bicatenario a partir de 5-8 µg del ARN total usando SuperScript RTII (Life Technologies, Inc, Karlsruhe, Alemania) y el cebador (Eurogentec, Seraing, Bélgica) indicado en el manual de Affymetrix. La transcripción in vitro con el kit de marcado del transcrito de ARN BioArray™ High Yield™ (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY), la fragmentación, la hibridación en Affymetrix U133A o U133 Plus 2.0 GeneChips (Affymetrix, Santa Clara, CA) y la tinción con anticuerpo biotinilado anti-estreptavidina y estreptavidina-ficoeritrina (Molecular Probes, Leiden, Holanda) se llevaron a cabo siguiendo los protocolos del fabricante (Affymetrix). Se utilizó Affymetrix GeneArray Scanner y los datos se analizaron con el software Microarray Analysis Suite 5.0 o el software GeneChip® Operating (GCOS). Para la normalización, se utilizaron 100 genes de mantenimiento proporcionados por Affymetrix. Las comparaciones de los pares se calcularon usando los valores de expresión del riñón como línea base. Consecuentemente, todos los valores de expresión calculados de ratios de registros de señales se refieren al riñón, que se estableció en 1. La importancia de la expresión diferencial se juzgó por los valores «change» dados por los algoritmos estadísticos implementados en el software. Para la detección absoluta de la expresión, los datos se volvieron a analizar usando los algoritmos estadísticos. La presencia o ausencia de expresión génica se determinó por los algoritmos absolutos Call.

En la figura 2 se muestra un ejemplo de expresión de tejido para la expresión génica del proto-oncogen c-Met (MET). MET estaba sobreexpresado en el 96% de los carcinomas de células renales analizados (n=24, lado derecho), pero no lo estaba, o lo estaba en mucha menor medida, en varios tejidos y órganos vitales sanos seleccionados, así como en tejidos y células de importancia inmunológica (lado izquierdo de la figura 2).

La tabla 1 resume los péptidos contenidos en la vacuna de la invención IMA, y comprende también los péptidos conformes a la invención.

Tabla 1: Péptidos contenidos en la vacuna de la invención.

ID de secuencia interna	Antígeno	Secuencia	ID SEQ n.º
IMA-MMP-001	Metaloproteinasa 7 de la matriz	SQDDIKGIQKLYGKRS	1
IMA-ADF-002	Adipofilina	VMAGDIYSV	2
IMA-ADF-001	Adipofilina	SVASTITGV	3

IMA-APO-001	Apolipoproteína L1	ALADGVQKV	4
IMA-CCN-001	Ciclina D1	LLGATCMFV	5
IMA-GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVG	6
IMA-K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL	7
IMA-MET-001	Proto-oncogen c-Met	YVDPVITSI	8
IMA-MUC-001	MUC1	STAPPVHNV	9
IMA-RGS-001	RGS-5	LAALPHSCL	10
IMA-HBV-001	HBV	FLPSDFFPV	11

La tabla 2 resume los resultados de expresión para todos los antígenos que codifican péptidos contenidos en la vacuna de la invención IMA, así como para los péptidos conformes a la invención.

Tabla 2: Frecuencia de sobreexpresión de antígenos en el carcinoma de células renales (n=24)

ID de secuencia interna	Antígeno	Sobreexpresión significativa de RCC en comparación con el riñón ¹	Sobre expresión de RCC en comparación con todos los tejidos normales ²
IMA-ADF-001 & 002	Adipofilina	83%	75%
IMA-APO-001	Apolipoproteína L1	67%	58%
IMA-CCN-001	Ciclina D1	58%	63%
IMA-GUC-001	GUCY1A3	88%	71%
IMA-K67-001	KIAA0367	54%	54% ³
IMA-MET-001	Proto-oncogen c-Met	96%	96%
IMA-MUC-001	MUC1	Sin sobreexpresión a nivel de ARNm	Sin sobreexpresión a nivel de ARNm
IMA-RGS-001	RGS-5	96%	58%
IMA-MMP-001	Metaloproteinasas 7 de la matriz	58%	67%

5 ¹ Conforme a los valores «change» proporcionados por los algoritmos estadísticos implementados en el software (numero de «I»).

² Número de RCC con expresión alta en comparación con el tejido normal con la expresión más alta de todos los tejidos normales.

³ El cerebro es inmunoprivilegiado, por lo que no se tuvo en consideración.

10 La sobreexpresión mínima en RCC contra el resto de tejidos normales es del 54%; la máxima es del 96%. Este porcentaje es significativamente superior que en antígenos de tumor estándar, como el Her-2/neu (prevalencia: 25-30%).

MUC constituye una excepción, ya que no se puede detectar sobreexpresión para el ARNm de MUC. Sin embargo, de acuerdo a informes publicados, lo siguiente ha de tenerse en consideración:

15 1. La deglicosilación aberrante en malignidades es común y desenmascara epítomos en células tumorales que podrían no presentarse en células normales. Es altamente probable que un mecanismo así también ocurra en RCC. Esto explicaría la destrucción específica de líneas celulares de tumor que expresan MUC (Brossart 1999). Véase también el capítulo 4.1.5 sobre las propiedades de MUC.

2. IMA-MUC-001 se ha administrado junto con células dendríticas autólogas en un ensayo de la Universidad de Tubinga. En este ensayo, presentado en ASCO 2003 (Mueller 2003) tratado también en ASCO 2005 (Wierecky 2005), no se registraron efectos autoinmunes.

3. Otros informes de estudios clínicos demuestran que los linfocitos T citotóxicos específicos para IMA-MUC-001 ocurren de forma natural (sin inmunización) en pacientes con carcinoma de mama (Rentzsch 2003) y carcinoma colorectal (Dittmann 2004). En estos pacientes, no se registraron efectos autoinmunes. Esto enfatiza el papel natural de los linfocitos T específicos de IMA-MUC-001.

- 5 En base a estos datos, la administración de IMA-MUC-001 se puede considerar segura, aunque sólo en el nivel de ARNm no se puede detectar sobreexpresión para el antígeno MUC.

Unión promiscua de IMA-MMP-001 a varios alelos de HLA-DR

10 IMA-MMP-001 es un péptido unido a HLA-DR, una molécula HLA de clase II. Los TUMAP de clase II activan a los linfocitos T colaboradores, que desempeñan una función crucial apoyando la función de linfocitos T citotóxicos activados por TUMAP de clase II. La unión promiscua de un péptido HLA-DR es importante para garantizar que la mayoría (> 50%) de los pacientes de HLA-A*02⁺ tratados con IMA también pueden provocar una respuesta de linfocitos T ante IMA-MMP-001. El análisis in silicio de la unión de IMA-MMP-001 indica que IMA-MMP-001 se une de forma promiscua a varios alelos HLA-DR (DRB1*0101, *0301, *0401, *1101 y *1501), cubriendo un total de, al menos, 69,6% de la población caucásica HLA-A2 positiva. La unión promiscua de IMA-MMP-001 se confirma de forma experimental por
15 medio de datos de inmunogenicidad in vitro.

Principio del test

Usando el algoritmo SYFPEITHI desarrollado en la Universidad de Tubinga (Rammensee 1997; Rammensee 1999), se clasificó la unión de IMA-MMP-001 a varios alelos comunes de HLA-DR (véase tabla más abajo). El algoritmo se ha
20 podido utilizar para identificar epítomos de clase I y II a partir de un amplio rango de antígenos como, por ejemplo, de TAA TRP2 humano (clase I) (Sun 2000) y SSX2 (clase II) (Neumann 2004). Los alelos HLA-DR analizados cubren, al menos, un 69,6% de la población caucásica de HLA-A2 positivo (Mori 1997). El umbral para la unión se definió en una puntuación de 18 en base al análisis de puntuaciones de ligandos HLA-DR promiscuos conocidos. La unión promiscua se define como la unión de un péptido HLA-DR a varios alelos HLA-DR expresados en, al menos, el 50% de la población caucásica.

- 25 Los locus de HLA-A y HLA-DR se encuentran en combinaciones de desequilibrio de ligamiento de HLA-A2 y HLA-DR específicos, que se prefieren a otros (tabla 3).

Haplotipo		Frecuencia
HLA-A	HLA-DR	[%]
2	1	8.8
2	2	14.9
2	3	6.1
2	4	21.3
2	5	1.2
2	6	15.2
2	7	13.0
2	8	4.2
2	9	1.2
2	10	1.4
2	11	8.7
2	12	2.6
2	n.a.	1.4

Tabla 3: Frecuencias del haplotipo de población caucásica norteamericana – Se muestran los haplotipos serológicos. «N.a.» significa «no asignado» (Mori 1997).

- 30 Los ligandos de determinadas moléculas MHC portan aminoácidos relacionados químicamente en determinadas posiciones de su secuencia primaria, lo que permite la definición de un motivo peptídico para cada alelo MHC (Falk

1991). SYFPEITHI matrices de motivos deducidas de motivos refinados basados exclusivamente en el análisis de ligandos naturales por degradación Edman y espectrometría de masas en tándem (Schirle 2001). Estas matrices permiten la predicción exacta de péptidos a partir de una secuencia de proteínas dada presentada en moléculas MHC de clase I o II (Rotzschke 1991).

5

Antígeno	Alelo DRB1*					
	0101	0301	0401	0701	1101	1501
	(8.8%)	(6.1%)	(21.3%)	(13.0%)	(8.7%)	(n.a.%)
IMA-MMP-001	35	18	20	14	26	20

Tabla 4: Puntuaciones de unión de IMA-MMP-001 a alelos HLA-DR comunes

Se muestran las puntuaciones de unión SYFPEITHI IMA-MMP-001 para los alelos HLA-DRB1 más comunes en la población caucásica. Las frecuencias de los correspondientes haplotipos serológicos de caucásicos HLA-A2⁺ se dan entre paréntesis. El péptido se consideró unido a la molécula HLA cuando la puntuación era igual o superior a 18.

En base a la predicción mediante el algoritmo SYFPEITHI, IMA-MMP-001 tiene probabilidad de unirse a varios alelos HLA-DR (DRB1*0101, *0301, *0401, *1101 and *1501), que cubren, al menos, un 69,6% de la población caucásica HLA-A2 positiva. Debido a que no hay datos de frecuencia del HLA-DR15 disponibles, este alelo se omitió en el cálculo. Así, es muy probable que se cubra un porcentaje aún mayor del 69,9. La confirmación experimental de la unión promiscua de IMA-MMP-001 se obtiene mediante datos de inmunogenicidad in vitro (véase más abajo).

15

Comparación de la expresión del antígeno y la presentación del péptido derivado en tejido tumoral y normal autólogo.

Se espera que los antígenos sobreexpresados estén sobrerepresentados en moléculas HLA en la superficie celular. Como ejemplo, el péptido HLA-A*03 derivado de la adipofilina, un antígeno sobreexpresado del que los péptidos HLA-A*02 IMA-ADF-001 y IMA-ADF-002, ambos contenidos en IMA, derivan, se mostró altamente sobrerepresentado en tejido de carcinoma de células renales, en comparación con el tejido normal autólogo del paciente RCC100, aplicando la estrategia QUALITEA. Este caso demuestra que la sobreexpresión de un antígeno (en este caso, la adipofilina) está correlacionada con la sobrerepresentación de péptidos derivados del mismo antígeno.

20

El método es descrito en detalle por (Lemmel 2004). QUALITEA representa una estrategia para la cuantificación diferencial de péptidos eluidos por HLA a partir de tejido normal y de tumor. Los ligandos HLA derivados de las dos fuentes son N-terminal por ¹H_x o ²D_x – reagente y combinado. Siguiendo la reducción de la complejidad del péptido por cromatografía líquida de alto rendimiento, los péptidos son cuantificados por análisis de espectrometría de masas ESI conforme a sus zonas de pico. Un par de péptidos derivatizados (derivatización ¹H_x y derivatización ²D_x) es físicamente idéntico y fácilmente detectable porque, esencialmente, coeluye en sistemas cromatográficos. Además, se detecta una diferencia constante de masa en los escáneres de espectrometría de masas. Esta diferencia depende del número de isótopos estables en el derivado. La identificación de secuencias de un ligando es revelado por el análisis de espectrometría de masas ESI y la búsqueda asistida por ordenador en bases de datos del espectro registrado. Así, este análisis proporciona información sobre los aspectos cualitativos y cuantitativos de la presentación del péptido en tejido normal y tumoral.

25

30

En la figura 8 se muestra un ejemplo de presentación diferencial de péptido HLA en tejido normal y tumoral de un antígeno sobreexpresado. El péptido IMA-ADF-003 -que se encontraba sobrerepresentado cuatro veces más en el tejido tumoral del riñón, en comparación con tejido sano, en el paciente RCC100- fue identificado por análisis de espectrometría de masas de degradación inducida por colisión, entre muchos otros péptidos presentados igualmente. Este péptido sobrerepresentado en tejido tumoral derivaba de la Adipofilina. El análisis de la expresión génica del mismo paciente RCC100 también reveló una sobreexpresión 2,64 veces mayor de Adipofilina en este tejido tumoral, en comparación con un riñón sano (no se muestran datos). Estos datos confirman, en este caso particular, que la sobreexpresión en tejido tumoral a nivel génico lleva a la sobrerepresentación del péptido en la superficie de la célula tumoral.

35

40

45 Inmunogenicidad in vivo en comparación con IMA-ADF-001

Las células dendríticas (DC) autólogas generadas de pacientes con RCC fueron sensibilizadas de manera repetida con dos TUMAP derivados de MUC, entre ellos, de IMA-MUC-001. IMA-ADF-001 no fue vacunado. Las vacunaciones se realizaron cuatro veces cada dos semanas y se repitieron mensualmente hasta la evolución del tumor. Tras la quinta

inyección de DC, se administró a los pacientes, adicionalmente, tres inyecciones por semana de IL-2 en dosis baja (1 Mio IE/m²). La activación del precursor de linfocitos T fue controlada usando ELISPOT del IFN-gamma. Además de la inducción de linfocitos T contra los dos péptidos vacunados, también se probó la actividad de los linfocitos T contra otros TUMAP conocidos, entre ellos el IMA-ADF-001.

5 Los resultados fueron mostrados en una presentación del Dr. Peter Brossart (Universidad de Tubinga) en el encuentro anual de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) en 2005. La presentación completa está publicada en la página web de ASCO. En dos pacientes (n.º 8 y n.º 13) vacunados con dos péptidos MUC sensibilizados de manera repetida con células dendríticas autólogas, la inmunidad de los linfocitos T a otros péptidos aparte de los vacunados se detectó tras la vacunación (figura 9). Debido a que la inmunidad no tenía lugar antes de la vacunación, es altamente probable que dichos linfocitos T estuvieran inducidos por expansión de los epítomos. La expansión de epítomos puede ocurrir cuando las células tumorales son perturbadas (por ejemplo, por necrosis, lisis por linfocitos T inducidos por vacuna, etc.) y liberan antígenos que entonces son absorbidos por células presentadoras de antígenos (APC, por ejemplo, DC). Estas APC pueden procesar entonces el antígeno de forma intracelular y presentar un epítomo de linfocitos T (es decir, TUMAP) para sensibilizar las respuestas de los linfocitos T. Este datos enfatiza el gran papel potencial de IMA-ADF-001 como antígeno de linfocitos T natural.

II. Producción y uso de la vacuna «IMA» conforme a la invención

IMA es una vacuna que contiene un grupo de péptidos asociados a tumor que se encuentran y han sido identificados en células primarias de cáncer renal. Este grupo incluye péptidos HLA de clase I y II. El grupo de péptidos también contiene un péptido del antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B, utilizado como control positivo que actúa como marcador inmunitario para probar la eficiencia de la administración intradérmica. La vacunación con péptidos en general requiere adyuvantes y, por eso, en este programa de vacunación se utilizará GM-CSF como adyuvante (el GM-CSF humano está disponible comercialmente como Sargramostim, Leukine®, Berlex).

Ocho de los diez péptidos asociados a tumor contenidos en IMA se identificaron con la tecnología XPRESIDENT descrita más abajo. Para estos péptidos, la presentación natural en el contexto de las moléculas HLA expresadas por el tumor se demuestra, por tanto, por evidencia directa. Los péptidos IMA-MUC-001 y IMA-CCN-001 se identificaron utilizando otras tecnologías. Para ambos péptidos, su presentación natural por líneas celulares tumorales se demuestra en base a evidencia indirecta en el ensayo de inmunogenicidad in vitro (véase más abajo).

Principio del test

Las moléculas HLA de tejido de carcinoma de células renales primario procesado por choque térmico son purificadas y los péptidos asociados al HLA son aislados. Estos péptidos son separados de la línea por HPLC y las fracciones son analizadas o se realiza un análisis de secuencias por espectrometría de masas mediante experimentos en la línea de HPLC-MSMS. Las secuencias resultantes son verificadas por síntesis de los péptidos identificados y comparación de los espectros de los fragmentos de péptidos identificados y sintetizados. Como los péptidos identificados derivan directamente de moléculas HLA de los tumores primarios, estos resultados son prueba directa del procesamiento y presentación natural de los péptidos identificados en tejido de carcinoma de células renales primario.

Método

El método es descrito en detalle por (Weinschenk 2002) . Brevemente explicado, las muestras de los pacientes congeladas por choque, obtenidas del departamento de urología de la Universidad de Tubinga (autorizadas por el comité local de ética), fueron lisadas; las moléculas HLA fueron purificadas por cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo W6/32 específico de HLA de clase I o el anticuerpo BB7.2 específico de HLA-A*02 o, en el caso de IMA-MMP-001, el anticuerpo L243 específico de HLA-DR. Los péptidos asociados a HLA fueron eluidos por tratamiento ácido y aislados de la cadena proteica alfa MHC por ultrafiltración. Los péptidos aislados fueron separados de la línea por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida y las fracciones fueron analizadas por nano-ESI-MS en un espectrómetro de masas en tándem de tiempo de vuelo de aceleración ortogonal cuadrupolar híbrido (Q-TOF I o Q-TOF Ultima, Waters) o por análisis LC-MSMS en la línea utilizando los mismos instrumentos. Se efectuó siempre un análisis en blanco para asegurar que el sistema quedaba libre de péptidos. Los calibrados se efectuaban al menos una vez al día y los análisis de componentes estándar se realizaban en los intervalos adecuados, para garantizar un rendimiento óptimo de los sistemas. La interpretación de los espectros de los fragmentos se realizó manualmente. La verificación del análisis se obtuvo por búsquedas en bases de datos y síntesis de fase sólida de la supuesta secuencia peptídica y comparación de los espectros de fragmentos de los péptidos identificados y sintetizados. Todos los péptidos contenidos en IMA (no se muestran datos), excepto IMA-MUC-001 y IMA-CCN-001, fueron identificados de forma idéntica, confirmándose así la presentación natural de estos péptidos en tejido de carcinoma de células renales primario.

Ingredientes de IMA

Los péptidos para este desarrollo clínico son sintetizados mediante química Fmoc estándar. La purificación se efectúa con HPLC de preparación e intercambio de iones. Es importante destacar que la identidad y pureza de los péptidos puede determinarse fácilmente y con exactitud utilizando espectrometría de masas y HPLC. La formulación de IMA está compuesta por 11 sustancias medicamentosas individuales que se describen en detalle más abajo.

Tabla 5: Antígenos en IMA

	ID del péptido	Tipo	Antígeno	Acronimos y sinónimos habituales
1	IMA-ADF-001	TUMAP de clase I	Adipofilina	Proteína relacionada con la diferenciación adiposa, ADRP
2	IMA-ADF-002	TUMAP de clase I	Adipofilina	Véase más arriba
3	IMA-APO-001	TUMAP de clase I	Apolipoproteína L1	APOL1
4	IMA-CCN-001	TUMAP de clase I	Ciclina D1	CCND1, PRAD1, adenomatosis paratiroidea 1, BCL-1
5	IMA-GUC-001	TUMAP de clase I	GUCY1A3	Guanilato ciclasa 1-soluble-alfa 3
6	IMA-K67-001	TUMAP de clase I	KIAA0367	--
7	IMA-MET-001	TUMAP de clase I	Proto-oncogen c-Met	MET, HGF (factor de crecimiento del hepatocito) receptor, HGFR
8	IMA-MUC-001	TUMAP de clase I	MUC1	Mucina, CD227, episialina, antígeno de la membrana epitelial
9	IMA-RGS-001	TUMAP de clase I	RGS-5	Regulador de proteína G señalizadora 5
10	IMA-MMP-001	TUMAP de clase II	Metaloproteinasa 7 de la matriz	MMP7, matrilisina, uterina
11	IMA-HBV-001	Péptido de control viral	Antígeno central del virus de la hepatitis B	HBc, HBcAg, cAg

5 Todos los péptidos son sintetizados por química de fase sólida Fmoc y purificados por HPLC y cromatografía de intercambio de iones hasta una pureza > 95%. La estructura correcta es determinada por análisis de los aminoácidos y espectrometría de masas.

Tabla 6: Características físico-químicas de los péptidos en IMA

	ID del péptido	Longitud del péptido (n.º de aminoácidos)	Masa molecular (g/mol neto)	Forma salina	Forma física	Solubilidad (solución clara y sin color mg/ml) ¹	Higroscopicidad
1	IMA-ADF-001	9	833.9	Sal de acetato	Polvo blanco o blanco hueso	Ácido acético al 10%	Almacenado como polvo seco congelado. Los péptidos liofilizados suelen tener propiedades higroscópicas
2	IMA-ADF-002	9	954.1			Ácido acético al 10%	
3	IMA-APO-001	9	900.0			Agua	
4	IMA-CCN-001	9	954.2			Ácido acético al 50%	
5	IMA-GUC-001	9	834.0			Ácido acético al 90%	

6	IMA-K67-001	9	984.1			Ácido acético al 20%	
7	IMA-MET-001	9	1006.2			Ácido acético al 10%	
8	IMA-MUC-001	9	921.0			Ácido acético al 10%	
9	IMA-RGS-001	9	924.1			Agua	
10	IMA-MMP-001	16	1836.1			Agua	
11	IMA-HBV-001	10	1155.3			Ácido acético al 10%	

5 El producto medicamentoso IMA se presenta como un liofilizado para su aplicación intradérmica y contiene 11 péptidos - 578 µg de cada péptido- en su forma salina (acetatos). Para la aplicación de la fórmula del ensayo clínico a los pacientes, el polvo de la inyección que contiene 578 µg de cada péptido es disuelto en 700 µl de hidrogenocarbonato de sodio (4,2%). Tras la reconstitución de la solución, se inyectarán intradérmicamente 500 µl (igual a una dosis única de 413 µg de cada péptido por inyección y una dosis única total de 4,5 mg de IMA por inyección).

Tabla 7: Otros ingredientes de IMA

Agua para la inyección	Solvente	Conforme a Ph. Eur.
Ácido acético*	Solvente	Conforme a Ph. Eur.
Nitrógeno*	Gas inerte	Conforme a Ph. Eur.

*Eliminado durante el proceso de manufactura

10 La calidad de IMA está garantizada por el uso de excipientes y sustancias activas que cumplen los requisitos de Ph. Eur.

Inmunogenicidad in vitro de los péptidos contenidos en IMA

IMA contiene nueve péptidos HLA de clase I asociados a tumores, un péptido HLA de clase II asociado a tumores y un péptido HLA de clase I de control viral. La inmunogenicidad in vitro podría demostrarse para la inmensa mayoría de los péptidos contenidos en IMA.

15 La inmunogenicidad in vitro fue demostrada para ocho de las diez secuencias HLA de clase I contenidas en IMA, utilizando, principalmente, dos ensayos de linfocitos T: A) destrucción citotóxica de células diana en ensayos de liberación de cromo y/o B) detección de linfocitos T por tetrameros de HLA. Estos ensayos demuestran la presencia de células precursoras específicas en la sangre de los donantes HLA-A*02 positivos, así como la habilidad de dichos linfocitos T específicos de destruir células diana. Como en el último caso, también son reconocidas varias líneas celulares tumorales que expresan el antígeno endógenamente. Esto proporciona indicaciones adicionales (indirectas) de la presentación natural de los péptidos usados en células tumorales y muestra que los linfocitos T citotóxicos generados usando estos péptidos tienen gran habilidad para el reconocimiento de células tumorales. La inmunogenicidad in vitro fue demostrada para el péptido HLA de clase II IMA-MMP-001 contenido en IMA usando tinción de citocina intracelular en citometría de flujo (véase más abajo).

Tabla 8: Resumen de los datos de inmunogenicidad in vitro para los péptidos contenidos en IMA

#	ID del péptido	Inmunogenicidad in vitro	Referencias
1	IMA-ADF-001	Ensayo de destrucción	Schmidt et al., 2004
2	IMA-ADF-002	Detección de tetrámeros	no publicado
3	IMA-APO-001	n/a	no publicado
4	IMA-CCN-001	Ensayo de destrucción (linfocitos T alogénicos)	Sadovnikova et al., 1998
5	IMA-GUC-001	n/a	no publicado
6	IMA-K67-001	Detección de tetrámeros	no publicado
7	IMA-MET-001	Ensayo de destrucción, tinción de citocinas, detección de tetrámeros	Schag et al., 2004
8	IMA-MUC-001	Ensayo de destrucción, liberación de citocinas	Brossart et al., 1999
9	IMA-RGS-001	Detección de tetrámeros	no publicado
10	IMA-MMP-001	Tinción de citocinas	no publicado
11	IMA-HBV-001	Ensayo de destrucción	Wentworth et al., 1995

5 Ensayo de destrucción: destrucción citotóxica del blanco medida por ensayo de liberación de cromo; liberación de citocinas: liberación de citocinas por linfocitos T medida por ELISA; tinción de citocinas: síntesis de citocinas por linfocitos T medida por citometría de flujo intracelular; detección de tetrámeros: detección de linfocitos T específicos de péptidos por tetrámeros de HLA.

Inmunogenicidad in vitro de péptidos HLA de clase I contenidos en IMA

10 IMA contiene 10 péptidos de unión a HLA de clase I. Para probar la inmunogenicidad in vitro de los péptidos, se generaron linfocitos T citotóxicos CD8⁺ a partir de células mononucleares de sangre periférica autólogas (PBMC) de donantes sanos, utilizando péptidos aislados contenidos en IMA. La actividad de estos linfocitos T citotóxicos se probó con ensayos de liberación de cromo y detección de linfocitos T con tetrámeros de HLA en citometría de flujo. Se muestran datos detallados de un péptido de ejemplo (IMA-MET-001) para ambos métodos. Los datos de los otros péptidos se resumen en la tabla 8 más arriba.

15 En la primera etapa, los linfocitos T citotóxicos son generados (sensibilizados) in vitro por estimulación repetida de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos HLA-A*02⁺ con el péptido específico que se desea probar. La sensibilización puede realizarse tanto con células dendríticas autólogas generadas a partir de monocitos de la sangre del donante como con cuentas cargadas con tetrámero de HLA.

20 A. Destrucción citotóxica del blanco: En la segunda etapa, la citotoxicidad de dichos linfocitos T citotóxicos sensibilizados (CTL) es probada marcando las células diana con cromo radioactivo e incubándolas con los CTL generados. Puede establecerse una correlación directa entre la cantidad de cromo liberado al sobrenadante y la proporción de células diana destruidas.

25 B. Detección de linfocitos T con tetrámeros de HLA: En la segunda etapa, de forma alternativa, los CTL sensibilizados para un péptido dado son detectados usando tetrámeros de HLA. Los tetrámeros están compuestos por cuatro moléculas HLA-A*02 cargadas con péptidos acopladas entre ellas. Estos constructos permiten una marcación específica del receptor de linfocitos T cognado que reconoce el complejo HLA-péptido en el tetrámero y por marcación del tetrámero con un fluorocromo seguido de un análisis en citometría de flujo (FACS).

Sensibilización de linfocitos T citotóxicos con células dendríticas

30 Para la inducción de CTL, se sensibilizaron de manera repetida 5×10^5 DC con 50 µg/ml del péptido sintético IMA-MET-001 durante dos horas, se lavaron y se incubaron con $2,5 \times 10^6$ PBMNC autólogas en medio RP10. Tras siete días de cultivo, las células se volvieron a estimular con PBMNC sensibilizadas de manera repetida con péptidos autólogos y los días 1, 3 y 5 se añadió 1 ng/ml de IL-2 recombinante humano (R&D Systems). La actividad citolítica de los CTL fue analizada el quinto día después de la última re-estimulación en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Brossart 1999). (Véase más abajo)

35 Sensibilización in vitro de linfocitos T citotóxicos con cuentas cargadas con tetrámeros.

40 La sensibilización in vitro fue efectuada como se indicó anteriormente (Walter 2003) o con modificaciones sin importancia. Brevemente explicado, se generaron, como se describió anteriormente, moléculas HLA-A*0201 recombinantes biotiniladas sin dominio transmembranoso y biotiniladas en el terminal carboxi de la cadena pesada (Altman 1996). El Ac 9,3 del CD28 anti-humano de IgG2a de ratón purificado y de estimulación conjunta (Jung 1987) fue biotinilado químicamente usando sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina en las condiciones recomendadas por el fabricante (Perbio Science, Bonn, Alemania). Las microesferas utilizadas fueron partículas de poliestireno recubiertas de estreptavidina de 5,60 µm de diámetro, con una capacidad de unión de microesferas de, aproximadamente, 0,06 µg de

biotina-FITC/mg. Para el tratamiento de microesferas se utilizó un tampón estéril PBS/BSA/EDTA. Para su unión con moléculas biotiniladas, las microesferas se lavaron y se volvieron a suspender a 2×10^6 partículas/ml en un tampón con MHC biotinilado y/o anticuerpos en diversas concentraciones. La unión se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos y mientras se agitaba. Las cuentas recubiertas se lavaron tres veces, se volvieron a suspender en el tampón descrito anteriormente y se almacenaron hasta cuatro semanas a 4 °C antes de su utilización.

Las PBMC se aislaron de las capas de leucocitos frescas usando medio de separación de gradiente estándar (Linaris, Wertheim-Bettingen, Alemania o PAA Laboratories, Linz, Austria). Cuando se indicaba, los linfocitos T CD8 intactos se enriquecían magnéticamente por agotamiento negativo usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), conforme a las condiciones del fabricante, lo que resultó en una pureza de las células TCR positivas y CD8 positivas de más del 80%. Las estimulaciones in vitro se iniciaron en placas de 24 pocillos con 5×10^6 células responsivas más 1×10^6 APC o microesferas por pocillo en 1,5 ml de medio de linfocitos T. Si no se especifica de otra forma, se añadieron 5 ng/ml de IL-12 p70 humano (R&D) con APC o microesferas. Después de tres o cuatro días de incubación conjunta a 37 °C, se añadió medio fresco y 20 U/ml de IL-2 humano (R&D) y las células se siguieron incubando a 37 °C durante tres o cuatro días. Este ciclo de estimulación se repitió dos veces.

15 Destrucción de células diana por CTL mediante el ensayo de liberación de cromo

El ensayo de liberación de ^{51}Cr se llevó a cabo como se describe (Brossart 2001). Las células diana se sensibilizaron de manera repetida con 50 µg/ml de péptidos durante dos horas y marcadas con cromato sódico ^{51}Cr en RP10 durante una hora a 37 °C. 10^4 células fueron transferidas a un pocillo de una placa de 96 pocillos de base circular. Se añadieron diversos números de CTL para dar un volumen final de 200 µl y se incubó durante 4 horas a 37 °C. Al final del ensayo, los sobrenadantes (50 µl/pocillo) fueron cultivados y contados en un contador de placas beta. El porcentaje de lisis específica se calculó como: 100 veces (liberación experimental - liberación espontánea / liberación máxima - liberación espontánea) Las liberaciones espontánea y máxima se determinaron en presencia o bien de medio o bien de Triton X-100 al 2%, respectivamente. La especificidad del antígeno de lisis de células tumorales se determinó en un análisis de inhibición de blancos fríos por medio del análisis de la capacidad de células T2 no marcadas y sensibilizadas de forma repetida con el péptido para bloquear la lisis de las células tumorales en una proporción de 20:1 (proporción de inhibidor y blanco).

Detección de linfocitos T citotóxicos con tetrámeros de HLA

La tinción de los tetrámeros fue efectuada como se indicó anteriormente (Walter 2003) o con modificaciones sin importancia. Brevemente explicado, se generaron, como se describió anteriormente, moléculas HLA-A*0201 recombinantes biotiniladas sin dominio transmembranoso y biotiniladas en el terminal carboxi de la cadena pesada (Altman 1996). Los tetrámeros fluorescentes fueron generados mediante la incubación conjunta de HLA-A*0201 biotinilado con estreptavidina-PE o estreptavidina-APC (Molecular Probes, Leiden, Holanda) en una proporción molar de 4:1. Para los análisis tetraméricos, las células se lavaron en PBS/BSA/EDTA con 10 mg/ml de ácido sódico (Merck, Darmstadt, Alemania) y sometidos a tinción a 4 °C durante 20 minutos en el mismo tampón con Ac CD4-FITC y CD8-PerCP clon SK1 (ambos de Becton Dickinson). Tras los experimentos de estimulación de microesferas, se incluyeron 100 µg/ml de estreptavidina no marcada (Sigma). Las células se lavaron en PBS con FCS al 2% inactivado por calor (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania), 2 mM de EDTA sódico y 10 mg/ml de ácido sódico y tetrámero sometido a coloración a 4 °C durante 30 minutos en PBS/FCS/EDTA/Ácido pero incluyendo FCS al 50%. Los reactivos de tetrámero se usaron siempre en concentraciones de MHC de 5 µg/ml. Las células teñidas se lavaron en profundidad en PBS/FCS/EDTA/Ácido y se fijaron con formaldehído al 1% (Merck). Las células se analizaron en un FACSCalibur de cuatro colores (Becton Dickinson).

Se muestran los resultados detallados de IMA-MET-001, como ejemplo tanto para el método A como para el B. Los resultados de los otros péptidos HLA de clase I se resumen en la tabla 8.

A. Destrucción citotóxica del blanco

45 Los resultados fueron publicados por (Schag 2004). La información principal se resume como sigue:

En la primera etapa, la citotoxicidad de los CTL inducidos se analizó en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr utilizando células T2 cargadas con péptidos y células dendríticas autólogas como blancos. Como se muestra en la figura 3, la línea de CTL obtenida tras dos re-estimulaciones semanales demostró la destrucción específica de los antígenos. Los linfocitos T sólo reconocieron células T2 o células dendríticas recubiertas con el péptido cognado, mientras que no lisaron células diana sensibilizadas de manera repetida con péptidos de unión a HLA-A2 irrelevantes, derivados de la proteína survivin o de la transcriptasa inversa del VIH-1, confirmándose la especificidad de la actividad citolítica.

En la segunda etapa, la habilidad de los CTL inducidos in vitro para lisar células tumorales que expresan la proteína c-Met endógenamente se analizó utilizando las líneas celulares positivas de HLA-A*02 HCT116 (cáncer de colon), A498, MZ 1257 (carcinoma de células renales, RCC), MCF-7 (cáncer de mama), Me1 1479 (melanoma maligno) y U266 (mieloma múltiple), que expresan c-Met como blancos en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr . La línea celular transformada de VEB Croft (HLA-2+/c-Met-) y la línea celular del cáncer de ovario SK-OV-3 (HLA-A3+/c-Met+) se incluyeron para determinar la especificidad y restricción HLA del CTL. Como se demuestra en la figura 4, los CTL específicos del péptido c-Met pudieron lisar eficazmente células malignas que expresaban tanto HLA-A2 como c-Met.

No hubo reconocimiento de células de cáncer de ovario SK-OV-3 o células Croft, demostrándose que la presentación del péptido c-Met en el contexto de las moléculas HLA-A2 en las células tumorales es necesaria para la lisis eficaz de las células diana y confirma la especificidad del antígeno la restricción del MHC de los CTL. Los linfocitos T inducidos in vitro no reconocieron a las células K 562, lo que indica que la actividad citotóxica no fue mediada por células NK.

5 Con el fin de seguir verificando la especificidad del antígeno y la restricción de MHC de las líneas de CTL inducidas in vitro, efectuamos análisis de inhibición de blancos fríos. La lisis de las células diana (U 266 y A 498) pudo bloquearse en análisis de inhibición de blancos fríos. La adición de células T2 frías (no marcadas con ^{51}Cr) sensibilizadas de manera repetida con el péptido cognado redujo la lisis de las células tumorales, mientras que las células T2 sensibilizadas de manera repetida con un péptido irrelevante no mostraron efecto alguno (figura 5).

10 B. Detección de linfocitos T con tetrámeros de HLA

Los linfocitos T CD8 enriquecidos de un donante sano A*02+ fueron estimulados tres veces con cuentas recubiertas, en presencia de 10 nM de Ac CD28 más 10 nM de un complejo A*02 irrelevante (panel izquierdo) o A*02 replegado con los antígenos indicados (paneles central y derecho). Los antígenos indicados eran los péptidos NLVPMVATV de CMV pp65 (Wills 1996), el péptido modificado ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 (Kawakami 1994) y el péptido IMA-MET-001. Todas las líneas celulares fueron teñidas en la superficie con Ac de CD8-PerCP, tetrámero-PE cognado (figura 6, paneles izquierdo y central) y tetrámero-APC de A*02/ILKEPVHGV (panel derecho). En cada representación se indica el porcentaje de células de tetrámero positivo entre los linfocitos CD8⁺.

Inmunogenicidad *in vitro* del péptido HLA de clase II IMA-MMP-001 contenido en IMA

20 IMA contiene un péptido HLA de clase II de metaloproteinasas 7 de la matriz, IMA-MMP-001. Para probar la inmunogenicidad in vitro y las propiedades de unión promiscua del péptido, se generaron linfocitos T CD4⁺ a partir de células mononucleares de sangre periférica autólogas (PBMC) de donantes sanos con genotipos HLA distintos, usando el péptido IMA-MMP-001 y la actividad de estos linfocitos T colaboradores probados con tinción de citocina intracelular en citometría de flujo.

25 En primer lugar, los linfocitos T CD4⁺ se generaron (sensibilizaron) in vitro mediante la estimulación repetida de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con el péptido específico analizado en presencia de IL-12. La sensibilización se efectuó utilizando células dendríticas autólogas generadas a partir de monocitos de la sangre de los donantes.

30 En segundo lugar, la actividad de los linfocitos T CD4⁺ sensibilizados específicos para el péptido dado se analizó por medición de la producción de IFN γ por tinción del IFN γ intracelular, utilizando un anticuerpo marcado de forma fluorescente. El análisis se efectuó por citometría de flujo (FACS).

Generación de células dendríticas (DC)

35 Se prepararon células dendríticas humanas a partir de PBMC de sangre fresca de donantes sanos. Se asilaron las PBMC usando un gradiente de densidad Ficoll (medio de separación de linfocitos, laboratorios PAA GmbH, Pasching, Austria). Las células obtenidas se lavaron, se volvieron a suspender en medio X-Vivo 15 suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina y 2 nM de L-Glutamina (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) y se colocaron en una placa a una densidad de 7×10^6 células/ml. Después de dos horas a 37 °C, los monocitos adherentes se cultivaron durante 6 días en medio X-Vivo con 100 ng/ml de GM-CSF y 40 ng/ml de IL-4 (AL-ImmunoTools, Friesoythe, Alemania). El séptimo día, las células dendríticas inmaduras se activaron con 10 ng/ml de TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de poli(IC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 3 días. El estado de diferenciación de las células dendríticas fue examinado por citometría de flujo, siendo las células dendríticas maduras predominantemente CD14-, CD40-positivo, CD80-positivo, CD83-positivo, CD86-positivo y HLA-DR+.

Generación de linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno

45 Para generar linfocitos T CD4⁺, se estimularon 10^6 PBMC con 2×10^5 células dendríticas autólogas. Tras la sensibilización, se efectuaron re-estimulaciones con PBMC autólogas criopreservadas cada seis a ocho días. Para la estimulación, las células se sensibilizaron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de péptido durante 90 minutos a 37 °C y se irradiaron (60 Gy; Gammacell 1000 Elite, Nordion International Inc, Ontario, Canadá). Las células se incubaron en placas de 96 pocillos (7 pocillos por donante y péptido) con medio de linfocitos T: RPMI 1640 con HEPES y L-glutamina (Gibco, Paisley, Reino Unido) suplementada con suero humano al 10% inactivado por calor (PAA, Cölbe, Alemania), 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (BioWhittaker) en presencia de 10 ng/ml de IL-12 (Promocell, Heidelberg, Alemania). Después de tres a cuatro días de co-incubación a 37 °C, se añadió medio fresco con 80 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Corporation, Emeryville, CA, EE. UU.) y 5 ng/ml de IL-7 (Promocell). Los análisis se efectuaron tras la tercera y cuarta estimulación mediante tinción de IFN γ intracelular.

Tinción de IFN γ intracelular

55 PBMC criopreservadas se descongelaron, se lavaron dos veces en medio X-Vivo 15, se re-suspendieron a 10^7 células/ml en medio de linfocitos T y se cultivaron una noche para reducir la producción de IFN γ no específico

(Provenzano 2002). Al día siguiente, las PBMC se sensibilizaron de manera repetida con 5 µg/ml de péptido durante dos horas, se lavaron tres veces con medio X-Vivo 15 y se incubaron con células efectoras en un ratio de 1:1 durante 6 horas. Se añadió Golgi-Stop (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) para las últimas 4 horas de incubación. Las células se analizaron usando un kit Cytofix/Cytoperm Plus (Becton Dickinson) y anticuerpos CD4-FITC- (Immunotools), IFN γ -PE- y CD8-PerCP clon SK1 (Becton Dickinson). Tras la tinción, las células se analizaron en un FACSCalibur de tres colores (Becton Dickinson).

Con el fin de generar linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno y de probar la unión promiscua de los péptidos, se estimularon PBMC de 4 donantes sanos con alelos HLA-DR diferentes (figura 7) usando células dendríticas autólogas sensibilizadas de forma reiterada con el péptido. Como sistema de lectura para la generación de linfocitos T CD4⁺ específicos de antígeno, se calculó la producción de IFN γ mediante citometría de flujo. Los linfocitos T se analizaron, después de la tercera y cuarta estimulación, mediante tinción de IFN γ intracelular, CD4-FITC y CD8-PerCP, para determinar el porcentaje de células productoras de IFN γ en subpoblaciones de linfocitos T específicas. En todos los experimentos se efectuaron estimulaciones con péptidos irrelevantes y sin péptidos como controles negativos. La respuesta del IFN γ se consideró positiva si la detección de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN γ era más de dos veces mayor en comparación con el control negativo. (Horton 2004). En tres de cuatro donantes pudimos generar linfocitos T CD4⁺ reactivos específicamente al péptido de interés (figura 7). En el donante 4 no se pudieron observar respuestas de linfocitos T, ni después de la tercera estimulación ni después de la cuarta. En los donantes 1 y 2 se observaron las frecuencias más altas de linfocitos T CD4⁺ productores de IFN γ específicos para IMA-MMP-001, respectivamente.

Así, IMA-MMP-001 es un aglutinante promiscuo capaz de provocar respuestas de linfocitos T CD4⁺ en tres de cuatro donantes sanos con alelos HLA distintos. Conforme a las predicciones sobre la unión y los resultados obtenidos, es altamente probable que es péptido sea presentado por HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401/*0408 y HLA-DRB1*1101. Los cuatro alelos tienen un residuo de glicina en la posición 86 y un residuo de ácido aspártico en la posición 57 de sus cadenas β (no se muestran datos). Por tanto, tienen motivos de unión muy similares, compartiendo características de unión para sus cavidades de unión P1 y P4 (Rammensee 1997; Hammer 1993; Marshall 1994). El donante 4 porta alelos HLA-DRB1*0318 y DRB1*1401 muy con motivos de unión muy distintos. Esto explicaría por qué no fue posible provocar una respuesta de linfocitos T con las células de este donante utilizando los péptidos mencionados anteriormente.

Efectos en humanos

Los péptidos cortos, similares en longitud y distribución de los aminoácidos a los descritos aquí han sido inmunizados en miles de pacientes en las fases 1 a 3 de diversos ensayos clínicos desde 1996. En ninguno de estos estudios se registraron acontecimientos adversos graves. Adicionalmente, el péptido IMA-MUC-001 contenido en IMA ya ha sido utilizado para vacunación. Se cargó en células dendríticas en un ensayo iniciado por un investigador en la Universidad de Tubinga (Alemania) y fue muy bien tolerado (Wierecky 2005).

Los péptidos con las secuencias SEQ ID n.º 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se probaron en 30 pacientes, 26 de los cuales completaron un curso completo de vacunación durante un periodo de diez semanas. Una elevada proporción de pacientes, el 74%, mostró una respuesta inmune específica contra las secuencias de péptidos incluidas en la vacuna. Ya en este pequeño cohorte de fase I, la función biológica in vivo de 8 de los 9 péptidos (SEQ ID n.º 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) unidos a MHC de clase I (alelo HLA-A*02) pudo confirmarse conforme a los resultados de un ensayo ELISPOT amplificado y/o de un ensayo de tinción de tetrámeros, efectuados tal y como se describe más abajo. El péptido con la secuencia SEQ ID n.º 1 (IMA-MMP-001), para el que se habría requerido una lectura diferente, no se pudo probar debido a la disponibilidad limitada de PBMC de la sangre del paciente.

Parámetros inmunológicos específicos (monitorización inmunológica)

Hasta la fecha, la monitorización inmunológica ha sido una práctica común en miles de pacientes, para diversos estudios de vacunación terapéutica (Romero 2004). Hasta la fecha, se han registrado muchos métodos distintos de monitorización inmunológica, incluyendo ensayos funcionales y específicos. Los componentes inmunógenos de la vacuna terapéutica IMA son péptidos de unión a HLA que han de inducir linfocitos T específicos in vivo. Esta activación lleva a su proliferación y a la adquisición de funciones efectoras, que incluye la habilidad para secretar citocinas al contactar con el antígeno.

Como marcador substitutivo para la activación de linfocitos T, la frecuencia de la citocina específica que secreta células mononucleares en la sangre se puede analizar usando ensayos de ELISPOT. Estos ensayos son especialmente apropiados para este objetivo, ya que están basados en células únicas y tienen como resultado un parámetro (el número de células que forman punto entre las células mononucleares) que se espera que tenga correlación directa con la frecuencia auténtica de los linfocitos T específicos de antígenos secretores de citocinas en las muestras de sangre. Los ensayos también permiten el procesamiento de un número relativamente elevado de muestras y péptidos en paralelo y ya se han utilizado ampliamente para estudios clínicos de monitorización inmune (Schmittel 2000).

Respuesta inmune

La actividad/eficacia inmunológica puede describirse por el análisis de las repuestas de los linfocitos T. En la bibliografía se pueden encontrar experiencia y resultados de diversos estudios clínicos con respecto a la respuesta inmune para

distintas indicaciones. Las respuestas de los linfocitos T de hasta el 100% son descritas por Disis y col, 1999, en pacientes con cáncer de mama y de ovario. La propagación de los epítomos en el 84% de los pacientes (n=64) fue registrada por Disis y col en 2002, en un estudio con el antígeno Her2/neu más GM-CSF, en pacientes con cáncer de ovario, mama y de pulmón de células no pequeñas. Otros autores han publicado resultados referentes a las respuestas de linfocitos T de entre el 33% y el 83% en pacientes con melanoma (Keilholz/Schadendorf, 2003; Slingluff y col, 2004). Gaudernack/Gjertsen, 2003, informa sobre una respuesta inmune de varios clones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos para el antígeno utilizado en este estudio.

Wierecky y col (ASCO 2005) también presentaron resultados al respecto: se sensibilizaron de manera repetida células dendríticas derivadas de monocitos maduros autólogos con dos péptidos de unión a HLA-A2 del péptido MUC1. Para el reclutamiento y activación de linfocitos T CD4⁺, las células dendríticas se incubaron con los péptidos de unión a PAN-DR PADRE. En este enfoque terapéutico, las vacunaciones se realizaron cuatro veces cada dos semanas y se repitieron mensualmente hasta la evolución del tumor. Tras la quinta inyección de DC, se administró a los pacientes, adicionalmente, tres inyecciones por semana de IL-2 en dosis baja (1 Mio IE/m²). La mejora del precursor de linfocitos T se monitorizó con ensayos de Elispot y de liberación de ⁵¹Cr del IFN γ . Además, la habilidad de las PBMC para producir citocinas en respuesta a los epítomos relacionados con la vacuna fue probada con PCR cuantitativa en tiempo real.

En este estudio por Wierecky y col, las respuestas de los linfocitos T específicos del péptido MUC 1 fueron detectados en las PBMC de todos los pacientes con OR. Estos linfocitos inducidos in vivo pudieron reconocer células diana sensibilizadas de manera repetida con el péptido cognado o células tumorales alogénicas (A498) que expresan MUC1 de forma constitutiva en un antígeno y HLA de forma restringida tras la reestimulación in vivo. En pacientes respondiendo al tratamiento, las repuestas a los antígenos no usado para la vacunación, como adipofilina, telomerasa o OFA pudieron detectarse, indicando que la proliferación de epítomos podría ocurrir. La respuesta proliferativa al péptido PADRE se detectó en 11 pacientes de 16, en algunos pacientes, después de la segunda vacunación. Conclusión: el análisis de la proliferación de epítomos en pacientes vacunados podría ser un parámetro útil para establecer una correlación de respuestas clínicas e inmunológicas.

25 **RESPUESTAS INMUNES IN VIVO**

Formulación del ensayo clínico

La formulación del ensayo clínico de IMA consiste en:

- Liofilizado que incluye 11 péptidos en viales de 2 ml.
- Diluyente (bicarbonato sódico al 4,2%)

30 **Posología de IMA**

Polvo para inyección en viales de 3 ml. Información del embalaje: se embalan 4 viales en cajas. El diluyente consiste en 700 μ l de bicarbonato sódico embalado en botellas de 250 ml. 1 vial de IMA se reconstituye mediante la adición de 700 μ l de solución de bicarbonato sódico al 4,2% (disolución). Para disolver IMA, el vial y el diluyente se agitan con fuerza durante 3 minutos y se trata mediante ultrasonido durante 1 minuto. A continuación el vial se agita de nuevo durante 1 minuto. Se administran 500 μ l de esta solución en los 30 minutos tras la reconstitución.

Vacunación

En este estudio, los pacientes de carcinoma avanzado de células renales recibieron ocho vacunaciones durante un periodo de tiempo de diez semanas. En conjunto, se inscribieron un total de 24 pacientes del tipo HLA HLA-A*02 positivo. Se administró una vacuna intradérmica (GM-CSF más IMA) los días 1, 2, 3, 8, 15, 22, 36 y 64. Las muestras de sangre se tomaron en distintos puntos de tiempo durante el estudio y los linfocitos T contenidos en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del paciente se aislaron de la sangre heparizada mediante centrifugación del gradiente de densidad, se contaron utilizando hemocitómetros y se conservaron a temperatura criogénica hasta los ensayos. Dos ensayos ELISPOT rutinarios diferentes y un ensayo tetramérico rutinario se efectuaron entonces

Ensayo ELISPOT amplificado

45 En el ensayo ELISPOT ex vivo, las células se descongelan en distintos puntos de tiempo, se cuenta el número de células vivas y las muestras se prueban en pocillos triplicados, mediante una incubación de un día, con distintos péptidos o controles. El ensayo ELISPOT ex vivo proporciona datos cuantitativos de una forma mucho más rápida en comparación con los otros ensayos más abajo. Además, es el único ensayo que permite la medición del péptido HLA de clase II (IMA-MMP-001) contenido en IMA. Sin embargo, este ensayo es de sensibilidad limitada y sólo se esperaron datos positivos en el caso de respuestas muy fuertes de linfocitos T, comparables a las respuestas inmunes a los virus de memoria (*recall*).

En el ensayo ELISPOT amplificado, las células de distintos puntos del tiempo se mezclan, se cuentan y se preestiman con antígenos durante unas dos semanas para permitir que las células específicas se dividan. Las células se recogen entonces del cultivo, se recuentan y se vuelven a probar, como se ha indicado antes, para la producción de IFN- γ al

reestimar durante un día con el antígeno. Las células que se activan en tales condiciones secretan IFN- γ , que es detectado por una enzima unida mediante la técnica de anticuerpos de sándwich. Los lugares se visualizan con una reacción en color y se cuentan con una cámara digital automática de alta resolución (que en adelante llamaremos «lector de ELISPOT»). El número de lugares que se correlacionan con la auténtica frecuencia de los linfocitos T activados específicos de antígeno en la muestra se determina mediante un algoritmo de software de imágenes tomadas por el lector ELISPOT. Este ensayo se ha usado a menudo para detectar respuestas de linfocitos T a antígenos de tumor vacunados en diversos ensayos clínicos de terceras partes. La posibilidad de datos positivos falsos debido a la «sensibilización in vitro» de linfocitos T se excluye por la utilización de diversos controles en este ensayo. En comparación con el ensayo tetramérico más abajo, este ensayo ofrece información funcional adicional, esto es, liberación de citocinas IFN- γ .

El ensayo ELISPOT amplificado se efectuó en el estudio para 28 pacientes y todos los antígenos presentes en IMA antes y durante el protocolo de vacunación en distintos puntos de tiempo. La figura 10 muestra ejemplos representativos de una respuesta de linfocitos T inducida por IMA por el ensayo ELISPOT amplificado para el mismo paciente y antígeno. Las columnas superior e inferior representan al antígeno de control negativo HIV-001 y TUMAP únicos IMA-CCN-001 usados para la lectura, respectivamente. Se proporciona el número de células positivas para cada experimento. La columna izquierda muestra ELISPOT de muestras mezcladas tomadas antes de la vacunación, mientras que la columna derecha muestra ELISPOT de muestras mezcladas tomadas durante el protocolo de vacunación. Mientras que el antígeno de control no llevó a un aumento del número de lugares tras la inducción de una respuesta inmune, la inyección de IMA llevó a una multiplicación del número de lugares para IMA-CCN-001. El número de células positivas, es decir, de células que secretan IFN- γ aumentó de 27-34 antes de la vacunación a 100-141 tras la cuarta y la quinta inyección. El tratamiento con IMA resultó en una frecuencia aumentada de linfocitos T activados específicos para el antígeno IMA-CCN-001 en este paciente.

Ensayo de tetrameros amplificado

En el ensayo de «tetrameros amplificados», descongelaron células de distintos puntos temporales, se contaron y se preestimularon con antígenos durante unas dos semanas para permitir que los linfocitos T específicos de antígeno se dividieran. A continuación, las células se recogen del cultivo, se vuelven a contar y se tiñen con multímeros MHC etiquetados con fluorocromo APC y PE más anticuerpos, para definir linfocitos T CD8+ (un pocillo por tinción y punto de tiempo). Los multímeros MHC son complejos recombinantes de péptido-MHC que se multimerizan y se conjugan a un color fluorescente. Sólo se usaron los multímeros tetraméricos HLA-A*0201 que son completamente equivalente a los introducidos originariamente en este campo (Altmann, 1996), que aquí se denominan tetrameros. Se analizaron muestras teñidas y fijas en un citómetro de flujo, utilizando procedimientos estándar conocidos por los expertos, lo que resultó en datos basados en una única célula para cada muestra. Este ensayo de «tetramero amplificado» es de gran sensibilidad pero menos cuantitativo en comparación con los ensayos ex vivo. Para el análisis primario de datos tetraméricos, el número total de los linfocitos T CD8+ evaluados y de células positivas de tetramero único y de tetramero doble por muestra se contó electrónicamente a partir de los archivos de modo de lista de la citometría, utilizando un software comercial. Los linfocitos T CD8+ se identificaron mediante bebedero de dispersión delantera y lateral (*gating*) en los linfocitos vivos y subbebedero en eventos CD8+ y CD3+ basados en fluorescencias de anticuerpos. La definición de los bebederos de linfocitos y de los bebederos CD3/CD8 fue idéntica para todas las tinciones de un paciente dentro de un ensayo. Las poblaciones positivas de tetrameros se identificaron a partir de linfocitos T CD8+ mediante el análisis de gráficos de puntos de tetrameros dobles con cuadrantes o bebederos. La definición de las células de tetrameros positivos fue idéntica para cada condición de tinción para un paciente dado en un ensayo y basada en poblaciones de células reconocibles. El ensayo de tetrameros amplificados se efectuó para 28 pacientes en el estudio, y todos los antígenos presentes en IMA antes y durante el protocolo de vacunación, en distintos puntos del tiempo.

La figura 11 muestra dos ejemplos representativos de respuestas de linfocitos T inducidos por IMA, identificados por el ensayo de tinción de tetramero amplificado. Los paneles superior y central representan gráficos de puntos de dos dimensiones en linfocitos CD3+, los paneles inferiores, en linfocitos CD3+ y CD8+. Los pacientes, puntos en el tiempo y tinciones fueron los que se indicaron para cada columna. En la figura 11B, la respuesta inmunológica a IMA-CCN-001 en el paciente 03-004, que ya se mostró mediante el ensayo ELISPOT (figura 10), se confirmó mediante un ensayo tetramérico. Se identificó una población de células positiva para CD3+ y el tetramero IMA-CCN-001 tras la cuarta y la quinta inyección de IMA (V6+V7; panel central), mientras que no se encontró población positiva para el tetramero K67-001 (panel superior). Las células positivas IMA-CCN-001 aumentaron del 0,03% antes de la vacunación al 0,78% de los linfocitos (V6+V7; panel inferior) tras las tres primeras inyecciones.

El paciente 03-003 no exhibió una respuesta inmune contra el péptido RGS-001 (fig. 11B; panel superior), pero desarrolló una respuesta positiva al tetramero IMA-CCN-001 durante el tiempo del protocolo de vacunación (S1+V1: muestras tomadas antes de la vacunación; V4+V5: muestras tomadas el día 8 y el día 15; V6+V7: muestras tomadas en día 22 y el día 36; V8+FU: muestras tomadas el día 64 (última vacunación) y tras los días 85 a 92; (final del estudio). En el panel central, las columnas 3 y 4 muestran poblaciones de células definidas positivas para CNN-001 y CD3+. Durante el curso de la vacunación, la cantidad de estas células aumentó del 0,02% antes de la vacunación al 0,8 % de los linfocitos (panel inferior; columna 3) tras las tres primeras inyecciones y descendió al 0,31% tras el día 64 (panel inferior; columna 4; V8+FU).

5 En pacientes seleccionados, el ensayo tetramérico amplificado se efectuó para puntos de tiempo únicos, es decir, las muestras de sangre no se mezclaron, permitiendo una evaluación más precisa de la cinética de los linfocitos T, un ejemplo de lo cual se muestra en la figura 12. Se muestra la magnitud de la cinética de los linfocitos T observada en ensayos de tetrámeros amplificados en un punto de tiempo único para el paciente 05-001. Los antígenos asociados a un tumor presentes en IMA (mezcla TUMAP) fueron los más altos los días 22, 36 y 64 (V6, V7 y V8), mientras que la respuesta al péptido IMA-CCN-001 llegó a su máximo antes, el día 22 (V6). El control positivo HBV-001 resultó en una respuesta aún más rápida que alcanzó su máximo el día 15 (V5).

10 Se seleccionaron dos pacientes con una respuesta muy elevada a IMA-CCN-001 para confirmar los resultados del ensayo de tetrámero amplificado en un experimento no amplificado. Estos ensayos de tetrámero ex vivo se efectuaron sin cultivar las células durante dos semanas.

15 Los resultados se resumen en la tabla 9 más abajo. Se muestran todos los resultados evaluables de ensayos de tetrámeros ex vivo y de tetrámeros amplificados con una correspondencia paciente/antígeno, donde una respuesta inducida por vacuna se detectó en el ensayo amplificado. Para el método ex vivo, se indica el porcentaje de tetrámeros positivos entre todos los linfocitos T CD8+. En cuanto al método de evaluación «amplificado, rutinario», las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ pueden analizarse y se muestra una segunda reevaluación de los datos rutinarios («amplificado, cuantitativo») con cálculos basados en linfocitos T CD8+ totales. El «factor de amplificación» se calculó si una población discreta de tetrámeros positivos fue vista en el ensayo tetramérico amplificado ex vivo.

20 Los resultados demuestran claramente que las respuestas inmunológicas medidas con el ensayo tetramérico amplificado no se deben a la expansión celular durante la incubación de dos semanas, sino que se basan en los linfocitos presentes previamente ex vivo en la sangre de los pacientes.

Tabla 9: Comparación de las magnitudes de la respuesta de los linfocitos T calculada a partir de ensayos ex vivo y de tetrámero amplificado.

PACIENTE	Identificador del ensayo	Punto del tiempo	Método	Antígeno	% de tetrámero+ entre los linfocitos CD8+ T-	Factor de amplificación
01-001	TET-0013/20060511a	S2	ex vivo	MUC-001	0,003	
01-001	TET-0013/20060511a	V1	ex vivo	MUC-001	0,004	
01-001	TET-0013/20060511a	V4	ex vivo	MUC-001	0,007	
01-001	TET-0013/20060511a	V5	ex vivo	MUC-001	0,003	
01-001	TET-0013/20060511a	V6	ex vivo	MUC-001	0,001	
01-001	TET-0013/20060511a	V7	ex vivo	MUC-001	0,003	
01-001	TET-0013/20060511a	V8	ex vivo	MUC-001	0,004	
01-001	TET-0013/20060511a	FU	ex vivo	MUC-001	0,005	
01-001	TET-0001/20060425a	S2;V1	amplificado, rutinario	MUC-001	2,976*	
01-001	TET-0001/20060425a	V4;V5	amplificado, rutinario	MUC-001	2,391*	
01-001	TET-0001/20060425a	V6;V7	amplificado, rutinario	MUC-001	4,502*	
01-001	TET-0001/20060425a	V8;FU	amplificado, rutinario	MUC-001	4,900*	
01-001	TET-0001/20060425a	S2;V1	amplificado, cuantitativo	MUC-001	3,044*	
01-001	TET-0001/20060425a	V4;V5	amplificado, cuantitativo	MUC-001	2,485*	
01-001	TET-0001/20060425a	V6;V7	amplificado, cuantitativo	MUC-001	4,545*	
01-001	TET-0001/20060425a	V8;FU	amplificado, cuantitativo	MUC-001	5,037*	
01-003	20060727a	V1	ex vivo	HBV-001	0,006	
01-003	20060727a	V7	ex vivo	HBV-001	0,021*	
01-003	TET-0007/20060510b	V1	amplificado, cuantitativo	HBV-001	0,036*	
01-003	TET-0007/20060510b	V7	amplificado, cuantitativo	HBV-001	2,587*	123

01-003	TET-0007/20060510b	V1	amplificado, rutinario	HBV-001	(0,084*)	
01-003	TET-0007/20060510b	V7	amplificado, rutinario	HBV-001	(5,186*)	(247)
01-009	20060727a	V1	ex vivo	rCCN-001	0,010*	
01-009	20060727a	V5	ex vivo	rCCN-001	0,092*	
01-009	20060727a	V6	ex vivo	rCCN-001	0,052*	
01-009	TET-0026/20060711a	V1	amplificado, cuantitativo	TUMAP Pool#	0,051	
01-009	TET-0026/20060711a	V5	amplificado, cuantitativo	TUMAP Pool#	5,323*	58
01-009	TET-0026/20060711a	V6	amplificado, cuantitativo	TUMAP Pool#	1,398*	27
01-009	TET-0026/20060711a	V1	amplificado, rutinario	TUMAP Pool#	(0,059)	
01-009	TET-0026/20060711a	V5	amplificado, rutinario	TUMAP Pool#	(16,961*)	(184)
01-009	TET-0026/20060711a	V6	amplificado, rutinario	TUMAP Pool#	(6,181*)	(119)
03-009	20060727a	V1	ex vivo	rCCN-001	0,009	
03-009	20060727a	V7	ex vivo	rCCN-001	0,034*	
03-009	TET-0015/20060531a	V1	amplificado, cuantitativo	TUMAP Pool#	0,124	
03-009	TET-0015/20060531a	V7	amplificado, cuantitativo	TUMAP Pool#	7,521*	221
03-009	TET-0015/20060531a	V1	amplificado, rutinario	TUMAP Pool#	(0,247)	
03-009	TET-0015/20060531a	V7	amplificado, rutinario	TUMAP Pool#	(18,953*)	(557)

*: detectada una población de discreta de tetrameros positivos

#: el ensayo por separado mostró claramente que la respuesta de la mezcla de TUMAP sólo podía aportarse a rCCN-001.

Receptividad general del paciente

5 Las respuestas de los linfocitos T medidas por los ensayos descritos más arriba se evaluaron para todos los péptidos contenidos en IMA para 28 pacientes, en los distintos puntos de tiempo del estudio. Se calificó al paciente como «receptivo», es decir, con una respuesta inmune inducida por la vacuna, si una de las muestras de sangre tomadas durante y después de la vacunación contenía linfocitos de tetrámeros positivos or si secretaba IFN- γ mediante estimulación con uno de los péptidos.

10 Tal y como se esperaba, los pacientes reaccionaron individualmente hacia los distintos péptidos contenidos en IMA. Teniendo en cuenta el pequeño número de pacientes, se logró una receptividad sorprendentemente buena, puesto que la mayoría de los pacientes (23 de 27 pacientes evaluables) desarrollaron una respuesta inmune a, al menos, uno de los péptidos. 8 de 27 pacientes evaluables (30%) mostraron incluso una respuesta de linfocitos T contra TUMAP múltiples.

Bibliografía

- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, and Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96 (1996).
- Apostolopoulos V and McKenzie IF. Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev. Immunol.* 14:293-309 (1994).
- 15 Bamias A, Chorti M, Deliveliotis C, Trakas N, Skolarikos A, Protogerou B, Legaki S, Tsakalou G, Tamvakis N, and Dimopoulos MA. Prognostic significance of CA 125, CD44, and epithelial membrane antigen in renal cell carcinoma. *Urology* 62:368-373 (2003).
- Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, and Finn OJ. Specific, Major Histocompatibility Complex-Unrestricted Recognition of Tumor-Associated Mucins by Human Cytotoxic T-cells. *PNAS* 86:7159-7163 (1989).
- 20 Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, and Peters G. CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9:71-79 (1994).
- Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, and Schirmacher P. Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95:3964-3969 (2000).
- Berger M, Bergers G, Arnold B, Hammerling GJ, and Ganss R. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 105:1094-1101 (2005).
- Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC, and . Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J Virol.* 67:2376-2380 (1993).
- 30 Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, and Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376:768-771 (1995).
- Borset M, Seidel C, Hjorth-Hansen H, Waage A, and Sundan A. The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leuk. Lymphoma* 32:249-256 (1999).
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, and Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251:802-804 (1991).
- 35 Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, and Lemoine NR. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol.* 182:347-355 (1997).
- Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, and Brugger W. Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93:4309-4317 (1999).
- 40 Brossart P, Schneider A, Dill P, Schammann T, Grunebach F, Wirths S, Kanz L, Buhring HJ, and Brugger W. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res.* 61:6846-6850 (2001).
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, and Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96:3102-3108 (2000).
- 45 Browner MF, Smith WW, and Castelhana AL. Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry* 34:6602-6610 (1995).
- Cao Y, Karsten U, Zerban H, and Bannasch P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. *Virchows Arch.* 436:119-126 (2000).

- Chen X, Higgins J, Cheung ST, Li R, Mason V, Montgomery K, Fan ST, van de RM, and So S. Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod. Pathol.* 17:1198-1210 (2004).
- De VL, Zheng B, Fischer T, Elenko E, and Farquhar MG. The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:235-271 (2000).
- 5 Delsol G, Al ST, Gatter KC, Gerdes J, Schwarting R, Caveriviere P, Rigal-Huguet F, Robert A, Stein H, and Mason DY. Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas. Diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am. J. Pathol.* 130:59-70 (1988).
- Denys H, De Wever O, Nusgens B, Kong Y, Sciort R, Le AT, Van Dam K, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, and Cassiman JJ. Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br. J Cancer* 90:1443-1449 (2004).
- 10 Deshpande A, Sicinski P, and Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24:2909-2915 (2005).
- Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, and . Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1:147-154 (1995).
- 15 Dittmann J, Keller-Matschke K, Weinschenk T, Kratt T, Heck T, Becker HD, Stevanovic S, Rammensee HG, and Gouttefangeas C. CD8(+) T-cell response against MUC1-derived peptides in gastrointestinal cancer survivors. *Cancer Immunol Immunother.* (2004).
- Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, and Van WC. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 61:5911-5918 (2001).
- 20 Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C, and Kane JP. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J. Lipid Res.* 42:620-630 (2001).
- Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, Kunitake ST, Naya-Vigne J, O'Connor PM, Malloy MJ, and Kane JP. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J. Biol. Chem.* 272:25576-25582 (1997).
- 25 Duperray C, Klein B, Durie BG, Zhang X, Jourdan M, Poncelet P, Favier F, Vincent C, Brochier J, Lenoir G, and . Phenotypic analysis of human myeloma cell lines. *Blood* 73:566-572 (1989).
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, and Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296 (1991).
- 30 Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, and Comoglio PM. The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10:739-749 (1995).
- Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, and Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 145:61-89 (1995).
- 35 Fischer J, Palmedo G, von KR, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, and Kovacs G. Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17:733-739 (1998).
- Fujita K, Denda K, Yamamoto M, Matsumoto T, Fujime M, and Irimura T. Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 80:301-308 (1999).
- 40 Furge KA, Zhang YW, and Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19:5582-5589 (2000).
- Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GFV, and Webb CP. Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *PNAS* 98:10722-10727 (2001).
- 45 Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, Suyama T, Naya Y, Ito H, Nikaido T, and Ishikura H. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J. Pathol.* 203:551-558 (2004).
- Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, and Matrisian LM. Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J Biol. Chem.* 269:2032-2040 (1994).

- Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, and Burchell J. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263:12820-12823 (1988).
- 5 Gherardi E and Stoker M. Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells* 3:227-232 (1991).
- Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, and Taylor-Papadimitriou J. A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer* 43:1072-1076 (1989).
- 10 Gursky S, Olopade OI, and Rowley JD. Identification of a 1.2 Kb cDNA fragment from a region on 9p21 commonly deleted in multiple tumor types. *Cancer Genet. Cytogenet.* 129:93-101 (2001).
- Halaban R. Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 18:333-343 (1999).
- Hammer J, Valsasnini P, Tolba K, Bolin D, Higelin J, Takacs B, and Sinigaglia F. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74:197-203 (1993).
- 15 Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, and Landberg G. Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 84:268-272 (1999).
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, and Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294:309-321 (1998).
- Horton H, Russell N, Moore E, Frank I, Baydo R, Havenar-Daughton C, Lee D, Deers M, Hudgens M, Weinhold K, and McElrath MJ. Correlation between interferon- gamma secretion and cytotoxicity, in virus-specific memory T-cells. *J. Infect. Dis.* 190:1692-1696 (2004).
- 20 Jadeski LC, Chakraborty C, and Lala PK. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int. J. Cancer* 106:496-504 (2003).
- Jager, E., Y. Nagata, S. Gnjatic, H. Wada, E. Stockert, J. Karbach, P. R. Dunbar, S. Y. Lee, A. Jungbluth, D. Jager, M. Arand, G. Ritter, V. Cerundolo, B. Dupont, Y. T. Chen, L. J. Old, and A. Knuth. Monitoring CD8 T-cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:4760 (2000).
- 25 Jucker M, Gunther A, Gradl G, Fonatsch C, Krueger G, Diehl V, and Tesch H. The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma. *Leuk. Res.* 18:7-16 (1994).
- Jung G, Ledbetter JA, and Muller-Eberhard HJ. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:4611-4615 (1987).
- 30 Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins PF, Rivoltini L, Yannelli JR, Appella E, and Rosenberg SA. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp. Med.* 180:347-352 (1994).
- Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, and Vande Woude GF. Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57:5391-5398 (1997).
- 35 Kraus S, Abel PD, Nachtmann C, Linsenmann HJ, Weidner W, Stamp GW, Chaudhary KS, Mitchell SE, Franke FE, and Lalani e. MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum. Pathol.* 33:60-67 (2002).
- Kurokawa Y, Matoba R, Nakamori S, Takemasa I, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M, and Kato K. PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 23:135-141 (2004).
- 40 Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, and Stevanovic S. Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* 22:450-454 (2004).
- Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, and Porchet N. Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 40:450-457 (2002).
- 45 Lew DJ, Dulic V, and Reed SI. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66:1197-1206 (1991).
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, and Herlyn M. Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20:8125-8135 (2001).

- Lin TS, Chiou SH, Wang LS, Huang HH, Chiang SF, Shih AY, Chen YL, Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Chou MC, Kuo SJ, and Chow KC. Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 12:717-723 (2004).
- 5 Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, and Sette A. The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J Immunol.* 159:1383-1392 (1997).
- Loden M, Stighall M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Ostlund H, and Landberg G. The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene* 21:4680-4690 (2002).
- 10 Louhelainen J, Wijkstrom H, and Hemminki K. Initiation-development modelling of allelic losses on chromosome 9 in multifocal bladder cancer. *Eur. J. Cancer* 36:1441-1451 (2000).
- Mark AS and Mangkornkanok M. B-cell lymphoma marking only with anti-epithelial membrane antigen. *Cancer* 63:2152-2155 (1989).
- 15 Marshall KW, Liu AF, Canales J, Perahia B, Jorgensen B, Gantz RD, Aguilar B, Devaux B, and Rothbard JB. Role of the polymorphic residues in HLA-DR molecules in allele-specific binding of peptide ligands. *J. Immunol.* 152:4946-4957 (1994).
- Maulik G, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, Lin J, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, and Salgia R. Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8:620-627 (2002).
- 20 Miyazaki K, Hattori Y, Umenishi F, Yasumitsu H, and Umeda M. Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* 50:7758-7764 (1990).
- Mizuno K, Higuchi O, Ihle JN, and Nakamura T. Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:178-186 (1993).
- 25 Monajemi H, Fontijn RD, Pannekoek H, and Horrevoets AJ. The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 79:539-546 (2002).
- Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, and Aaronson SA. Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ.* 9:355-365 (1998).
- 30 Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, and Milford EL. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. *Transplantation* 64:1017-1027 (1997).
- Mott JD and Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:558-564 (2004).
- Mueller MRWJ, Brugger W, Gouttefangeas C., Kanz L, and Brossart P. Vaccinations with peptide pulsed dendritic cells induces clinical and immunological responses in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 22, 168. 1-6-2003.
- 35 Ref Type: Abstract
- Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, and Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6:501-504 (1991).
- 40 Neumann F, Wagner C, Stevanovic S, Kubuschok B, Schormann C, Mischo A, Ertan K, Schmidt W, and Pfreundschuh M. Identification of an HLA-DR-restricted peptide epitope with a promiscuous binding pattern derived from the cancer testis antigen HOM-MEL-40/SSX2. *Int. J. Cancer* 112:661-668 (2004).
- Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, Hayashi T, Hinoda Y, and Imai K. Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int. Immunol.* 9:791-798 (1997).
- 45 Ohara O, Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D, Ohira M, Seki N, and Nomura N. Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins. *DNA Res.* 4:53-59 (1997).
- Pachter JS, de Vries HE, and Fabry Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62:593-604 (2003).

- Pass, H. A., S. L. Schwarz, J. R. Wunderlich, and S. A. Rosenberg. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J. Sci. Am.* 4:316 (1998).
- Pons E, Uphoff CC, and Drexler HG. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk. Res.* 22:797-804 (1998).
- 5 Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, and Comoglio PM. A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 13:4600-4608 (1993).
- Previsani N and Lavanchy D. Hepatitis B. World Health Organization Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. 2002 WHO/CDS/CSR/LYO/2002. 2:Hepatitis B. (2002).
- 10 Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, and Teh BT. Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62:589-596 (2002).
- Quantin B, Murphy G, and Breathnach R. Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28:5327-5334 (1989).
- 15 Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, and Clements JA. Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int. J. Cancer* 88:726-732 (2000).
- Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, and Francis GL. Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 53:635-644 (2000).
- 20 Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, and Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219 (1999).
- Rammensee, H.G., Bachmann, J., and Stevanovic, S. (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- Rehermann B and Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5:215-229 (2005).
- 25 Rentsch C, Kayser S, Stumm S, Watermann I, Walter S, Stevanovic S, Wallwiener D, and Guckel B. Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells. *Clin Cancer Res.* 9:4376-4386 (2003).
- Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, and Rammensee HG. Exact prediction of a natural T-cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21:2891-2894 (1991).
- 30 Rubin JS, Bottaro DP, and Aaronson SA. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* 1155:357-371 (1993).
- Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St CB, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, and Vogelstein B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 294:1343-1346 (2001).
- 35 Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, and Murakami Y. Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol. Rep.* 12:47-52 (2004).
- Schag K, Schmidt SM, Muller MR, Weinschenk T, Appel S, Weck MM, Grunebach F, Stevanovic S, Rammensee HG, and Brossart P. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 10:3658-3666 (2004).
- 40 Scheibenbogen, C., A. Schmittl, U. Keilholz, T. Allgauer, U. Hofmann, R. Max, E. Thiel, and D. Schadendorf. Phase 2 trial of vaccination with tyrosinase peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 23:275. (2000)
- Schirle M, Weinschenk T, and Stevanovic S. Combining computer algorithms with experimental approaches permits the rapid and accurate identification of T-cell epitopes from defined antigens. *J. Immunol. Methods* 257:1-16 (2001).
- 45 Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, and Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373:699-702 (1995).
- Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, and Kufe D. Isolation and Sequencing of a cDNA Coding for the Human DF3 Breast Carcinoma-Associated Antigen. *PNAS* 85:2320-2323 (1988).

- 5 Slingluff, C. L., Jr., G. R. Petroni, G. V. Yamshchikov, D. L. Barnd, S. Eastham, H. Galavotti, J. W. Patterson, D. H. Deacon, S. Hibbitts, D. Teates, P. Y. Neese, W. W. Grosh, K. A. Chianese-Bullock, E. M. Woodson, C. J. Wiernasz, P. Merrill, J. Gibson, M. Ross, and V. H. Engelhard. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J. Clin. Oncol.* 21:4016. (2003)
- Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C, Paschen A, Rammensee HG, and Schadendorf D. Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* 87:399-404 (2000).
- 10 Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, and Yachi A. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J. Immunol.* 153:2102-2109 (1994).
- Takayama H, Larochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, and Merlino G. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:701-706 (1997).
- 15 Takayama H, LaRoche WJ, Anver M, Bockman DE, and Merlino G. Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *PNAS* 93:5866-5871 (1996).
- Teofili L, Di Febo AL, Pierconti F, Maggiano N, Bendandi M, Rutella S, Cingolani A, Di RN, Musto P, Pileri S, Leone G, and Larocca LM. Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease. *Blood* 97:1063-1069 (2001).
- 20 Tripathi A, Dasgupta S, Roy A, Sengupta A, Roy B, Roychowdhury S, and Panda CK. Sequential deletions in both arms of chromosome 9 are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22:289-297 (2003).
- Troussard X, vet-Loiseau H, Macro M, Mellerin MP, Malet M, Roussel M, and Sola B. Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. *Hematol. J.* 1:181-185 (2000).
- 25 Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, and Elliott BE. Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148:225-232 (1996).
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, and Kitamura N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373:702-705 (1995).
- 30 van d, V, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M, and Pals ST. Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J. Exp. Med.* 185:2121-2131 (1997).
- Vasef MA, Brynes RK, Sturm M, Bromley C, and Robinson RA. Expression of cyclin D1 in parathyroid carcinomas, adenomas, and hyperplasias: a paraffin immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* 12:412-416 (1999).
- 35 Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, and Stevanovic S. Cutting Edge: Predetermined Avidity of Human CD8 T-cells Expanded on Calibrated MHC/Anti-CD28-Coated Microspheres. *J Immunol* 171:4974-4978 (2003).
- Wang FQ, So J, Reierstad S, and Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int. J Cancer* 114:19-31 (2005).
- Wang R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, and Bishop JM. Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 153:1023-1034 (2001).
- 40 Weber RG, Rieger J, Naumann U, Lichter P, and Weller M. Chromosomal imbalances associated with response to chemotherapy and cytotoxic cytokines in human malignant glioma cell lines. *Int. J. Cancer* 91:213-218 (2001).
- Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, and Rammensee HG. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-5827 (2002).
- 45 Wierecky J, Muller MR, Horger MS, Brugger W, Kanz L, and Brossart P. Induction of clinical and immunological responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccinations with peptide pulsed dendritic cells. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 23:2507 (2005).
- 50 Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, and Sissons JG. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol.* 70:7569-7579 (1996).

- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, and Beach D. Human D-type cyclin. *Cell* 65:691-699 (1991).
- Yewdell JW, Reits E, and Neefjes J. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3:952-961 (2003).
- 5 Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, and Neish AS. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J. Pathol.* 158:1639-1651 (2001).
- Zarnegar R and Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell Biol.* 129:1177-1180 (1995).
- 10 Zhou YT, Guy GR, and Low BC. BNIP-2 induces cell elongation and membrane protrusions by interacting with Cdc42 via a unique Cdc42-binding motif within its BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. *Exp. Cell Res.* 303:263-274 (2005).
- Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Mar;53(3):249-55.
- Schmittel A, Keilholz U, Thiel E, Scheibenbogen C. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay. *J Immunother.* 2000 May-Jun;23(3):289-95.
- 15 Wierecky J, Müller M, Horger M, Brugger W, Kanz L, Brossart P. Induction of clinical and immunological responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccinations with peptide pulsed dendritic cells. Abstract No. 2507 presented at the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology ASCO (2005).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Immatix biotechnologies GmbH
- <120> Péptidos asociados a tumores unidos a moléculas del antígeno de
 5 leucocito humano (HLA) de clase I o II y vacunas contra el cáncer
 relacionadas
- <130> FB19804ES
- <160> 11
- <170> PatentIn version 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 15 Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser
- 1 5 10 15
- <210> 2
- <211> 9
- 20 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
- Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
- 1 5
- 25 <210> 3
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 3
- Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
- 1 5
- <210> 4
- 35 <211> 9
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val

1 5

5 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

10 Leu Leu Gly Ala Thr Cys Met Phe Val

1 5

<210> 6

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val

1 5

20

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 7

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu

1 5

<210> 8

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile

35 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

5 Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val

1 5

<210> 10

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Leu Ala Ala Leu Pro His Ser Cys Leu

1 5

15

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

20 <400> 11

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val

1 5 10

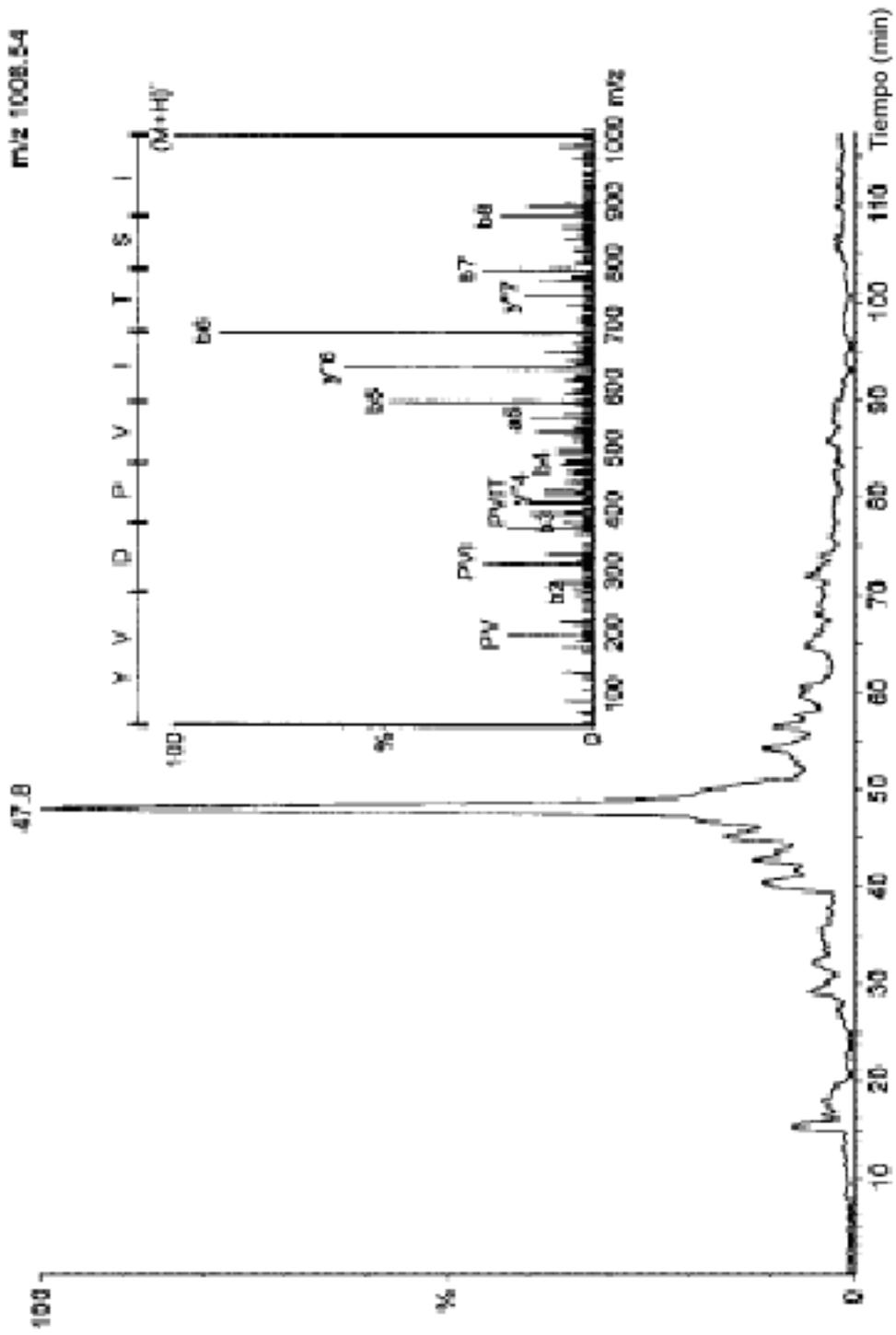
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido asociado a un tumor conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2 (VMAGDIYSV) o un péptido conforme a la secuencia SEQ ID n.º 2 en el que las cadenas laterales de uno o dos residuos de aminoácidos están alteradas y tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I HLA-A*02.
2. El péptido asociado a un tumor conforme a la reivindicación n.º 1, en el que hay enlaces no peptídicos.
3. Una proteína de fusión que comprende el péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 o 2 y que, en particular, comprende aminoácidos de extremo N de la cadena invariante (II) asociada al antígeno HLA-DR.
- 10 4. Un ácido nucleico que consta de una secuencia que codifica un péptido conforme a la reivindicación n.º 1.
5. El ácido nucleico conforme a la reivindicación n.º 4, el cual es DNA, cDNA, PNA, CNA, RNA, o combinaciones de los mismos.
6. Un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones n.º 4 o 5.
- 15 7. Un péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 a 3, un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones n.º 4 o 5 o un vector de expresión conforme a la reivindicación n.º 6 para su uso en medicina.
8. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones n.º 4 o 5 o un vector de expresión conforme a la reivindicación n.º 6.
9. La célula huésped conforme a la reivindicación n.º 8 que es una RCC recombinante o una célula Awells.
- 20 10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 a 3, un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones n.º 4 o 5 o un vector de expresión conforme a la reivindicación n.º 7, y un vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
- 25 11. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación n.º 10 que, además, comprende un péptido conforme a la secuencia SEQ ID n.º 1 o un péptido conforme a la secuencia SEQ ID n.º 1, en el que las cadenas laterales de uno o dos residuos de aminoácidos están alteradas y tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad humana (MHC) de clase II.
12. La composición farmacéutica conforme a las reivindicaciones n.º 10 u 11 que, además, comprende al menos un péptido adicional que comprende una secuencia conforme a cualquiera de las secuencias SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 11.
- 30 13. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 10 a 14 en la que al menos un péptido tiene enlaces no peptídicos.
14. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 que comprende péptidos que constan de secuencias de aminoácidos conformes a las secuencias SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 2 y SEQ ID n.º 3 a SEQ ID n.º 11.
- 35 15. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 10 a 14 que, además, comprende al menos un adyuvante apropiado.
16. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación n.º 15 en la que el mencionado adyuvante se selecciona del grupo de factores estimulantes de colonias como, por ejemplo, el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF).
- 40 17. El uso de una composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 10 a 16 para la preparación de una vacuna contra el cáncer.
18. Un método para producir un péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 a 3, método que comprende el cultivo de la célula huésped conforme a la reivindicación n.º 8 y la separación del péptido de dicha célula huésped o de su medio de cultivo.
- 45 19. El uso de un péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 a 3, de un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones n.º 4 o 5 o de un vector de expresión conforme a la reivindicación n.º 6 para la fabricación de un medicamento para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la dada en la reivindicación n.º 1.
- 50 20. Un método in vitro para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, método que comprende el contacto in vitro de los CTL con moléculas MHC de clase I cargadas de antígenos, expresadas en la superficie de una célula

presentadora de antígenos adecuada durante un periodo de tiempo suficiente para activar las mencionadas CTL de una manera específica de antígeno, donde el mencionado antígeno es un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 a 3.

- 5
21. El método conforme a la reivindicación n.º 20 en el que el antígeno se carga en moléculas MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada mediante el contacto de una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígenos.
22. El método conforme a la reivindicación n.º 20 en el que la célula presentadora de antígenos comprende un vector de expresión conforme a la reivindicación n.º 6.
- 10
23. Linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, producidos según el método conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 20 a 22, que reconocen de forma selectiva una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en la reivindicación n.º 1.
- 15
24. El uso de un péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 1 a 3, de un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones n.º 4 o 5, de un vector de expresión conforme a la reivindicación n.º 6 y de una composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones n.º 10 a 16 en la fabricación de un medicamento para matar en un paciente células de cáncer.
25. El uso conforme a la reivindicación n.º 24 en el que las mencionadas células de cáncer son células de cáncer renal.

Figura 1



Expresión del proto-oncogen c-Met

← RCC →

← Tejidos normales →

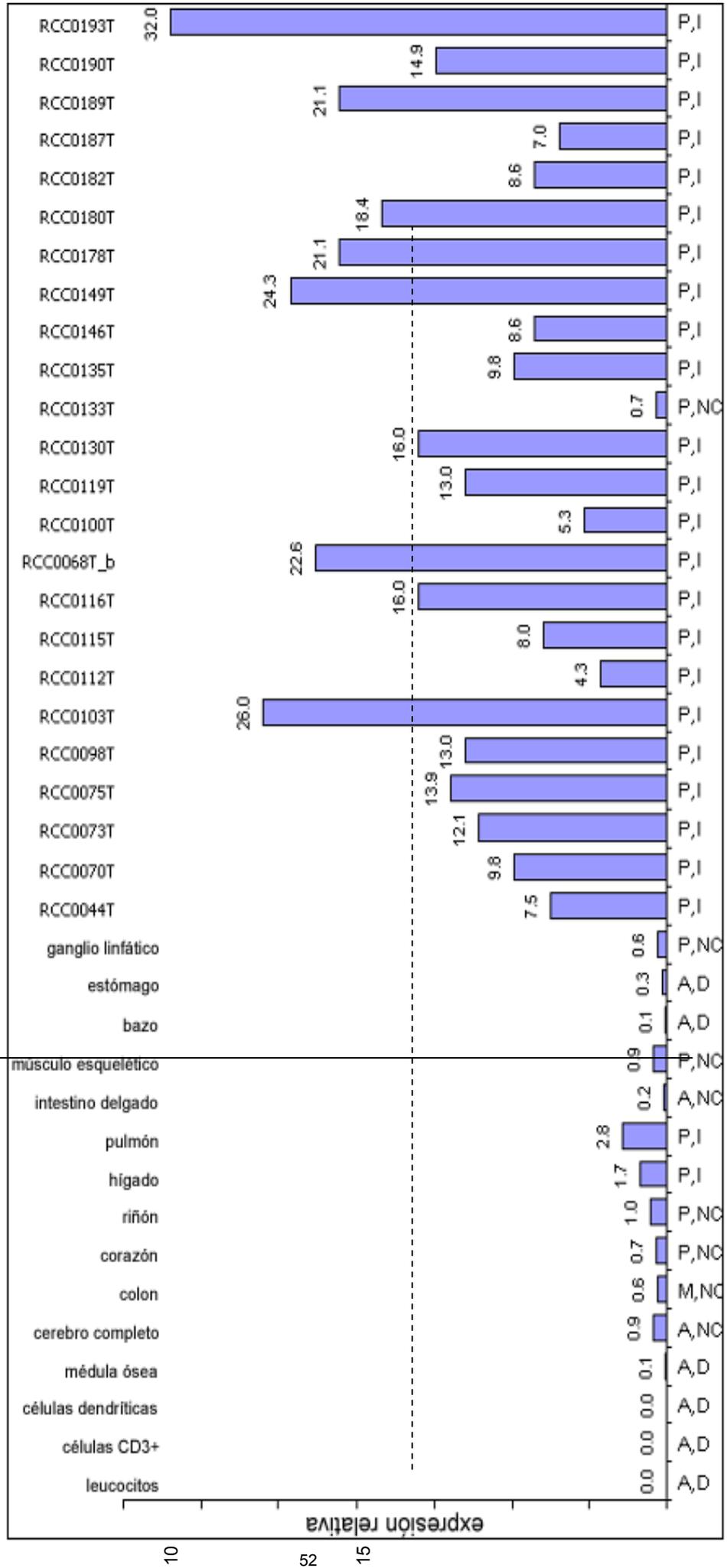


Figura 2

Figura 3

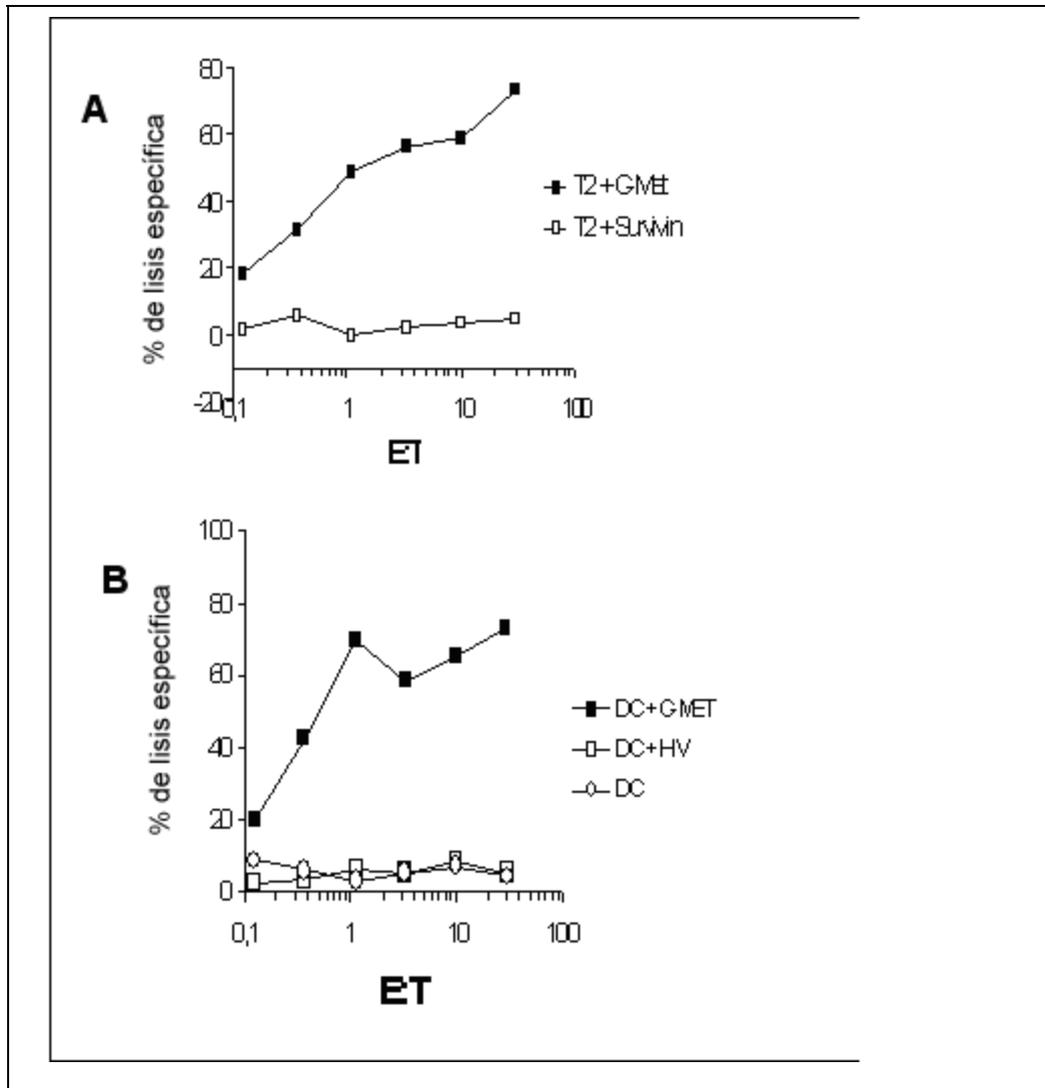


Figura 4

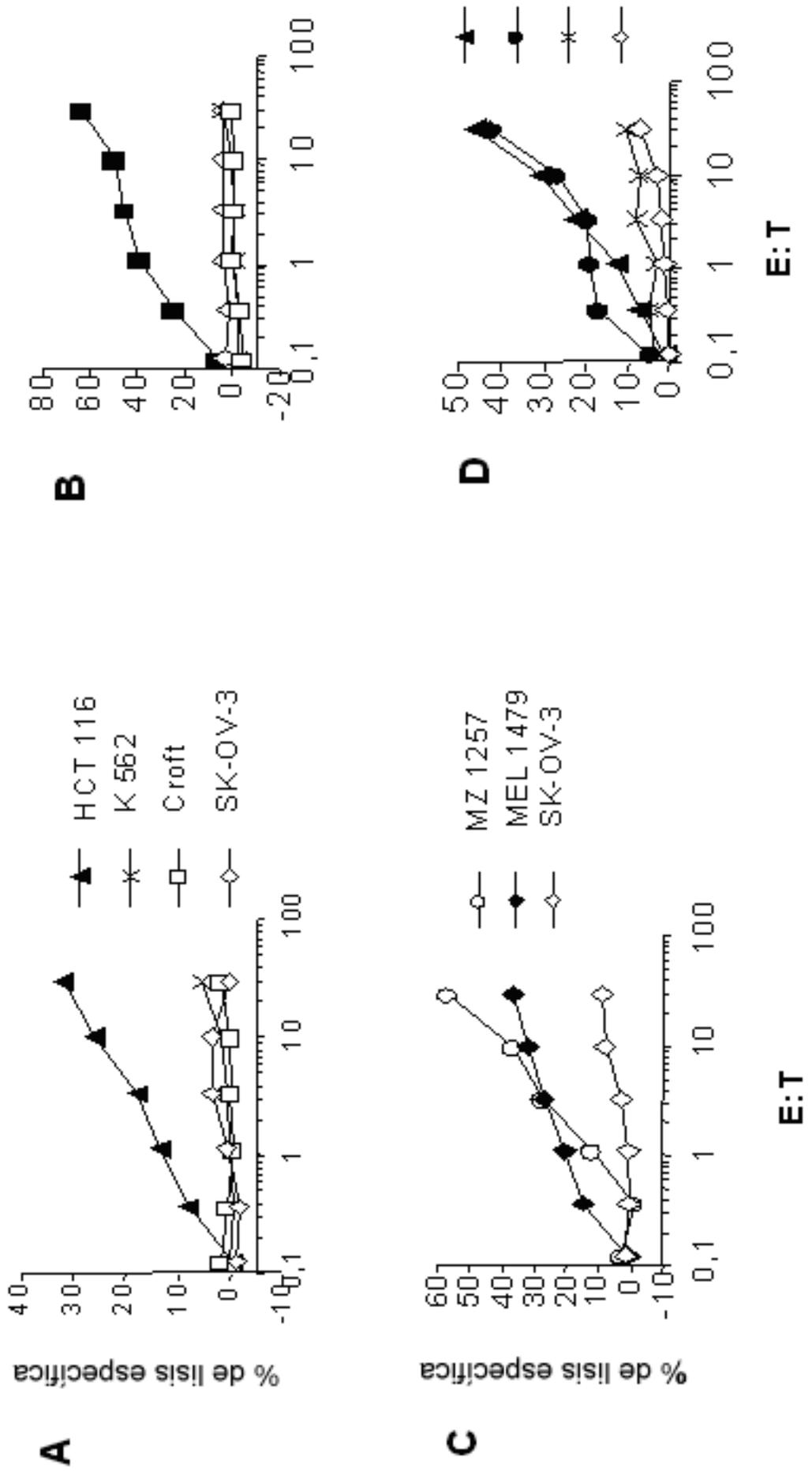


Figura 5

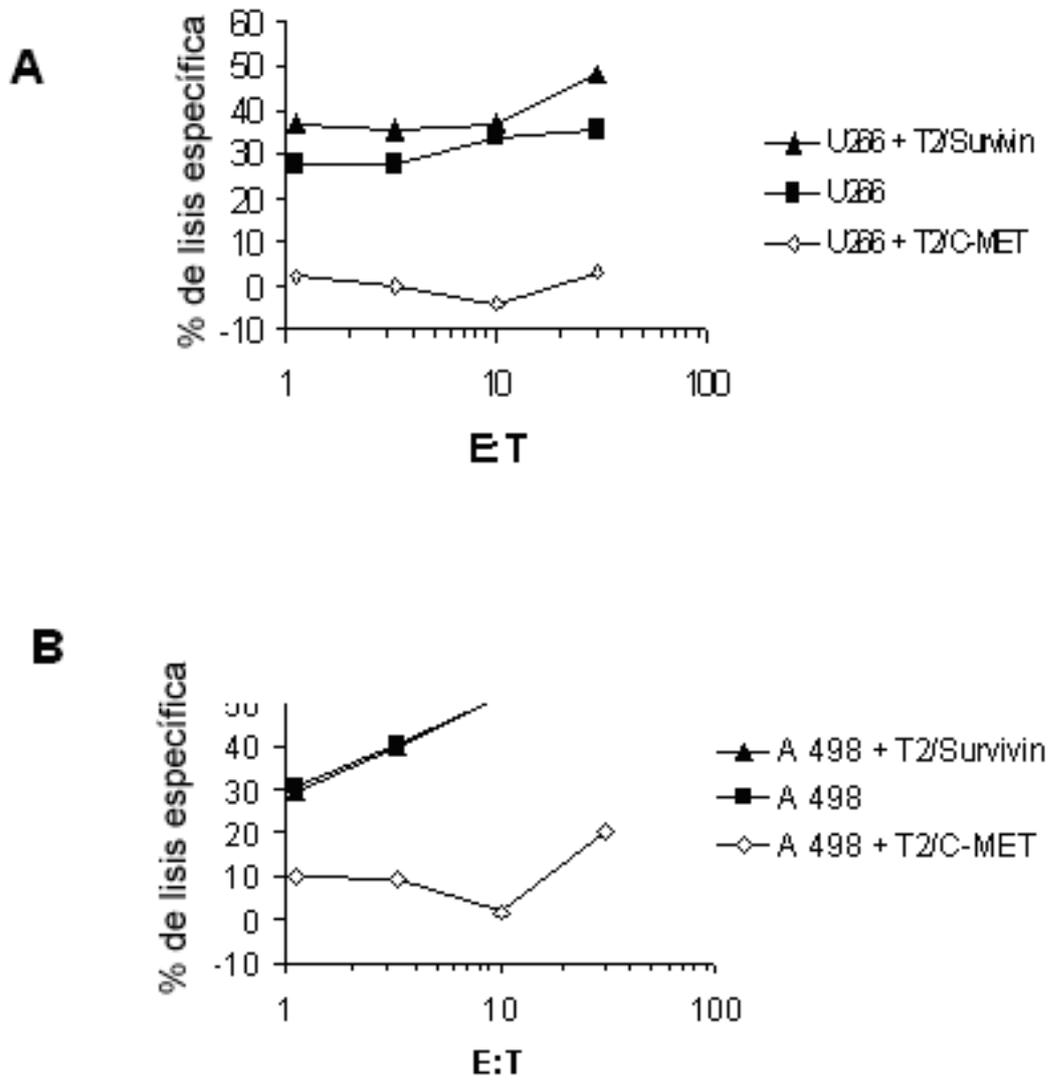


Figura 6

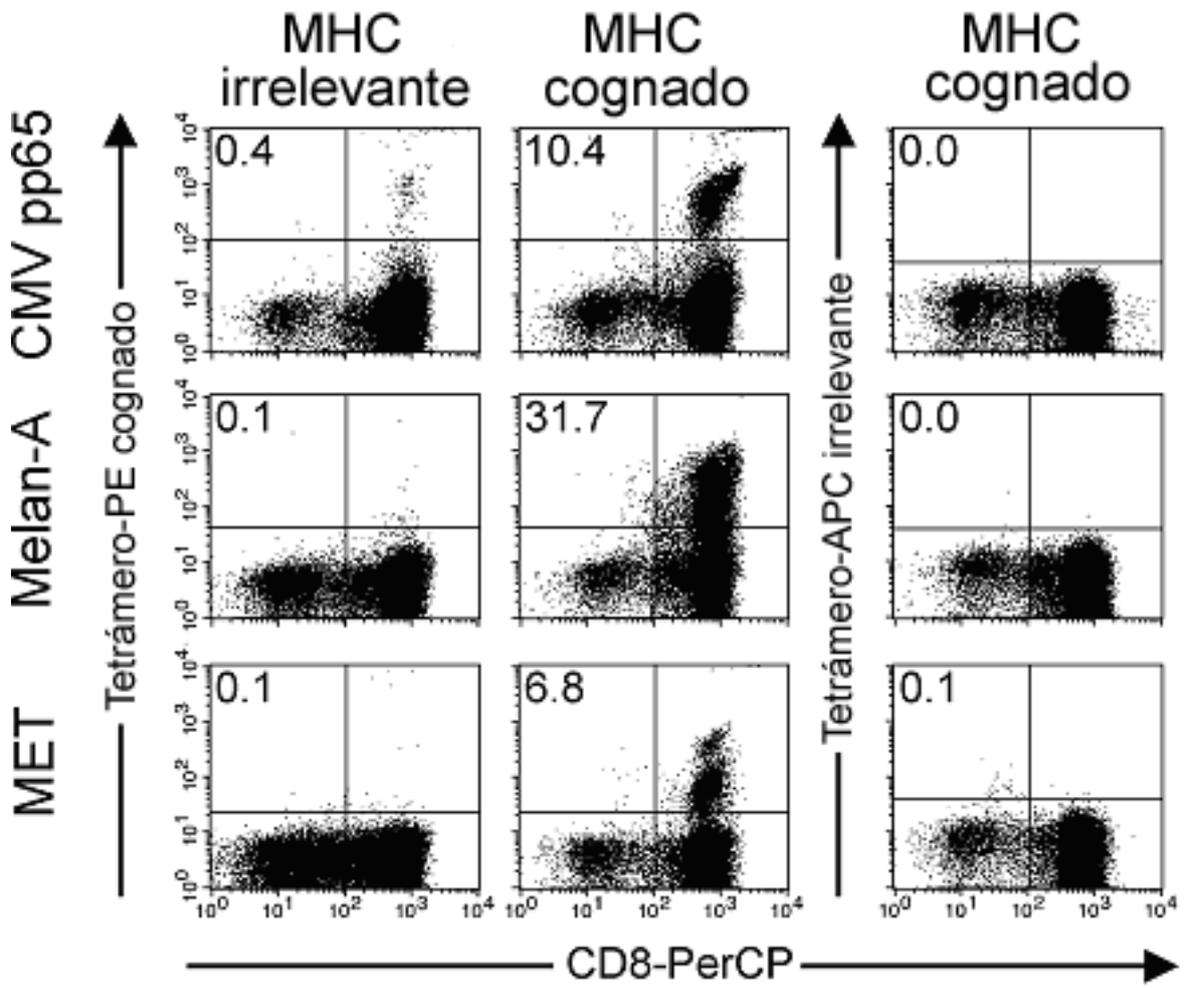


Figura 7

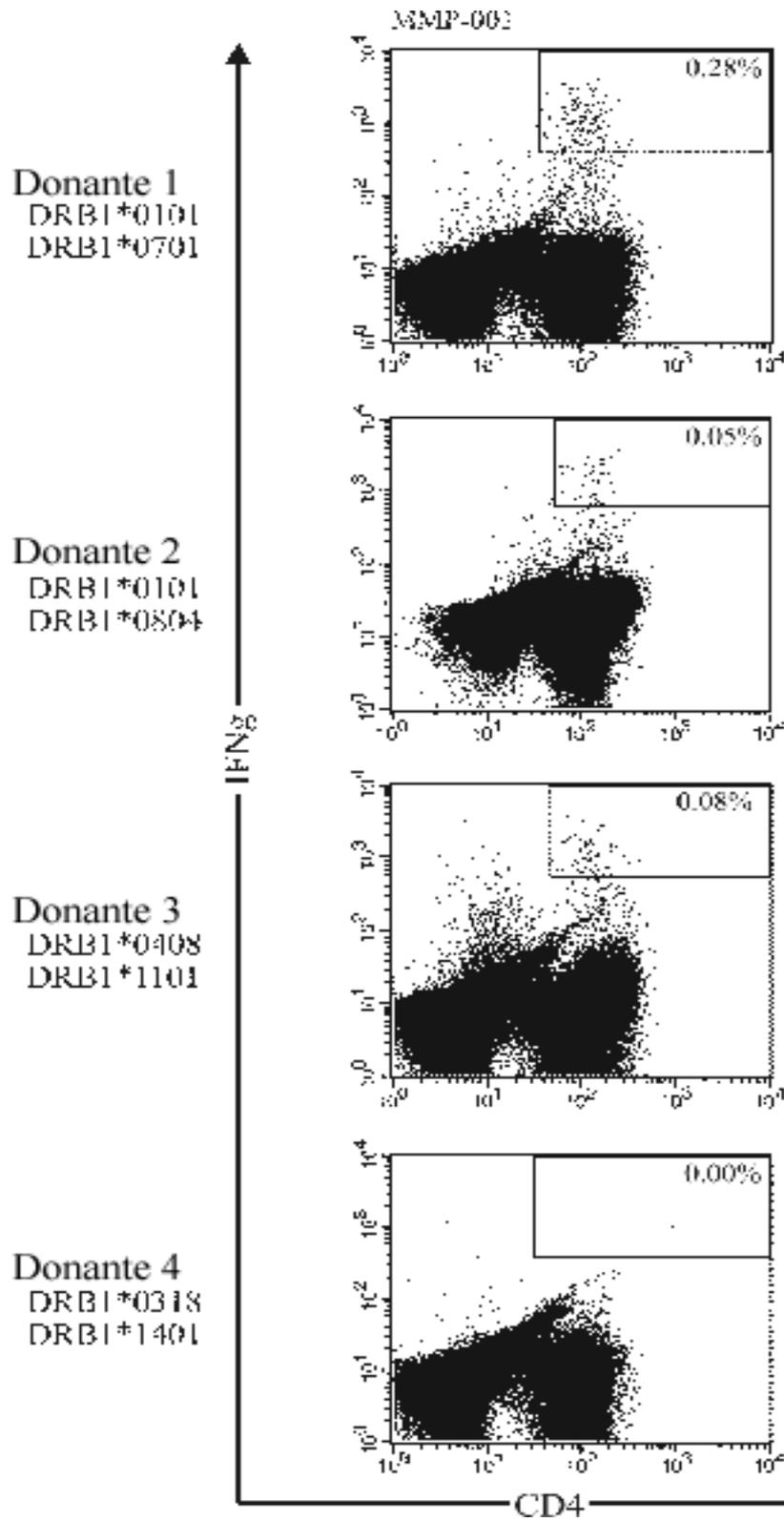


Figura 8A

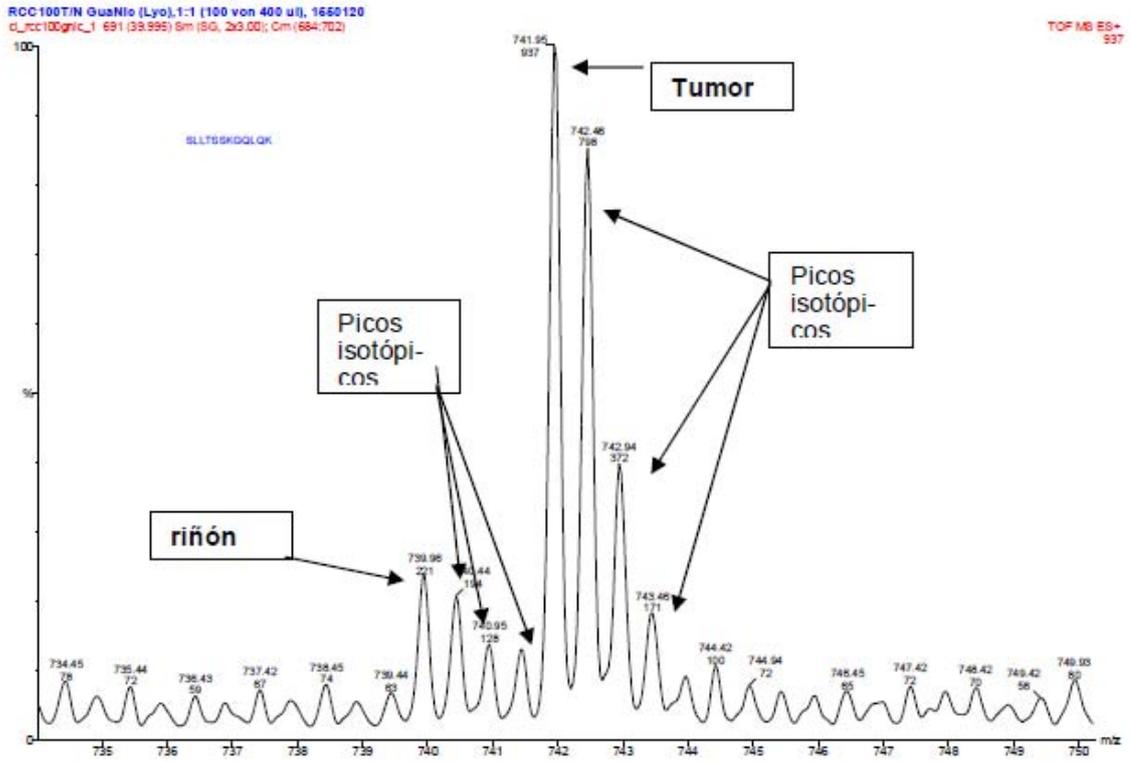


Figura 8B

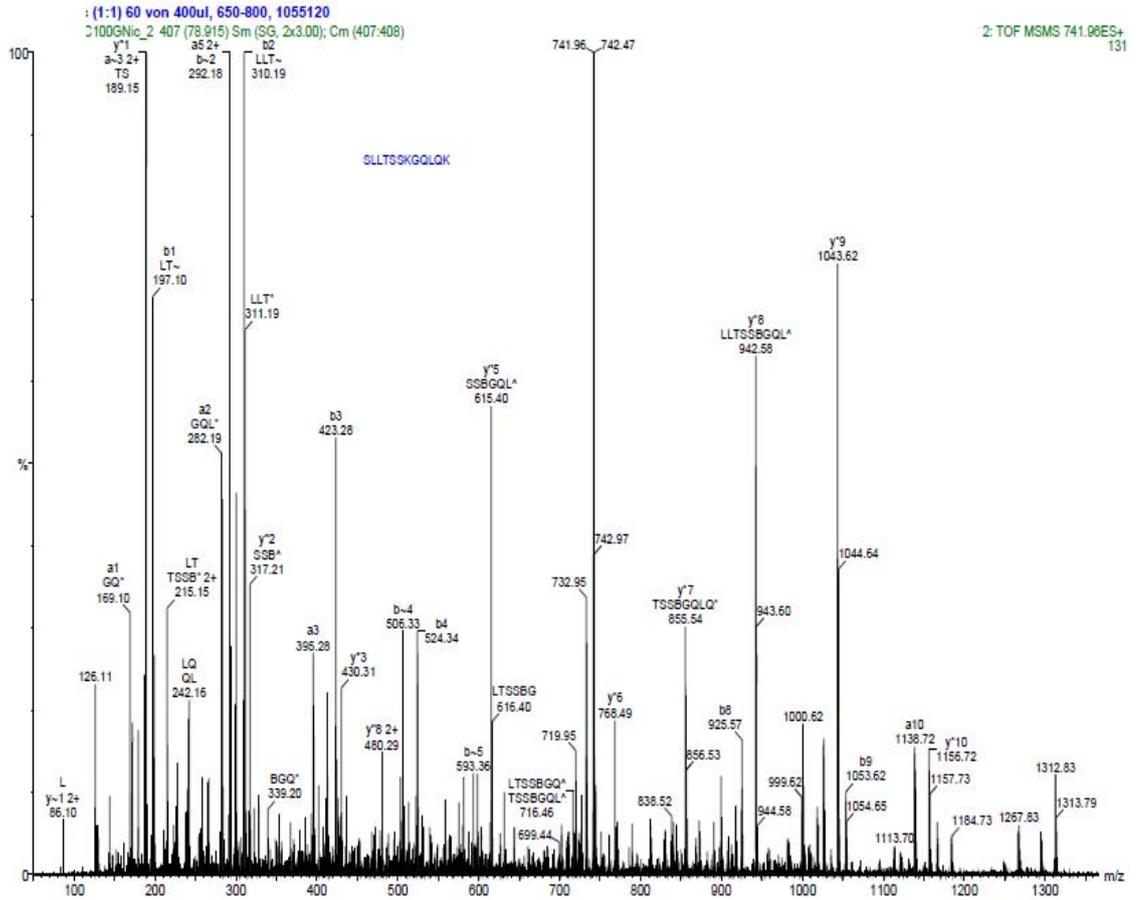
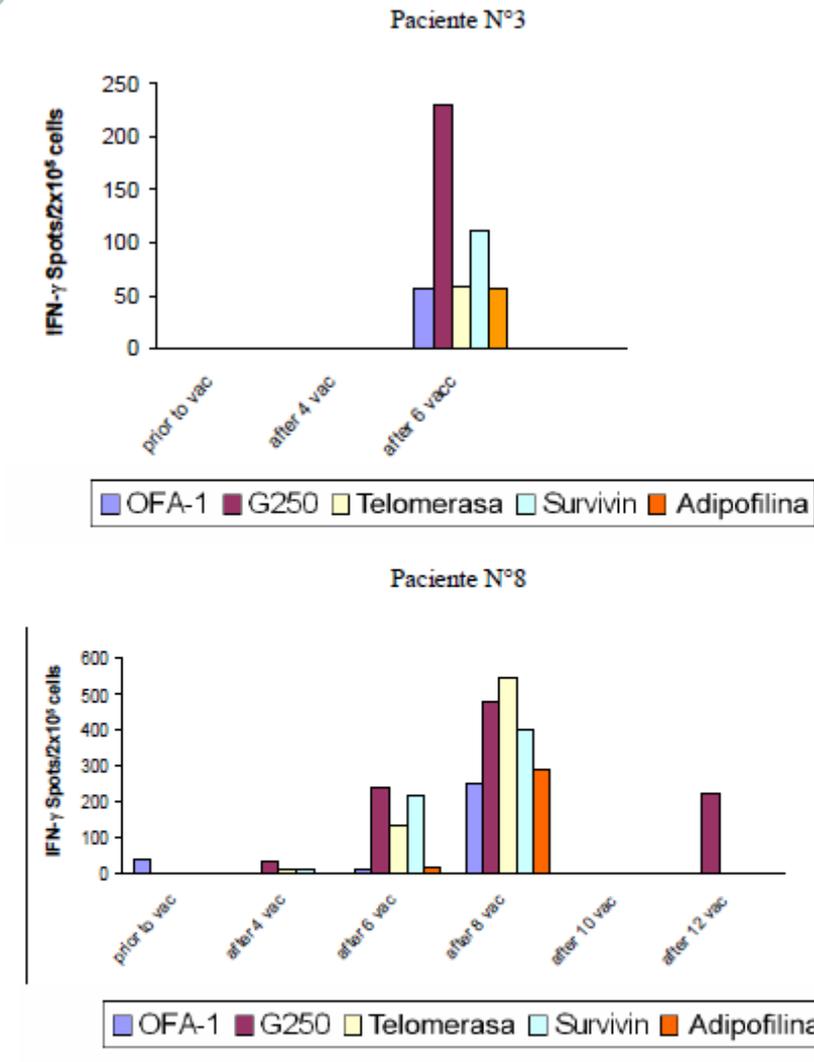


Figura 9



INF-g spots / 2x10⁵ cells

Puntos de INF-g / 2x10⁵ células

Prior to vac

antes de vacunaciones

After 4, 6, 8, 10, 12 vac

después de 4, 6, 8, 10, 12 vacunaciones

Figura 10

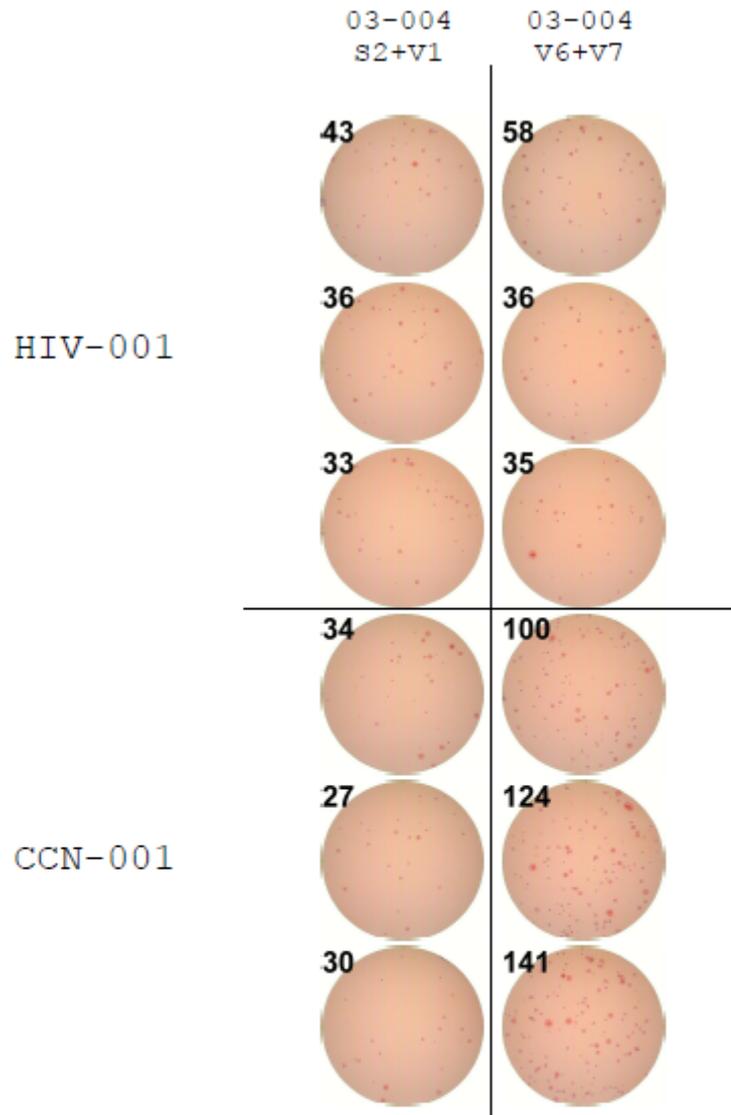


Figura 11A

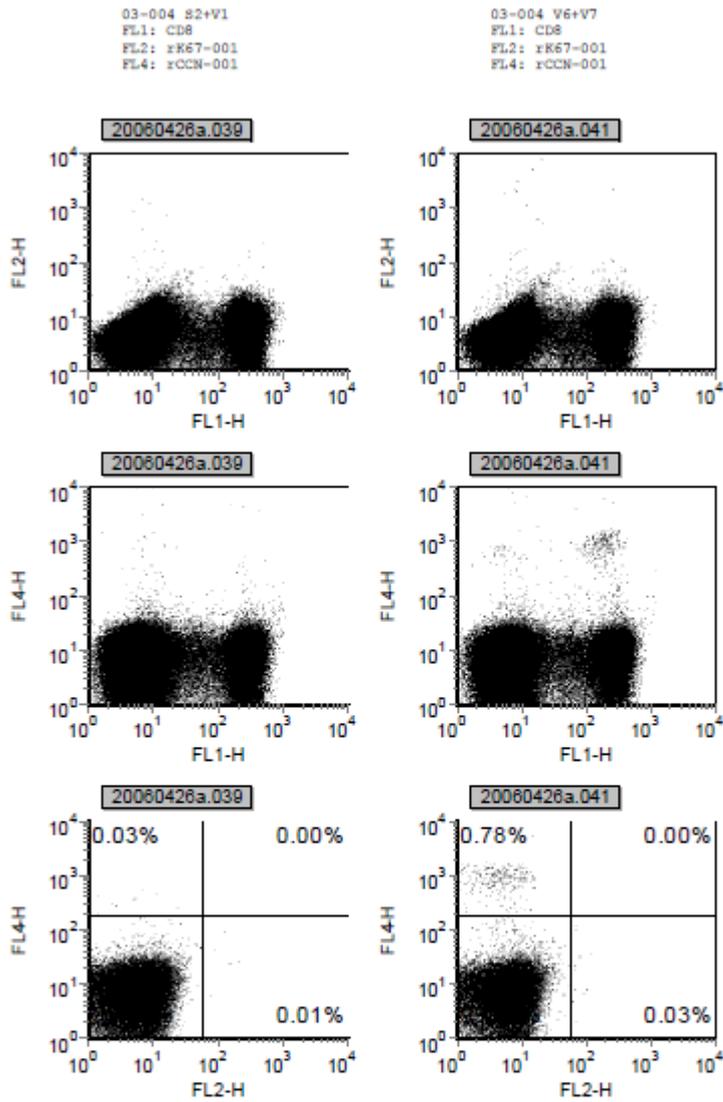


Figura 11B

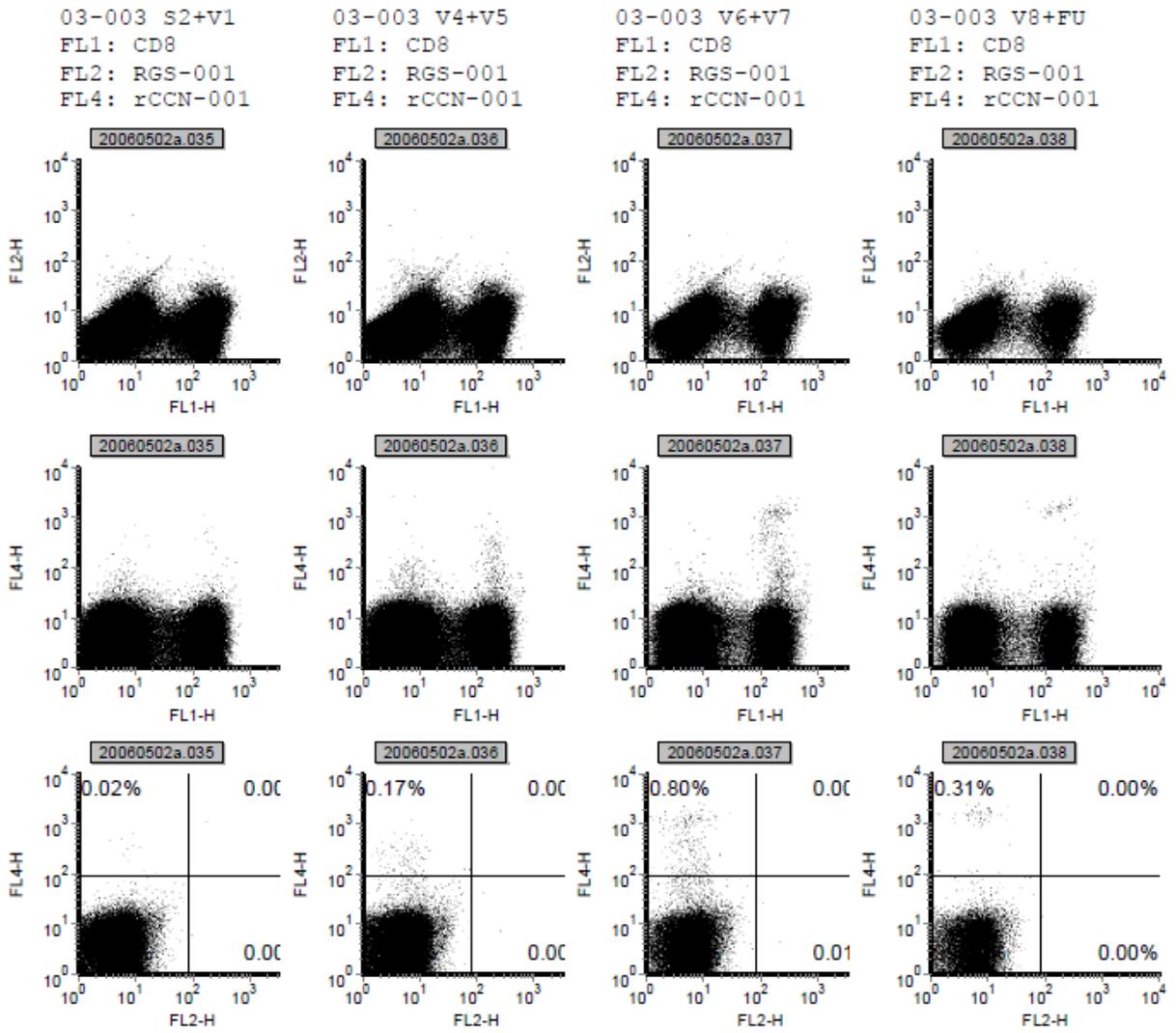
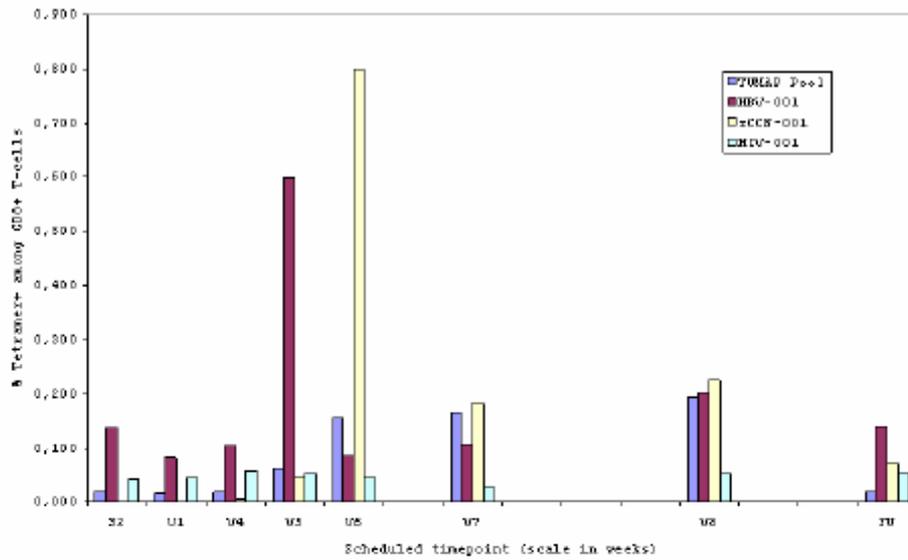


Figura 12

Paciente 05001



% tetramer among CD8+ T-cells → % de tetrámero entre los linfocitos CD8+ T
 Scheduled timepoint (scale in weeks) → puntos únicos de tiempo (eskala en semanas)