



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 643**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05009095 .0**

96 Fecha de presentación : **26.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1717245**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2006**

54

Título: **Identificador de un epítipo de linfocitos T presentado por el antígeno HLA-A2 y derivado de la proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal y usos de este.**

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

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

72 Inventor/es: **Zeis, Matthias**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 643 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

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, a diversas entidades tumorales entre las que se incluyen los tumores malignos hematológicos. La presente invención se refiere, además, a un epítipo peptídico de linfocitos T colaboradores asociado a tumores, solo o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, que actúa como ingrediente activo de vacunas que estimulan las respuestas inmunológicas contra los tumores. En particular, la presente invención se refiere a una novedosa secuencia peptídica derivada de moléculas HLA de clase I del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal (OFA/iLR), que puede ser utilizado en la composición de vacunas o de otros compuestos farmacéuticos para provocar respuestas inmunológicas antitumorales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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.

Elementos específicos de la respuesta inmunológica celular son capaces de reconocer y destruir específicamente células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) de poblaciones de células destructoras de tumores o de sangre periférica sugiere que estos linfocitos desempeñan un papel importante en la defensa inmunológica natural contra el cáncer (Cheever y col, «Annals N.Y. Acad. Sci.» 1993 690:101-112; Rosenberg SA. *Shedding light on immunotherapy for cancer*. «N Engl J Med.» 2004 Apr 1;350(14):1461-3.). En particular, los linfocitos T CD8⁺ (TCD8⁺), que reconocen péptidos que alojan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I de, normalmente, 8 a 10 residuos derivados de proteínas ubicadas en el núcleo o en el citosol o de proteínas ribosómicas defectuosas (DRIP), tienen un papel importante en esta respuesta. Las DRIP son una fuente esencial para los péptidos y constituyen productos de traducción incompleta en los ribosomas. Fueron descritas por primera vez por el grupo de trabajo de J. Yewdell (Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. «Nature». 2000 Apr 13;404(6779):770-4). Las moléculas MHC humanas también se designan antígenos de leucocito humano (HLA).

Existen dos clases principales de moléculas MHC, que pueden ser reconocidas por linfocitos T que alojan receptores de linfocitos T: las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de las células con un núcleo que presenta péptidos resultantes de la división proteolítica de proteínas endógenas y péptidos más largos. Las moléculas MHC de clase II se pueden encontrar en las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales como macrófagos, células dendríticas, en linfocitos B, en células endoteliales y en células alteradas de tumores y de estroma tumoral que, en circunstancias normales, no expresan moléculas MHC de clase II en sus superficies y presentan proteínas exógenas que son absorbidas por las APC durante la endocitosis o que entran en el compartimiento de las moléculas MHC de clase II (MIIC) y, posteriormente, son procesadas y cargadas en los complejos MHC de clase II. Los complejos de péptidos y el MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ positivos. Los complejos de péptidos y el MHC de clase II son reconocidos por linfocitos T colaboradores CD4⁺ (descritos de forma general en «Immunobiology» por Charles A., Jr. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shlomchik).

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 que aglutinan MHC de clase I suelen tener de 8 a 10 residuos y contienen dos residuos conservados (*anchor*) en su secuencia, que interactúan con el surco de fijación correspondiente de la molécula MHC (véase el segundo listado publicado en «Immunogenetics» [Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: *database for MHC ligands and peptide motifs*. «Immunogenetics». 1999 Nov; 50(3-4): 213-9]).

Existen numerosos ejemplos de TCD8⁺, tanto humanos como de ratones, que reconocen específicamente células tumorales y desarrollan una actividad terapéutica tras el traslado adoptivo, induciendo, en algunos casos, la remisión completa. Sin embargo, a pesar del potencial de los linfocitos T para erradicar tumores, es obvio, teniendo en cuenta el crecimiento progresivo de la mayoría de los cánceres, que muchos tumores no son reconocidos por TCD8⁺ *in vivo*. A pesar de que se ha encontrado una variedad de tumores inmunógenos, ha sido difícil demostrar la estimulación de una respuesta inmune antitumoral efectiva: investigaciones recientes muestran que las inmunizaciones pueden llevar a fuertes respuestas de los linfocitos T contra péptidos asociados a tumores (Speiser DE, Lienard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P. *Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909*. «J Clin Invest». 2005 Mar;115(3):739-46. Schag K, Schmidt SM, Muller MR, Weinschenk T, Appel S, Weck MM, Grunebach F, Stevanovic S, Rammensee HG, Brossart P. *Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes*. «Clin Cancer Res.» 2004 Jun 1;10(11):3658-66.).

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, es decir, por sus epítipos, pueden ser moléculas derivadas de cualquier clase de proteína, como enzimas, receptores, factores de transcripción,

etc. En la página www.syfpeithi.org se incluye una lista completa de péptidos unidos a o eluidos de moléculas MHC de clase I o clase II. Además, los antígenos asociados a tumores, por ejemplo, también pueden estar presentes solamente en células tumorales, como productos de genes mutados, por ejemplo. Buenos ejemplos de ello son los ligandos MHC de clase I, que actúan como epítomos de linfocitos T de K-ras, BCR-abl y p53 mutado. Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son las estructuras de tejidos específicos, como los antígenos CT (testículo canceroso) que se desarrollan en distintos tipos de tumor y en tejido sano del testículo. Otros péptidos asociados a tumores y unidos a moléculas MHC provienen de los genes, que se expresan en un número mayor de copias en las células cancerosas en comparación con células sanas del mismo órgano o tejido y de otros tejidos. Puede verse un ejemplo con el gen c-met en Schag K, Schmidt SM, Muller MR, Weinschenk T, Appel S, Weck MM, Grunebach F, Stevanovic S, Rammensee HG, Brossart P. *Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes.* «Clin Cancer Res.» 2004 Jun 1;10(11):3658-66. Otros péptidos asociados a tumores provienen de antígenos que se hallan en células tumorales retenidas y no secretadas (por ejemplo, proteínas de la familia genética de la mucina). Otras fuentes pueden ser las transcripciones aberrantes (sistema de lectura), péptidos de los sitios de unión de las fusiones proteína-proteína postraduccional. Puede verse una lista completa de los antígenos asociados a tumores que se han descrito en la literatura científica en la página www.cancerimmunity.org.

Se han identificado diversos antígenos asociados a tumores. Además, se está empleando mucho esfuerzo investigador para identificar más antígenos asociados a tumores. Algunos grupos de antígenos asociados a tumores, también llamados por los expertos antígenos de tumores específicos, 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 como los 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 en el cáncer renal, por ejemplo, son analizados en Linehan WM, Walther MM, Zbar B. *The genetic basis of cancer of the kidney.* «J Urol». 2003 Dec;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. Un análisis más general de las causas genéticas del cáncer humano puede encontrarse en *The Genetic Basis of Human Cancer*, por Bert Vogelstein, Kenneth W. Kinzler, 2002). 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 ir acumulando mutaciones, con el resultado de una regulación hacia arriba de la expresión de estos productos genéticos y transformándolos, por tanto, en oncógenos (McCarty y col. «Cancer Research» 1998 15:58 2601-5; Disis y col. Ciba Found. Symp. 1994 187:198-211). Estas proteínas mutantes pueden ser diana de una respuesta inmune a un tumor específico en muchos tipos de cáncer.

El receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal (OFA/iLR) aparece expresado en muchos tipos de tumores humanos, incluyendo malignidades hematopoyéticas (Rohrer JW, Barsoum AL, Coggin JH Jr. *The development of a new universal tumor rejection antigen expressed on human and rodent cancers for vaccination, prevention of cancer, and anti-tumor therapy.* «Mod Asp Immunobiol». 2001; 5: 191-195. Barsoum AL, Rohrer JW, Coggin JH. *37kDa oncofoetal antigen is an autoimmunogenic homologue of the 37kDa laminin receptor precursor.* «Cell Mol Biol Lett.» 2000; 19: 5535-5542. Castronovo V. *Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis.* «Invasion Metas». 1993; 13: 1-30. Coggin JH Jr, Barsoum, AL, Rohrer JW. *Tumors express both unique TSTA and crossprotective 44 kDa oncofetal antigen.* «Immunol Today». 1998; 19, 405-408. Coggin JH Jr, Barsoum AL, Rohrer JW. *37 kilo Dalton oncofetal antigen protein and immature laminin receptor protein are identical, universal T-cell inducing immunogens on primary rodent and human cancers.* «Anticancer Res.» 1999; 19, 5535-5542), pero no está presente en tejidos diferenciados adultos normales. El OFA/iLR puede ser reconocido específicamente por los linfocitos T y B, lo que le convierte en una molécula atractiva en las investigaciones de vacunas de diversas entidades cancerígenas. Al utilizar células dendríticas (CD) que hayan sufrido una transfección con RNA de codificación de OFA/iLR, las respuestas de los linfocitos T a tumores específicos contra las células hematopoyéticas podrían ser generadas tanto *in vitro* como *in vivo* (Siegel S, Wagner A, Kabelitz D y col. Coggin, J.Jr., Barsoum, A., Rohrer, J., Schmitz, N., Zeis, M. *Induction of cytotoxic T cell responses against the oncofoetal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematological malignancies.* «Blood» 2003; 102, 4416-4423.).

La patente US 6,753,314 describe un complejo de proteínas purificadas que comprende un primer y un segundo polipéptido, en el que dicho complejo comprende las secuencias de aminoácidos de un primer polipéptido (SMI1, SEQ ID NO: 359), y un segundo polipéptido (BAS1, SEQ ID NO: 518), denominado ProPair 267a-267b.

La patente US 4,861,710 descubre un clon que comprende un clon de ADNc recombinante para codificar el receptor de laminina de la superficie de la célula, así como las sondas correspondientes.

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 ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o en pequeñas cantidades. También es deseable que el antígeno correspondiente no sólo esté presente en un tipo de tumor, sino que también aparezca en concentraciones altas (por ejemplo, número de copias por célula). La presencia de epítomos es esencial en la secuencia de aminoácidos del antígeno, 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*.

Hasta ahora, se han descrito numerosas estrategias para encauzar antígenos hacia la vía de procesamiento de clase 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). Otras estrategias utilizan las proteínas de fusión, que contienen secuencias diana lisosomales. Expresadas en APC, estas proteínas de fusión encauzan a los antígenos hacia el compartimiento de procesamiento de clase II (Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J. & Bonifacio, J. S. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 351-369, Rodríguez, F., Harkins, S., Redwine, J. M., de Pereda, J. M. & Whitton, J. L. (2001) «J. Virol.» **75**, 10421-10430). También se han desarrollado formulaciones liposomales especiales para la liberación de péptidos y de otros ingredientes farmacéuticos activos hacia las pAPC. (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. *Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres.* «J Immunol.» 2003 Nov 15;171(10):4974-8.). Otro método posible es la carga externa de moléculas MHC *in vitro* o *in vivo*. En este entorno, las APC son incubadas con un exceso de péptidos en el medio de cultivo celular, lo que resulta en una competencia en la unión con moléculas MHC en la superficie de la APC.

El documento WO 2004/012681 A, en la tabla 15 del presente documento, recoge los epítotos iLR, pero no la ID de SEQ n.º 1 (iLR-AAs 59-68). Del mismo modo, los documentos WO 2002/078524 y WO 2004/030615 publican los polipéptidos relacionados con MHC o con TAT que cuentan con la ID de SEQ n.º 1.

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 epítotos de los 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 complejos MHC o péptidos asociados a tumores en sus superficies. De esta forma, los epítotos 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.

La tarea principal en el desarrollo de una vacuna tumoral es, por tanto, la identificación y caracterización de novedosos antígenos asociados a tumores y epítotos inmunógenos de linfocitos T colaboradores derivados de ellos que puedan ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD4⁺. Es, por tanto, objetivo de la presente invención, proporcionar secuencias de aminoácidos novedosas para los péptidos que tengan la habilidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I y desencadenar una respuesta de los linfocitos T contra las células que porten en sus superficies péptidos en conjunción con moléculas MHC.

De acuerdo con la presente invención, este objetivo se cumple proporcionando un péptido asociado a un tumor, seleccionado del grupo que consta de a) un péptido que muestra una longitud total de 10 aminoácidos, que constan de una secuencia según la ID de SEQ n.º 1 (LLAARAIVAI), o b) un péptido mimético retroinverso de éste, en donde el péptido tiene la habilidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, que comprende, sin limitarse a él, el alelo del HLA, expresado con mayor frecuencia en poblaciones caucásicas, HLA-A2 (incluyendo subtipos de HLA-A2 como el HLA-A*0201).

La presente invención describe dos novedosas secuencias peptídicas derivadas de moléculas HLA de clase I de la proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal, que puede ser usada en composiciones de vacunas para provocar respuestas inmunes anti-tumorales. Las novedosas secuencias peptídicas han sido identificadas por medio de un enfoque combinado nuevo y de aplicación general para la identificación de ligandos desconocidos de clase I de HLA, procesados de forma natural, de antígenos definidos –asociados a tumores, por ejemplo. Por lo tanto, los inventores identificaron dos epítotos de linfocitos T específicos del HLA-A*0201 bien diferenciados, derivados de la proteína del OFA/iLR y capaces de inducir una reacción específica de los linfocitos T contra células tumorales humanas, incluyendo, sin limitarse a ellas, diversas malignidades hematológicas.

Un primer aspecto de la invención proporciona un péptido según la ID de SEQ n.º 1. El péptido no es el polipéptido humano intacto del que se deriva la secuencia de aminoácidos (a saber, la proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal [OFA/iLR]; para el número de registro, véase la tabla 1 adjunta más abajo).

Tal y como se describe más abajo, los péptidos que se describen han sido identificados como presentados por células portadoras de MHC de clase I. Por tanto, ambos péptidos, así como otros péptidos que contengan la secuencia (a saber, péptidos derivados), provocarán 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). Cualquier experto en la materia conoce bien los métodos que se pueden aplicar para determinar el alcance de una respuesta inducida por un péptido individual y, en particular, los ejemplos contenidos aquí y en la literatura sobre la materia.

«Consistir esencialmente en» significa que un péptido de la presente invención contiene, además de la secuencia según cualquiera de la ID de SEQ n.º 1, cadenas de aminoácidos adicionales localizadas en el N-terminal o el C-terminal que no necesariamente forman parte del péptido que actúa como secuencia central del péptido que comprende el motivo de unión y como epítoto inmunógeno del linfocito T colaborador. Sin embargo, estas cadenas pueden ser importantes para proporcionar una introducción eficiente en las células del péptido de la presente invención.

5 Por «variante» de la secuencia de aminoácidos dada, los inventores quieren 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 consista en la secuencia dada de aminoácidos. Por ejemplo, un péptido podría modificarse de forma que al menos mantuviera, o incluso mejorara, la habilidad para interactuar con y aglutinar una molécula MHC apropiada, como la HLA-A y de forma que al menos mantuviera, o incluso mejorara, la habilidad para generar CTL activado que reconozca y mate células que expresan un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos como la definida en los aspectos de la invención. Como puede derivarse de la base de datos aquí descrita, determinadas posiciones de péptidos aglutinantes de HLA-A son residuos conservados que forman una secuencia central que se ajusta al motivo de unión del surco de unión del HLA.

10 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 debilite la unión con el MHC pertinente.

15 Es sabido que los péptidos presentadores de MHC de clase II están compuestos de una «secuencia central» con un aminoácido de HLA específico 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 presentador de MHC de clase II *in vivo* preferido en la presente invención exhibe una longitud de entre 9 y 30 aminoácidos. Este péptido puede ser usado tanto directamente, para cargar moléculas MHC de clase II, como clonado en vectores según la descripción que se detalla más abajo. Teniendo en cuenta 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 de la invención pueden ser de cualquier tamaño. Normalmente, serán menores de 100.000 en peso molecular. Preferentemente, menores de 50.000 y, más preferentemente, menores de 10.000. Normalmente, cerca de 5.000. En cuanto al número de residuos de aminoácidos, los péptidos de la invención podrán tener menos de 1.000. Preferentemente, menos de 500 residuos y, más preferentemente, menos de 100.

20 En otro aspecto de la presente invención y de forma parecida a la situación explicada anteriormente para las moléculas MHC de clase II, los péptidos --aunque estén relacionados, fundamentalmente, con MHC de clase I-- pueden ser usados para desencadenar una respuesta específica de MHC de clase II, ya que los ILR1 y ILR2 pueden exhibir secuencias simultáneas centrales o parciales de moléculas HLA de clase II (uniéndose a alelos concretos de HLA de clase II, tal y como se muestra en las siguientes tablas). Como se indicó anteriormente, las extensiones N- y/o C-terminal pueden tener una longitud de entre 1 y 10 aminoácidos, respectivamente. Estos péptidos pueden ser usados tanto directamente, para cargar moléculas MHC de clase II, como clonados en vectores según la descripción que se detalla más abajo. Teniendo en cuenta 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. Normalmente, serán menores de 100.000 en peso molecular. Preferentemente, menores de 50.000 y, más preferentemente, menores de 10.000. Normalmente, cerca de 5.000. En cuanto al número de residuos de aminoácidos, los péptidos podrán tener menos de 1.000. Preferentemente, menos de 500 residuos y, más preferentemente, menos de 100.

35 40 Tabla A: «Secuencias centrales» de ILR1 con un motivo de aminoácido específico de HLA para las moléculas HLA de clase II. Los aminoácidos de enlace aparecen en cursiva. Las predicciones fueron realizadas por los programas informáticos PAPProC (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) and SYFPEITHY (<http://www.syfpeithi.de>).

HLA-DRB1*0101 15 - mers

	-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
•	R T W E K L L L A A R A I V A	26
	T W E K L L L A A R A I V A I	26
	R A I V A I E N P A D V S V I	25
	E K L L L A A R A I V A I E N	24
	K R T W E K L L L A A R A I V	20

HLA-DRB1*0301 (DR17) 15 - mers

	-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
--	-------------------------------------	---------------

W E K L L L A A R A I V A I E	20
A R A I V A I E N P A D V S V	19
I N L K R T W E K L L L A A R	18

HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4) 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
W E K L L L A A R A I V A I E	26
E K L L L A A R A I V A I E N	20
A R A I V A I E N P A D V S V	20
R A I V A I E N P A D V S V I	20

HLA-DRB1*0701 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
W E K L L L A A R A I V A I E	22
A R A I V A I E N P A D V S V	20
E K L L L A A R A I V A I E N	18

HLA-DRB1*1501 (DR2b) 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
E K L L L A A R A I V A I E N	24
I N L K R T W E K L L L A A R	20
K L L L A A R A I V A I E N P	20
R A I V A I E N P A D V S V I	18

- 5 Tabla B: «Secuencias centrales» de ILR2 con un motivo de aminoácido específico de HLA para las moléculas HLA de clase II. Los aminoácidos de enlace aparecen en cursiva. Las predicciones fueron realizadas por los programas informáticos PAProC (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) and SYFPEITHY (<http://www.syfpeithi.de>).

HLA-DRB1*0101 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 .7 .8 .9 +1 +2 +3	escala
E A S Y V N L P T I A L C N T	33
L P T I A L C N T D S P L R Y	23

HLA-DRB1*0301 (DR17) 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
I A L C N T D S P L R Y V D I	20

HLA-DRB1*0401 (DR4Dw4) 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
E A S Y V N L P T I A L C N T	28
Y V N L P T I A L C N T D S P	20
N L P T I A L C N T D S P L R	18

HLA-DRB1*0701 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
E A S Y V N L P T I A L C N T	26
T I A L C N T D S P L R Y V D	24

HLA-DRB1*1501 (DR2b) 15 - mers

-3 -2 -1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 +1 +2 +3	escala
T D S P L R Y V D I A I P C N	20
L P T I A L C N T D S P L R Y	18
T I A L C N T D S P L R Y V D	18

- 5 Si un péptido 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 no afecten de forma considerable la habilidad del péptido a unirse específicamente al surco de unión de la molécula MHC o a presentar al péptido al CTL. Sin embargo, tal y como se indicó anteriormente, se comprenderá 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.

- 10 En el concepto de «péptido» los inventores no sólo incluyen moléculas de residuos de aminoácidos unidas por enlaces covalentes (-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 procedimiento implica la formación de pseudopéptidos que contengan modificaciones en el esqueleto y no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y col. (1997) demuestran que estos pseudopéptidos son útiles, por lo menos en las respuestas de los linfocitos T colaboradores y de MHC de clase II. 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.

- 20 Normalmente, el péptido de la invención se caracteriza porque, si aparece expresado en una célula presentadora de antígenos, puede ser procesada de forma que se produzca un fragmento capaz de unirse a una molécula MHC adecuada y pueda ser presentada por la célula apropiada y provocar una respuesta adecuada. Se comprenderá que el fragmento producido a partir del péptido pueda ser también un péptido de la invención. Convenientemente, el péptido de la invención contiene una porción que incluye la secuencia de aminoácidos dada, o una porción o variante de la misma, y otra porción añadida 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. Por lo tanto, en una modalidad, el péptido de la invención es una proteína humana truncada o una proteína de fusión de un fragmento proteico y otra porción de polipéptido, siempre que la porción humana incluya una o más secuencias de aminoácidos de invención.

5 En una modalidad especialmente preferida, el péptido de la invención incluye la secuencia de aminoácidos de la invención y, al menos, un epítipo de linfocito T más, que es capaz de facilitar la producción de una respuesta del linfocito T dirigida al tipo de tumor expresado por 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.

10 Se comprenderá que, en algunas aplicaciones, los péptidos de la invención pueden usarse directamente (es decir, no son producidos por expresión de un polinucleótido en una célula del paciente o en una célula dada al paciente).

Se prefiere que los péptidos de la invención puedan unirse al HLA-A2. Se prefiere particularmente que los péptido se unan de forma selectiva al HLA-A*0201.

15 En el término «expresado de forma aberrante» los inventores incluyen el significado de que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión, o que el gen no es silencioso en el tejido del que deriva el tumor pero sí se expresa en el tumor. Con el término «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el polipéptido está presente, al menos, a un nivel 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.

20 Los péptidos (al menos los que contienen enlaces peptídicos entre residuos de amino ácidos) 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 y las referencias ahí contenidas. La protección temporal del grupo N-amino se debe al grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La división repetitiva de este grupo de protección se lleva a cabo utilizando piperidina al 20% en N, N-dimetilformamida. Las funcionalidades de la cadena lateral pueden estar protegidas en forma de 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 butiloxycarbonilo (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). Cuando la glutamina o la asparagina son residuos C-terminales, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxibencihidrido para la protección de las funcionalidades de la cadena amido. El apoyo de la fase sólida se basa en un polímero polidimetil-acrilamido constituido de los tres monómeros dimetilacrilamido (monómero esqueleto), bisacriloleileno diamino (interconector) y acrilolsarcosino metil éster (agente funcionalizador). El agente divisible péptido-resina usado es el derivado del ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético. Todos los derivados de aminoácidos son añadidos como sus derivados anhidros simétricos y preformados, exceptuando la asparagina y la glutamina, que se añaden usando un procedimiento de acoplamiento mediado por N, N-diciclohexil-carbodiimide/1hidroxibenzotriazolona invertida. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección son monitorizadas utilizando ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico o procedimientos de prueba de isotina. Al completarse la síntesis, los péptidos se separan de la resina con la 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 de utilizados normalmente son etanoditiol, fenol, anisol y agua. La elección exacta depende de los aminoácidos constituyentes del péptido que se esté sintetizando. También es posible una combinación de metodologías de fase sólida y solución para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. *From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future.* «Curr Pharm Biotechnol.» 2004 Feb;5(1):29-43 y las referencias citadas en dicho documento).

30

35

40

45 El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío, con la posterior trituración con éter dietílico y permitiendo el péptido crudo. De forma alternativa, puede usarse un intercambio de sales (TFA -> ácido acético) antes de la liofilización. Por un procedimiento de extracción simple, se eliminan cualquier depurador que se halle, que, el la liofilización de la fase acuosa permite un péptido crudo libre de depuradores. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden adquirir de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UK.

La purificación se puede realizar por cualquier técnica, o combinación de técnicas, como la cromatografía de exclusión, la cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía de interacción hidrofóbica y, normalmente, la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida, usando la separación de gradiente de agua/acetonitril.

50 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, la secuenciación Edman, el análisis de espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos y el análisis de espectrometría de masa MALDI y ESI-Q-TOF.

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

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

10 Los conectores sintéticos con un sitio de restricción o más proporcionan un método alternativo de unión del segmento de ADN a vectores. El segmento de ADN, generado por digestión de restricción de endonucleasa tan y como se explicó anteriormente, es tratado con el bacteriófago T4 ADN polimerasa o *E. coli* ADN polimerasa I, enzimas que eliminan los extremos 3' monocatenarios con sus actividades exonucleolíticas 3'-5', y rellenan los extremos 3' con sus actividades de polimerización.

15 La combinación de estas actividades genera, por tanto, segmentos de ADN de extremo romo. Los segmentos de extremo romo se incuban entonces con un exceso 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 bacteriófaga T4 ADN ligasa. Por tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN con secuencias de conexión poliméricas 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 conectores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasa de restricción se pueden adquirir de diversas fuentes, incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, EEUU.

20 Una forma deseable de modificar la codificación de ADN 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, manipulando, por ejemplo, los sitios de restricción apropiados, o puede usarse para modificar en ADN de otras formas conocidas por los expertos en la materia. En este método, el ADN que se va a amplificar 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, usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

25 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 según las enseñadas contenidas en esta invención, para construir un vector de expresión que entonces se usa para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Dichas técnicas incluyen las descritas en las patentes US 4.440.859, concedida el 3 de abril de 1984 a Rutter y col; US 4.530.901, concedida el 23 de julio de 1985 a Weissman; US 4.582.800, concedida el 15 de abril de 1986 a Crowl; US 4.677.063, concedida del 30 de junio de 1987 a Mark y col; US 4.678.751, concedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel; US 4.704.362, concedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura y col; US 4.710.463, concedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray; US 4.757.006, concedida el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. y col; US 4.766.075, concedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel y col y US 4.810.648, concedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker, todas incluidas en esta invención como bibliografía.

30 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.

35 Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión como, por ejemplo, un vector plasmídico, en la orientación y el marco de lectura adecuados para la expresión. Si es necesario, el ADN podrá 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. Es 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 codifica para un rasgo seleccionable en la célula transformada como, por ejemplo, la resistencia a antibióticos.

40 De forma alternativa, el gen para dicho rasgo seleccionable puede ser otro vector, que es usado para cotransformar la célula huésped deseada.

45 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 esta patente, para permitir la expresión del polipéptido, que entonces podrá ser recuperado.

50 Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (*E. coli* y *Bacillus subtilis*, por ejemplo), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo), hongos filamentosos (*Aspergillus*, por ejemplo), células de plantas, animales e insectos. Con preferencia, el sistema podrá ser de células Awells.

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

Un vector plasmídico típico de las células de los mamíferos es pSVL, que se puede adquirir de Pharmacia, Piscataway, NJ, EEUU. Este vector usa el promotor tardío SV40 para llevar a cabo la expresión de los genes clonados, de la cual se ha encontrado el mayor nivel en las células productoras de antígenos T, como las células COS-1. Un ejemplo de vector de expresión de un mamífero es el pMSG, que también puede adquirirse en Pharmacia. Este vector usa el promotor inducido por glucocorticoide de la repetición terminal larga del virus tumoral 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 de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EEUU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración de levadura (YIps) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos de centrómero de levadura (Ycps). Los expertos en la materia conocerán 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 de un 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 de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EEUU, y RR1, que se puede adquirir de la *American Type Culture Collection* (ATCC) de Rockville, MD, EEUU (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 del riñón o fibroblásticas. Las células huésped de levadura incluyen las YPH499, YPH500 y YPH501, que normalmente pueden adquirirse de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EEUU. Las células huésped de mamíferos preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que se pueden adquirir de la ATCC como CCL61, células embrionarias de ratón suizo NIH NIH/3T3, que se pueden adquirir de la ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de riñón de mono, que se pueden adquirir de 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.» EEUU 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 de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EEUU. 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 con éxito, 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 considera el cultivo de dichas células, preferentemente monoclonal (clonalmente homogéneo) o derivado de un cultivo momoclonal, 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.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un péptido para su inyección intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) e intramuscular (i.m.). Las formas preferidas de inyección de péptidos son s.c, i.d, i.p, i.m. e i.v. Las formas preferidas de inyección de ADN son i.d, i.m, s.c, i.p. e i.v. Podrán darse dosis de entre 1 y 500 mg de péptido a ADN.

Se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. El método comprende la administración al paciente de una cantidad efectiva de un péptido según la invención, o una cantidad efectiva de un polinucleótido o un vector de expresión que codifique dicho péptido, en la que la cantidad de dicho péptido o la cantidad de dicho polinucleótido o vector de expresión es efectiva para provocar una respuesta inmune contra la célula diana en el paciente. La célula diana es, normalmente, una célula tumoral o cancerosa; en particular, una célula de leucemia o linfoma.

El péptido o el ácido nucleico codificador del péptido constituye 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. Si el ácido nucleico se administra *in vitro* en las células, puede ser útil para las células su transfección para coexpresar citocinas como la interleucina-2. El péptido podrá ser sustancialmente puro; o estar combinado con un adyuvante que estimule la respuesta inmune como Detox; o usado en combinación con citocinas estimuladoras de la respuesta inmune; o ser administrado con un sistema de liberación apropiado como, por ejemplo, liposomas. 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). 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. El polinucleótido puede ser sustancialmente 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 epítipo que estimule los linfocitos T CD8⁺, por ejemplo.

El péptido para una vacuna contra el cáncer puede ser cualquier péptido apropiado. En particular, puede ser un péptido apropiado de 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 meros. Los péptidos más largos también pueden ser apropiados, pero se prefieren los de 9 ó 10 meros, tal y como se describe en la tabla 1 adjunta.

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 administrarse por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea (véase también más arriba el método de producción de un péptido). Preferentemente, los péptidos, como compuestos farmacéuticos activos son administrados en combinación con un adyuvante como, por ejemplo, el IL-2, el IL-12, el GM-CSF, adyuvante de Freund incompleto, el adyuvante de Freund completo o formulaciones liposomales. Los adyuvantes preferidos pueden encontrarse, por ejemplo, en Brinkman JA, Fausch SC, Weber JS, Kast WM. *Peptide-based vaccines for cancer immunotherapy*. «Expert Opin Biol Ther.» 2004 Feb;4(2):181-98.

La vacunación resulta en una respuesta de los linfocitos T citotóxicos estimulados por células presentadoras de antígenos. Una vez que los linfocitos T citotóxicos han sido sensibilizados, puede resultar ventajoso el aumento de la expresión del MHC en las células tumorales.

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.

Otro aspecto de la invención, por tanto, proporciona una vacuna efectiva contra el cáncer o las células tumorales o cancerosas, que comprende una cantidad efectiva de un péptido según la invención o un ácido nucleico que codifica dicho péptido. Asimismo, se prefiere que la vacuna sea una vacuna de ácidos nucleicos. Se sabe que la inoculación de

una vacuna de ácidos nucleicos --como una vacuna de ADN-- que codifique un polipéptido provoca una respuesta de los linfocitos T. La vacuna preferida comprende un péptido o péptidos (sintéticos) (es decir, o sólo o en combinación con 1, 2, 3, 4, 5 o 6, o incluso más péptidos. Véase más abajo).

5 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.

10 Se cree que la asociación del ácido nucleico y la expresión del polipéptido codificado por parte de las células dendríticas puede ser el mecanismo de sensibilización de la respuesta inmune. Sin embargo, aunque las células dendríticas pueden no sufrir la transfección, siguen siendo importantes porque detectan el péptido expresado de las células del tejido que hayan sufrido la transfección.

15 Se prefiere que la vacuna -como, por ejemplo, la vacuna de ADN- sea administrada en el músculo. También se prefiere que sea administrada 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, EEUU), derivado de la saponina; los extractos micobacterianos y la pared bacteriana mimética sintética y los adyuvantes registrados, como el Detox de Ribi. Quil A, otro adyuvante derivado de la saponina, también puede ser usado (Superfos, Dinamarca). Se prefiere que la vacuna de ácidos nucleicos se administre sin adyuvantes. Otros adyuvantes, como el adyuvante de Freund, también pueden ser
20 útiles. También puede ser útil dar el péptido conjugado con la hemocianina de lapa californiana, preferentemente también con un adyuvante.

25 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.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el 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 un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención.

30 Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados *in vitro*, método que comprende el contacto *in vitro* de los CTL con moléculas humanas 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 CTL, en donde el antígeno es un péptido según la invención.

35 Apropiadamente, los CTL son células colaboradoras CD8⁺. Las moléculas MHC de clase I pueden ser expresadas en la superficie de cualquier célula adecuada. Se prefiere que dicha célula no exprese de forma natural moléculas MHC de clase I (en cuyo caso, se realiza la transfección en la célula para que exprese dicha molécula) o, si lo hace, es 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 I sea sensibilizada completamente con un antígeno del péptido antes de activar los CTL.

40 La célula presentadora de antígenos (o célula estimulante) se caracteriza por tener en su superficie una molécula MHC de clase I 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 puede cargarse fácilmente *in vitro* con el antígeno seleccionado.

45 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.

La línea celular humana T2 de carga defectuosa de péptidos se puede adquirir de la *American Type Culture Collection*, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EEUU, con número de catálogo CRL 1992.

50 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.

Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I, así como las moléculas de estimulación conjunta, están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

55 En otra modalidad, también pueden usarse combinaciones de moléculas de HLA como, por ejemplo, moléculas MHC de clase II como las aquí descritas en las tablas A y B. 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, puede ser deseable 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 estimulador de los linfocitos T CD8⁺. Esta vacuna sería particularmente útil en el tratamiento del cáncer. Estas vacunas «perladas» son características de las vacunas de ADN. El desencadenamiento simultáneo de una respuesta inmune dependiente del MHC de clase II junto con una respuesta inmune dependiente del MHC de clase I tiene la ventaja de resultar en una reacción de tipo TH₁ de linfocitos T CD4⁺ que apoya a los linfocitos T CD8⁺ dependientes del MHC de clase I.

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.», EEUU, 92,432-436 y en Kawakami y col. (1992) «J. Immunol.» 148,638643 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, también pueden usarse macrófagos sensibilizados de manera repetida con péptidos o polipéptidos, o infectados con virus recombinante. S. Walter y col. (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. *Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres.* «J Immunol.» 2003 Nov 15;171(10):4974-8) describen la sensibilización *in vitro* de células T por medio de células presentadoras de antígenos artificiales, que también es adecuado para generar linfocitos T contra el péptido elegido.

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.

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

Se describen linfocitos T citotóxicos (CTL) que reconocen de forma selectiva a una célula que exprese un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención. Con preferencia, el CTL reconoce a la mencionada célula por interacción con el complejo de péptidos/HLA (por ejemplo, de unión). Los CTL son útiles en un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, en el que al paciente se le administra un número efectivo de los CTL activados. Los CTL administrados al paciente pueden derivar del paciente y se activados tal y como se describe más arriba (es decir, son CTL autólogos) De forma alternativa, los CTL pueden no ser del paciente, sino de otro individuo. Evidentemente, se prefiere que se trate de un individuo sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo con buena salud en general, preferentemente con un sistema inmune competente y, más preferentemente, que no sufra ninguna enfermedad que pueda ser fácilmente detectable.

Los CTL activos expresan un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce a las células que expresan el polipéptido. Resulta de utilidad que el ADNc que codifica el TCR esté clonado del CTL activado y transferido a otro CTL para su expresión.

In vivo, las células diana para el CTL CD8⁺ conforme a la presente invención pueden ser células del tumor, leucemia o linfoma (que expresa MHC de clase I) y/o células del estroma que rodean al tumor (células tumorales) (que, a veces, también expresan MHC de clase I).

Los TCR de clones de CTL específicos para los péptidos de la invención son clonados. El uso de los TCR en los clones de CTL 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 CTL. 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.» EEUU 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 transmembrana 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 anfitriónicos 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

5 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 coloración 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 CTL 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 CTL autólogos transducidos.

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

15 Además del TCR, se describen 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.» EEUU 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 de la invención incluyen los descritos más arriba en relación a la expresión de los péptidos de la invención.

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

25 Se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. El método comprende los siguientes pasos: (1) obtención de CTL del paciente; (2) introducción en dichas células de un polinucleótido que codifique un TCR o una molécula funcionalmente equivalente, como se definió más arriba, y (3) introducción al paciente de las células producidas en el paso (2).

30 Se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la definida en los otros aspectos de la invención. El método comprende los siguientes pasos: (1) obtención de células presentadoras de antígenos, como células dendríticas, del paciente; (2) contacto de dichas células presentadoras de antígenos con un péptido, como se definió en los otros aspectos de la invención, o con un polinucleótido que codifique dicho péptido, *ex vivo* y (3) reintroducción en el paciente de las células presentadoras de antígenos así tratadas.

35 Preferentemente, las células presentadoras de antígenos son células dendríticas. Las células dendríticas son células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetid 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.

40 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.

45 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 antigen 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).

50 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 de leucemia o linfoma.

55 Se prefiere especialmente que los pacientes que sean tratados con los métodos de la invención tengan un tipo HLA-A2. Así, 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.

5 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 CTL; para activar CTL autólogos *in vitro* seguido de terapia adoptiva (es decir, los CTL así manipulados son introducidos en el paciente); y para activar CTL 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.

10 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, EEUU), 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). También pueden ser útiles otros adyuvantes como los oligonucleótidos CpG, el ARN estabilizado, Imiquimod (comercializado con el nombre registrado Aldara™ por 3M Pharma, EEUU), el adyuvante incompleto de Freund (comercializado como Montanide ISA-51 por Seppic S.A, Paris, Francia), las formulaciones liposomales o el GM-CSF. También puede ser útil dar el péptido conjugado con la hemocianina de lapa californiana, preferentemente también con un adyuvante.

15 Los péptidos también pueden ser usados como reactivos diagnósticos. Con ellos puede analizarse si, en una población de CTL, aparecen CTL dirigidos específicamente contra un péptido o inducidos por una terapia. Además, el aumento de linfocitos T precursores puede ser analizado con los péptidos que tengan una reactividad contra el péptido definido. Además, el péptido puede ser usado como marcador para controlar la progresión de la enfermedad de un tumor que expresa el antígeno mencionado del que el péptido deriva.

20 En la tabla 1 adjunta, se enumeran los péptidos usados e identificados. En la tabla, además, se da la posición respectiva del péptido en la proteína respectiva. El número de registro del OFA/iLR del ratón en el Genbank del *National Centre for Biotechnology Information* del *National Institute of Health* (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) es AAD26866. Los números de registro del OFA/iLR humano en el Genbank del *National Centre for Biotechnology Information* del *National Institute of Health* (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) son, por ejemplo, AAC50652 o AAP35883.

25 En otra modalidad preferida, los péptidos son usados para la coloración 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 tumoral.

30 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*».

35 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene uno 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, diluyentes, aromatizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias de estimulación 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 tumorales.

40 La preparación farmacéutica con al menos los péptidos de la presente invención según la ID de SEQ n.º es administrada a un paciente que sufre una enfermedad tumoral asociada al péptido o antígeno respectivo. En particular, se pueden tratar malignidades que expresen OFA/iLR, como leucemias (por ejemplo, LMA o LLC) o mielomas (por ejemplo MM). Así puede desencadenarse una respuesta inmune específica de CTL.

45 En otro aspecto de la presente invención, una combinación de dos o varios péptidos conformes a la presente invención pueden 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. 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 ejemplo más abajo), IL-12 o perforina. Normalmente, los péptidos más eficaces son entonces combinados como vacuna para los propósitos descritos más arriba.

Una vacuna adecuada contendrá 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 péptidos distintos, preferiblemente 4, 5, 6 ó 7 péptidos distintos y, más preferiblemente, 6 péptidos diferentes.

Finalmente, la vacuna 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.

La identificación de epítomos de linfocitos T colaboradores de antígenos asociados a tumores sigue siendo una tarea importante en la inmunoterapia contra los tumores. Con el fin de identificar epítomos de unión a linfocitos T deducidos de la proteína del OFA/iLR, se sintetizaron 14 péptidos (véase más abajo) que fueron predichos por los programas de ordenador PAPROC (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) y SYFPEITHY (<http://www.syfpeithi.de>), para unirse a la molécula HLA-A*0201. En un ensayo de reconstrucción con una línea celular T2 deficiente de TAP (Transportador Asociado al Procesamiento Antigénico), sólo dos péptidos (iLR1, iLR2) mostraron una fuerte afinidad de unión a HLA-A*0201 (figuras 11A y B) si se compara con la nucleoproteína₅₈₋₆₆ de la gripe. En presencia de células dendríticas maduras sensibilizadas de manera repetida con los péptidos iLR1 o iLR2, pudieron generarse líneas CTL derivadas de donantes sanos de HLA-A*0201⁺.

Las curvas de valoración demuestran que los CTL específicos de iLR1 e iLR2 mostraban una afinidad alta con el péptido o el complejo MHC (figuras 5 y 10). Ambas líneas de CTL específicas para iLR (figura 1) e iLR2 (figura 6) provocaron una actividad citolítica fuerte contra las líneas de tumor hematológico HLA-A*0201⁺, blasts de LMA malignos primarios (figura 4A, B, y 8A, B, respectivamente) y células LLC (figura 3A, B, y 9A, B, respectivamente), pero evitaron a las dianas HLA-A2 negativas y a las células hematopoyéticas normales (*ibid*). Los experimentos de bloqueo de anticuerpos (figuras 2 y 7) revelaron una toxicidad restringida a MHC de clase I inducida por linfocitos T CD8⁺ específicos de péptidos. Para determinar la frecuencia de las células T específicas de iLR1 e iLR2 en pacientes con HLA-A*0201⁺ AML, LLC y mieloma múltiple, se efectuaron los ensayos de secreción ELISPOT IFN- γ (tablas 3-5). En 25/50 (50%) y 20/50 (40%) de los pacientes con HLA-A*0201⁺ con malignidades hematológicas, se detectaron niveles significativos de linfocitos T específicos de los péptidos iLR1 o iLR2, mientras que, en muestras de sangre periférica de individuos sanos, no se dieron respuestas espontáneas de linfocitos T contra el iLR1 o el iLR2 (tabla 2). En un paciente con LLC y en otro con LMA, pudieron generarse líneas de CTL autólogos específicas para los epítomos de los péptidos iLR1 e iLR2, provocando una actividad citotóxica eficiente contra las células diana apareadas con HLA-A2 autólogas y alogénicas.

Los inventores han mostrado anteriormente que los clones reguladores de linfocitos T CD8⁺ específicos de OFA/iLR que secretan interleucina-10 puede identificarse en ratones con un tumor de OFA/iLR⁺ (Rohrer JW, Rohrer SD, Barsoum A, Coggin JH Jr. *Differential recognition of murine tumor-associated oncofoetal transplantation antigen and individually specific tumor transplantation antigens by syngeneic cloned Balb/c and RFM mouse T cells.* «J Immunol.» 1994; 152: 745-764) y en pacientes con carcinomas de pecho avanzado (Rohrer JW, Barsoum AL, Dyess DL y col. *Human breast carcinoma patients develop clonable oncofoetal antigen-specific effector and regulatory T lymphocytes.* «J Immunol.» 1999; 162: 6880-6892. 11. Rohrer JW, Coggin JH Jr. *CD8 T cell clones inhibit antitumor T cell function by secreting IL-10.* «J. Immunol.» 1995; 155: 5719.). (Su Z y col. *Immunological and Clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells.* «Cancer Res.» 2003; 63: 2127-2133) informaron sobre linfocitos T reactivos contra epítomos con restricción de MHC de clase I de OFA/iLR de pacientes con cáncer renal metastático. En este estudio, los autores también informan sobre la inesperada baja mortalidad de pacientes que recibieron vacunaciones terapéuticas con células dendríticas autólogas, que habían sufrido transfección con RNA codificador de OFA/iLR y otros supuestos antígenos tumorales. Sin embargo, Su y col. no describen el número, restricción de HLA y la identidad química de los epítomos de OFA/iLR. Hötl y col. (Hötl y col. *Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells.* «Clin. Cancer Res.» 2002; 8: 3369-3376) volvió a demostrar que el OFA/iLR puede ser muy útil en la inmunoterapia contra el cáncer basada en vacunas terapéuticas que estimulen respuestas inmunes celulares específicas. Los autores descubrieron que 5/6 pacientes con carcinoma de células renales (RCC), que habían sido vacunados con células dendríticas autólogas cargadas con lisados celulares tumorales alogénicos o autólogos, mostraron respuestas inmunes mejoradas contra el OFA/iLR. Hötl y col. tampoco describen epítomos del OFA/iLR. Cabe destacar que los pacientes con las respuesta inmunes más fuertes contra el OFA/iLR presentaban una respuesta química completa y parcial.

En la pequeña serie de pacientes de LLC en estadio inicial (Binet A) de los inventores, no se detectó una cantidad relevante de linfocitos T secretores de IL-10 específicos para los péptidos iLR1 o iLR2 (no se muestran datos). Mediante experimentos, los inventores ahora tratan de dilucidar con más exactitud una posible relación entre la aparición de linfocitos T específicos anti OFA/iLRP secretores de IFN- γ o IL-10 y el estadio de la enfermedad en pacientes con LLC y mieloma múltiple.

En resumen, los inventores identificaron por primera vez dos epítomos de péptidos específicos de HLA-A*0201 bien diferenciados, derivados de la proteína de OFA/iLR. Estos péptidos son herramientas útiles tanto para llevar a cabo estudios inmunológicos contra tumores como para estrategias de vacunación en malignidades que expresen OFA/iLRP.

Se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la dada en la presente invención. El método comprende la

administración al paciente de una cantidad efectiva de un péptido según la presente invención o un ácido nucleico según la presente invención o un vector de expresión según la presente invención, en donde la cantidad del mencionado péptido, ácido nucleico o vector de expresión es lo suficientemente efectiva para provocar una respuesta inmune contra la célula diana en el mencionado paciente.

5 Se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la presente invención. El método comprende la administración al paciente de un número efectivo de linfocitos T citotóxicos (CTL), tal y como se ha definido en la presente invención.

10 Se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la presente invención. El método comprende los siguientes pasos: (1) obtención de linfocitos T citotóxicos (CTL) del paciente; (2) introducción en dichas células de un ácido nucleico que codifique un receptor de linfocitos T (TCR) o una molécula funcionalmente equivalente, tal y como se ha definido en la presente invención y (3) la introducción al paciente de las células producidas en el paso (2).

15 Preferentemente, las células diana son células cancerosas. Con más preferencia, el cáncer es leucemia o linfoma que expresa el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se ha dado conforme a la presente invención.

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

20 Las ID de SEQ n.º 6 a ID de SEQ n.º 17 muestran secuencias de péptidos como se han usado en los ejemplos.

La figura 1 muestra el reconocimiento de diversas líneas celulares por CTL específicos para ILR1.

La figura 2 muestra el bloqueo de la lisis de células diana por anticuerpos que reconocen CD8, MHC de clase I o TCR para ILR1.

25 La figura 3 muestra que los CTL específicos para HLA-A*02/ILR1 matan células tumorales de pacientes con LLC; (A) primer experimento; (B) segundo experimento.

La figura 4 muestra que los CTL específicos para HLA-A*02/ILR1 matan células tumorales de pacientes con LMA; (A) primer experimento; (B) segundo experimento.

30 La figura 5A muestra la dependencia de dosis de la lisis de células diana T2 sensibilizadas de manera repetida con CTL específicos de ILR1. La 5A muestra la inhibición de CTL específicos de ILR1 por dianas frías (*Cold Target Inhibition Assay*).

La figura 6 muestra el reconocimiento de diversas líneas celulares por CTL específicos para ILR2.

La figura 7 muestra el bloqueo de la lisis de células diana por anticuerpos que reconocen CD8, MHC de clase I o TCR para ILR2.

35 La figura 8 muestra que los CTL específicos para HLA-A*02/ILR2 matan células tumorales de pacientes de LMA. (A) primer experimento; (B) segundo experimento.

La figura 9 muestra que los CTL específicos para HLA-A*02/ILR2 matan células tumorales de pacientes de LLC. (A) primer experimento; (B) segundo experimento.

40 La figura 10A muestra la dependencia de dosis de la lisis de células diana T2 sensibilizadas de manera repetida con CTL específicos de ILR2. La 10B muestra la inhibición de CTL específicos de ILR2 por dianas frías (*Cold Target Inhibition Assay*).

45 La figura 11 muestra el ensayo de reconstrucción *in vitro* con la línea celular T2 deficiente de TAP (Transportador Asociado al Procesamiento Antigénico), sólo dos péptidos (iLR1, iLR2) mostraron una fuerte afinidad de unión a HLA-A*0201 (figuras 11A y B) si se compara con la nucleoproteína₅₈₋₆₆ de la gripe. En comparación con los ILR3 a ILR14 y el péptido de referencia del virus de la gripe (Flum1), los péptidos ILR1 e ILR2 muestran una buena afinidad de unión para HLA-A*02.

EJEMPLOS

Abreviaturas utilizadas en la presente solicitud:

Ac: anticuerpo

	Ag:	antígeno
	APC:	célula presentadora de antígeno
	CD:	grupo de diferenciación
	cpm:	recuentos por minuto
5	DC:	célula dendrítica
	VEB:	virus de Epstein-Barr
	ESI:	ionización por electrospray
	HLA:	antígeno de leucocito humano
	HPLC:	cromatografía líquida de alto rendimiento
10	IFN:	interferón
	Ii:	cadena invariante (CD74)
	IL:	interleucina
	MALDI:	láser de matriz asistida de ionización desorción
	MHC:	complejo mayor de histocompatibilidad
15	MS:	espectrometría de masas
	OD ₄₅₀ :	densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm
	PBMC:	células mononucleares de sangre periférica
	PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
	PHA:	fitohemaglutinina
20	SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfatosódico
	S.I.:	índice de estimulación
	TOF:	tiempo de vuelo

Líneas celulares, muestras de tumor y células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

25 Todas las líneas celulares usadas en este estudio se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EEUU). Las PBMC, las células progenitoras CD34⁺, las células de médula ósea y las muestras de tumor se obtuvieron de donantes sanos, pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y mieloma múltiple (MM), respectivamente, tras el consentimiento y aprobación del consejo institucional.

Anticuerpos

30 Anticuerpo contra MAM-6: Alexis Corp., Switzerland, obtenido a través de AXXORA DEUTSCHLAND GmbH, Gallusstrasse 10, D-35305 Grünberg. N.º de producto SIG-614.

Anticuerpo contra HLA-A*02: clon BB7.2 de BD Pharmingen, Cat.-Nr. 551230.

Anticuerpo contra CD8: clon SFC121Thy2D3 (T8) de Beckman Coulter, n.º de part. 6602139.

Anticuerpo contra TCR: clon BMA031 de Beckman Coulter, n.º de part. IM1466.

Anticuerpo contra CD4: clon SFC112T4D11 (T4) de Beckman Coulter, n.º de part. 6602138.

35 Anticuerpo contra HMFG-1: clon 1.10.F3 de Beckman Coulter, n.º de part. IM0271.

Péptidos

Los péptidos FluM1₅₈₋₆₆ (GILGFVFTL), HIV-Pol₄₇₆₋₄₈₄ (ILKEPVHGV, control negativo en el ensayo de Elispot) msurv33 (LYLKNYRIA, epítipo del péptido del gen survivin múrido específico para H2^d, control negativo en los análisis de unión de T2), iLR1₅₉₋₆₈ (LLAARAIVAI), iLR2₁₄₆₋₁₅₄ (ALCNTDSPL), iLR3₆₀₋₆₈ (LAARAIVAI), iLR4₅₈₋₆₆ (LLLLAARAIV), iLR5₇₋₁₅

(VLQMKEEDV), iLR6₅₀₋₅₈ (NLKRTWEKL), iLR7₆₆₋₇₄ (VAIENPADV), iLR8₁₃₉₋₁₄₇ (YVNLPTIAL), iLR9₁₇₇₋₁₈₅ (MLAREVLRM), iLR10₂₄₉₋₂₅₇ (SEGVQVPSV), iLR11₁₈₋₂₆ (FLAAGTHLG), iLR12₅₇₋₆₆ (KLLLAARAIV), iLR13₆₇₋₇₆ (AIENPADVSV), iLR14₁₇₃₋₁₈₂ (LMWWMLAREV) fueron adquiridos de Biosynthan (Berlín, Alemania) con una pureza de más del 90% y analizados por cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas.

5 Síntesis y análisis de péptidos

Los péptidos fueron sintetizados en el sintetizador de péptidos EPS221 (Abimed, Langenfeld, Alemania) siguiendo la estrategia Fmoc/tBu. Tras la eliminación de la resina por el tratamiento con TFA/fenol/etanoditiol/tioanisol/agua (90/3.75/1.25/2.5/2.5 por vol.) durante 1 o 3 horas (péptidos con arginina), los péptidos fueron precipitados desde el metil-tert butil éter, lavados una vez con metil-tert butil éter, dos veces con éter dietílico y resuspendidos en agua antes de la liofilización. Los productos de la síntesis fueron analizados por HPLC (Varian star, Zinsser analytics, Múnich, Alemania) y por espectrometría de masas de MALDI-TOF (future, GSG, Bruchsal, Alemania). Los péptidos con una pureza de menos del 80% fueron purificados por HPLC de preparación.

15 Análisis de unión de T2

El análisis de unión de células totales T2 fue realizado por medio del protocolo adoptado por Casati y col. (Casati C, Dalerba P, Rivoltini L y col. *The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients.* «Cancer Res.» 2003; 63, 4507-4515.).

20 Generación de CTL humanos

Los CTL derivados de individuos sanos con HLA-A*0201⁺ se generaron por medio del protocolo descrito en Zeis M, Siegel S, Schmitz M y col. *Induction of cytotoxic T lymphocytes against hematologic neoplasms by survivin RNA-transfected dendritic cells.* «J Immunol.» 2003; 170, 5391-5397.). Para la inducción de CTL específicos de péptidos de OFA/iLR autólogos, obtenidos de pacientes con LMA y LLC, se separaron los linfocitos T CD8⁺ de las PBMC usando cuentas inmunomagnéticas (MACS[®], Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Alemania), cultivados con DC completamente maduras sensibilizadas de forma reiterada con los péptidos de OFA/iLR autólogos y re-estimulados con PBMC sensibilizadas de forma reiterada con los péptidos autólogos en presencia de IL-2 (1ng/ml, CellConcepts, Weisskirch, Alemania). Después de, por lo menos, cuatro semanas de re-estimulaciones, se determinó la reactividad de los CTL en un ensayo de liberación de cromo 4h⁵¹ convencional. Los análisis de inhibición de dianas frías y los experimentos de bloqueo de anticuerpos fueron realizados tal y como se describió anteriormente (Zeis M, Siegel S, Schmitz M y col. *Induction of cytotoxic T lymphocytes against hematologic neoplasms by survivin RNA-transfected dendritic cells.* «J Immunol.» 2003; 170, 5391-5397.).

30 Ensayo de Elispot

Con el fin de determinar la frecuencia en pacientes de linfocitos T específicos de péptidos de OFA/iLR, se llevaron a cabo ensayos de Elispot usando el kit Elispot de interferón-γ (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), conforme a las instrucciones del fabricante.

Tabla 1: Péptidos y epítomos de péptidos de linfocitos T colaboradores asociados a tumores en la presente invención

35

	Nombre	Secuencia	N.º de ID de SEQ	Nota
1.	iLR1 ₅₉₋₆₈	LLAARAIVAI	ID de SEQ n.º 1	ILR1
2.	iLR2 ₁₄₆₋₁₅₄	ALCNTDSPL	ID de SEQ n.º 2	ILR2
3.	FluM1 ₅₈₋₆₆	GILGFVFTL	ID de SEQ n.º 3	
4.	HIV-Pol ₄₇₆₋₄₈₄	ILKEPVHGV	ID de SEQ n.º 4	control negativo en el ensayo de Elispot
5.	msurv33	LYLKNYRIA	ID de SEQ n.º 5	epítomo del péptido del gen survivin múrido específico para H2 ^d , control negativo en los análisis de unión de T2
6.	iLR3 ₆₀₋₆₈	LAARAIVAI	ID de SEQ n.º 6	

7.	iLR4 ₅₈₋₆₆	LLLAARAIV	ID de SEQ n.º 7
8.	iLR5 ₇₋₁₅	VLQMKEEDV	ID de SEQ n.º 8
9.	iLR6 ₅₀₋₅₈	NLKRTWEKL	ID de SEQ n.º 9
10.	iLR7 ₆₆₋₇₄	VAIENPADV	ID de SEQ n.º 10
11.	iLR8 ₁₃₉₋₁₄₇	YVNLPTIAL	ID de SEQ n.º 11
12.	iLR9 ₁₇₇₋₁₈₅	MLAREVLRM	ID de SEQ n.º 12
13.	iLR10 ₂₄₉₋₂₅₇	SEGVQVPSV	ID de SEQ n.º 13
14.	iLR11 ₁₈₋₂₆	FLAAGTHLG	ID de SEQ n.º 14
15.	iLR12 ₅₇₋₆₆	KLLLAARAIV	ID de SEQ n.º 15
16.	iLR13 ₆₇₋₇₆	AIENPADVSV	ID de SEQ n.º 16
17.	iLR14 ₁₇₃₋₁₈₂	LMWWMLAREV	ID de SEQ n.º 17

Resultados

Péptidos ILR1 (LLAARAIVAI, ID de SEQ n.º 1) y ILR2 (ALCNTDSPL, ID de SEQ n.º 2)

5 En todos los ensayos de Elispot, los números dados para los puntos IFN-gamma-positivo son por 10^5 PBMC. Antes del ensayo, los linfocitos T de pacientes y donantes sanos se mantuvieron en cultivo durante siete días en presencia de interleucina-2 (IL-2) (10 unidades/ml) y péptido (10 microgramos/ 10^6 PBMC/mililitro).

Todas las muestras de donantes sanos tienen un número bajo de CTL que respondan a ILR1 o ILR2 (Tabla 2) en el ensayo de Elispot de IFN- γ .

Tabla 2

Indicación:	donantes sanos		
Pacientes con sonda positiva para:	HLA-A*02		
Elispot detectando:	interferón gamma (IFN- γ)		
Secuencia de aminoácidos de péptidos:	LLAARAIVAI	ALCNTDSPL	GILGFVFTL
designación de los péptidos:	ILR1	ILR2	FluM1
Proteína de origen:	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína de la matriz de gripe M1
nombre del paciente:	n.º de puntos teñidos positivamente:		
001	0	0	
002	3	3	
003	2	2	
004	4	4	
005	5	5	
006	4	4	
007	6	6	
008	7	7	
009	0	0	
010	0	0	
011	0	0	
012	0	0	
013	3	3	
014	4	4	
015	5	5	

5

De todas la muestras de tumor de pacientes de LLC sondadas, 12/20 (60%) tuvieron una respuesta significativa (>20) de CTL contra el péptido de ILR1, y 9/16 (56%) tuvieron respuestas contra el péptido de ILR2 en los ensayos de Elispot de IFN- γ . Las cifras medias de CTL teñidos positivamente para los dos péptidos derivados de ILR se comparan en 55% (ILR2) y 76% (ILR1) con los números de respuestas obtenidas con un antígeno con restricción de HLA-A*02 de la proteína de la matriz de la gripe, contra la que casi cualquier adulto habrá tenido una respuesta inmune anterior (Tabla 3).

Tabla 3

Indicación:	pacientes de LLC		
Pacientes con sonda positiva para:	HLA-A*02		
Elispot detectando:	interferón gamma (IFN- γ)		
Secuencia aminoácidos péptidos:	de LLAARAIVAI	ALCNTDSPL	GILGFVFTL
designación de los péptidos:	ILR1	ILR2	FluM1
Proteína de origen:	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína de la matriz de gripe M1
nombre del paciente:	n.º de puntos teñidos positivamente:		
000, B.	4	4	15
000, T.	56	45	35
022, E.	77	65	51
027, W.	88	128	35
033, D.	122	67	n.d.
038, N.	45	23	140
041, E.	35	27	65
049, G.	56	78	31
052, G.	0	56	n.d.
054, S.	0	0	47
058, E.	0	0	41
060, F.	0	0	63
065, B.	1	0	58
070, M.	2	2	89
071, G.	3	0	91
082, G.	68		28
083, M.	100		279
087, N.	83		24
090, G.	121		30
091, G.	93		67
125, F.		57	

De todas la muestras de tumor de pacientes de LMA sondadas, 6/15 (40%) tuvieron una respuesta significativa (>20) de CTL contra el péptido de ILR1, y 7/15 (47%) tuvieron respuestas contra el péptido de ILR2 en los ensayos de Elispot de IFN-γ (tabla 4).

5 Tabla 4

Indicación:		pacientes de LMA		
Pacientes con sonda positiva para:		HLA-A*02		
Elispot detectando:		interferón gamma (IFN-γ)		
Secuencia aminoácidos péptidos:	de de	LLAARAIVAI	ALCNTDSPL	GILGFVFTL
designación de los péptidos:	de los	ILR1	ILR2	FluM1
Proteína de origen:		Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína de la matriz de gripe M1
nombre del paciente:	n.º de puntos teñidos positivamente:			
000, M.	2		0	
025, J.	3		0	
041, G.	2		0	
055, C.	1		1	
072, G.	3		3	
106, K.	4		0	
107, L.	5		3	
108, J.	56		34	
110, B.	54		27	
000, M.	34		34	
026, C.	34		34	
043, L.	33		23	
056, N.	25		112	
072, G.	1		1	
068, G.	2		32	

De todas la muestras de tumor de pacientes de mieloma sondadas, 8/14 (57%) tuvieron una respuesta significativa (>20) de CTL contra el péptido de ILR1, y 6/14 (43%) tuvieron respuestas contra el péptido de ILR2 en los ensayos de Elispot de IFN-γ (tabla 5).

Tabla 5

Indicación:	mieloma		
Pacientes con sonda positiva para:	HLA-A*02		
Elispot detectando:	interferón gamma (IFN- γ)		
Secuencia de aminoácidos de péptidos:	LLAARAIVAI	ALCNTDSPL	GILGFVFTL
designación de los péptidos:	ILR1	ILR2	FluM1
Proteína de origen:	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína del receptor de laminina inmadura	Proteína de la matriz de gripe M1
nombre del paciente:	n.º de puntos teñidos positivamente:		
001	3	0	
002	4	0	
003	56	0	
004	76	1	
005	56	3	
006	43	0	
007	22	3	
008	23	34	
009	0	27	
010	0	34	
011		34	
012	23	23	
013	112	112	
014	1	1	

5

En resumen, se aprecia claramente el potencial de los péptidos ILR1 e ILR2 de la OFA-ILRP para provocar respuestas inmunes contra las células cancerosas, específicamente de leucemias y linfomas.

Los linfocitos T específicos para dichos péptidos muestran funciones efectoras (secreción de interferón- γ gamma).

Otros experimentos con respecto al ILR1 (LLAARAIVAI)

5 Los linfocitos T que reconocen el péptido de ILR1 fueron probados en K562 (línea celular de leucemia pro-eritroblástica humana, también conocida como línea celular de leucemia mielógena crónica [LMC], que, debido a niveles extremadamente bajos de HLA, sirve de control para excluir células NK como células efectoras), IM9 (línea celular linfoblastoide B humana), Karpas-422 (linfoma humano de células B), Balm-3 (línea celular de linfoma humano no Burkitt), U266 (mieloma múltiple humano), REH (leucemia humana precursora de células B), MEC-1 (leucemia humana crónica de células B). Los mismos linfocitos T fueron usados para analizar PBMC alogénicas y autólogas de donantes sanos como referencia. Todas las líneas celulares excepto MEC-1, que no expresa el alelo de HLA-A*02, y K562, que es deficiente en general para la expresión génica de HLA de clase I, fueron reconocidas por los linfocitos T específicos de ILR1 (véase la figura 1). Las células autólogas y alogénicas de donantes sanos no fueron reconocidas, lo que indica que

1. El ILR1 sólo se expresa de forma significativa a nivel peptídico en las células tumorales, pero no en células mononucleares de donantes sanos aparejados con HLA.
2. La respuesta no se dirige contra antígenos del complejo mayor o menor de histocompatibilidad alogénico.
- 15 3. El péptido de ILR1 es reconocido en forma de restricción de HLA.
4. La restricción es específica de alelo (específica para A*02).

Diana: LMA

20 Los linfocitos T específicos para el ILR1 de restricción de HLA-A*02 fueron probados en células tumorales de pacientes de LMA (4 pacientes; muestras LMA-01, -02, -03, -06) (figura 4A). Las células de pacientes con A*02 positivo (3/4) fueron reconocidas con lisis máxima a un ratio E:T (efector/diana) de 40:1 que abarcó entre el 25,9% y el 39,8%. Las células de LMA del paciente con A*02 negativo LMA-06 no fueron reconocidas.

25 Los linfocitos T específicos para ILR1 con restricción de HLA-A*02 fueron probados en células tumorales de pacientes de LMA en una segunda prueba, para confirmar los resultados obtenidos en el primer experimento (9 pacientes; muestras LMA01, -02, -04, -05, -06, -07, -09, -10, -12). Las células de pacientes con A*02 positivo (5/9; LMA-02, -04, -05, -09, -10) fueron reconocidas en todos los casos. Las células de pacientes con A*02 negativo (4/9; LMA-01, -06, -07, -12) no fueron reconocidas (4/4) (figura 4B).

30 La figura 4B también muestra datos sobre células progenitoras CD34⁺ derivadas de la médula ósea de donantes con A*02 positivo (CD34-01, -02), que no fueron reconocidas por los linfocitos T específicos de ILR1 activados, que habían sido re-estimulados *in vitro* durante siete días con ILR1 en presencia de IL-2. Las células de la médula ósea (BM-01, -02) de donantes con A*02 positivo tampoco fueron reconocidas por estos clones de linfocitos T.

35 La figura 2 muestra otros experimentos de bloqueo de anticuerpos que caracterizan la especificidad de la respuesta de los linfocitos T. Antes de los experimentos de liberación de ⁵¹Cr a un ratio E:T constante de 40:1, se incubaron anticuerpos monoclonales de bloqueo con la línea celular linfoblastoide B humana IM-9 en concentraciones de anticuerpo monoclonal como las indicadas por el fabricante. Los experimentos de bloqueo indican que el reconocimiento del ILR1 está mediado por

1. células que alojan receptores de linfocitos T (TCR),
2. el reconocimiento de su diana en el contexto del MHC de clase I (HLA de clase I),
3. un mecanismo de interacción dependiente del co-receptor CD8, pero no del CD4.

40 Los anticuerpos monoclonales de control específicos para proteínas irrelevantes de superficie celular de tipo mucina MAM-6 (sinónimos: CA 15-3, DF3) y HMFG-1 no tuvieron ningún efecto en el reconocimiento de células IM-9 por los linfocitos T efectoras. Se usó PBS como control negativo en estos experimentos de bloqueo.

En resumen, estos dos grupos de experimentos confirman que

1. ILR1 es un antígeno asociado a tumores en el 100% (8/8) de los pacientes de LMA con A*02 positivo (8/13) examinados;
- 45 2. ILR1 está restringido por el HLA-A*02;
3. Los linfocitos T específicos de ILR1 reconocen el ILR2 procesado naturalmente en células tumorales, mientras que, al mismo tiempo, el péptido de ILR1 parece estar ausente en las células progenitoras de CD34⁺ y de la médula ósea.
- 50 4. La interacción entre las células efectoras y diana puede ser inhibida específicamente con anticuerpos monoclonales contra MHC de clase I, TCR o CD8.

Diana: LLC

Los linfocitos T específicos para el ILR1 de restricción de HLA-A*02 fueron probados en células tumorales de pacientes de LLC (5 pacientes; muestras LLC-01, -02, -03, -05, -06). Las células de pacientes con A*02 positivo (3/5) fueron reconocidas en todos los casos (3/3). Las células de pacientes con A*02 negativo no fueron reconocidas en ningún caso (0/2) (figura 3B9). El experimento se repitió (figura 3A) con ocho pacientes más de LLC, de los cuales cuatro (4/8) eran A*02 positivo. Las células LLC de 4/4 pacientes con A*02 positivo fueron reconocidas, mientras que las células diana con A*02 negativo se reconocieron 0/4, por lo que estos experimentos adicionales confirman los resultados mencionados anteriormente. En resumen:

1. ILR1 es un antígeno asociado a tumores en el 100% (7/7) de los pacientes de LLC con A*02 positivo examinados;
2. ILR1 está restringido por el HLA-A*02.

Diana: T2

Las células T2 son deficientes para la expresión del TAP, el «transportador asociado al procesamiento antigénico», que es responsable del lanzamiento de péptidos cortos del citoplasma al retículo endoplasmático (RE), donde los péptidos son cargados en moléculas MHC de clase I vacías. Como consecuencia, las moléculas MHC de clase I de las células T se quedan vacías si no se añaden péptidos (carga externa). Así, las células T2 que expresan moléculas de HLA-A*02 vacías en la superficie de la célula son dianas óptimas para establecer curvas de valoración para la destrucción celular específica de péptidos por parte de los linfocitos T con restricción de HLA-A*02.

En este experimento (figura 5A), los linfocitos T específicos para ILR1 fueron probados en células T2 sensibilizadas de manera repetida con un epitopo bien descrito de linfocitos T del VIH o con el péptido de ILR1 LLAARAIVAI. Resultados: los linfocitos T sólo reconocieron células T2 sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR1. Las células T2 sensibilizadas de manera repetida con el péptido del VIH no fueron reconocidas. Las dianas T2 sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR1 fueron lisadas de un modo dependiente de dosis. La lisis no alcanzó la saturación en el ámbito de las concentraciones probadas.

Diana: T2 + ILR1

Se llevó a cabo un análisis de inhibición de dianas frías. Para examinar si los linfocitos T específicos de ILR1 lisan específicamente células T2 sensibilizadas de manera repetida con péptidos de ILR1 y en el contexto de HLA-A*02, se efectuaron análisis de inhibición de dianas frías de la forma siguiente: Las células T2 etiquetadas con ⁵¹Cr se cargaron con el péptido en una concentración de 10 microgramos de péptido/10⁶ células T2/ml. Un total de 2x10⁵ células T2 sin etiquetar, que habían sido cargadas de igual modo con el mismo péptido o uno de control, se añadieron entonces en un volumen de 50 microlitros de AIMV a 10⁴ células T2 etiquetadas con ⁵¹Cr y sensibilizadas con el péptido de manera repetida. Los linfocitos T efectores específicos para ILR1 se añadieron y se efectuó un ensayo de liberación de Cr⁵¹, tal y como se describió anteriormente. El análisis demuestra que ni los péptidos irrelevantes para los CTL específicos de ILR1 (Survivin e ILR2) ni las células T2 sin cargar, que muestran moléculas de HLA-A*02 vacías en sus superficies, compiten por la lisis de dianas cargadas con el péptido de ILR1 por CTL específicos de ILR1. Por el contrario, una vez que las dianas sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR1 sintético, o las células tumorales de LMA que muestran ILR1 en el contexto de HLA-A*02, son usadas como dianas secundarias (frías), entonces éstas compiten con las células diana primarias (T2 calientes, sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR1) por la lisis por el CTL específico de ILR1 (figura 5B).

Otros experimentos con respecto al ILR2 (ALCNTDSPL)

Los linfocitos T que reconocen el péptido de ILR2 (figura 6) fueron probados en K562 (línea celular de leucemia proeritroblástica humana, también conocida como línea celular de leucemia mielógena crónica [LMC], que, debido a niveles extremadamente bajos de HLA, sirve de control para excluir células NK como células efectoras), IM9 (línea celular linfoblastoide B humana), Karpas-422 (linfoma humano de células B), Balm-3 (línea celular de linfoma humano no Burkitt), U266 (mieloma múltiple humano), REH (leucemia humana precursora de células B), Ramos (sinónimo: RA 1; linfoblasto B del linfoma de Burkitt), MEC-1 (leucemia humana crónica de células B). Los mismos linfocitos T fueron usados para analizar PBMC alogénicas y autólogas de donantes sanos como referencia.

Todas las líneas celulares excepto Ramos y MEC-1, que no expresan el alelo de HLA-A*02, y K562, que es deficiente en general para la expresión génica de HLA de clase I, fueron reconocidas por los linfocitos T específicos de ILR2. Las células autólogas y alogénicas de donantes sanos no fueron reconocidas, lo que indica que

1. El ILR2 sólo se expresa de forma significativa a nivel peptídico en las células tumorales, pero no en células mononucleares de donantes sanos aparejados con HLA.
2. La respuesta no se dirige contra antígenos del complejo mayor o menor de histocompatibilidad alogénico.
3. El péptido de ILR2 es reconocido en forma de restricción de HLA.

4. La restricción es específica de alelo (específica para A*02).

Diana: LMA

5 Los linfocitos T específicos para el ILR2 de restricción de HLA-A*02 fueron probados en células tumorales de pacientes de LMA (8 pacientes; muestras LMA-01, -02, -04, -05, -06, -07, -10, -12). Las células de pacientes con A*02 positivo (4/8; LMA-02, -04, -05, -10) fueron reconocidas en todos los caso (4/4). Las células de pacientes con A*02 negativo (4/8; LMA-01, -06, -07, -12) no fueron reconocidas (4/4) (figura 8A). El experimento fue realizado una segunda vez con muestras de pacientes que no habían sido examinados antes. En este segundo experimento, los linfocitos T específicos para el ILR2 de restricción de HLA-A*02 fueron probados una vez más en células tumorales de pacientes de LMA (4
10 pacientes; muestras LMA-01, -02, -03, -06). Las células de pacientes con A*02 positivo (3/4) fueron reconocidas en todos los casos. Las células de pacientes con A*02 negativo no fueron reconocidas (0/1) (figura 8B).

La figura 8A muestra datos sobre células progenitoras CD34⁺ derivadas de la médula ósea de donantes con A*02 positivo (CD34-01, -02), que no fueron reconocidas por los linfocitos T específicos de ILR2 activados, que habían sido re-estimulados *in vitro* durante siete días con ILR2 en presencia de IL-2. Las células de la médula ósea (BM-01, -02) de donantes con A*02 positivo tampoco fueron reconocidas por estos clones de linfocitos T.

15 La figura 7 muestra otros experimentos de bloqueo de anticuerpos que caracterizan la especificidad de la respuesta de los linfocitos T. Antes de los experimentos de liberación de 51Cr a un ratio E:T constante de 40:1, se incubaron anticuerpos monoclonales de bloqueo con la línea celular linfoblástoide B humana IM-9 en concentraciones de anticuerpo monoclonal como las indicadas por el fabricante. Los experimentos de bloqueo indican que el reconocimiento del ILR2 es mediado por células que alojan receptores de linfocitos T (TCR), que reconocen su diana en el contexto del MHC de clase I (HLA de clase I) por un mecanismo de interacción que depende del co-receptor CD8 pero no del CD4.
20

Los anticuerpos monoclonales de control específicos para proteínas irrelevantes de superficie celular de tipo mucina MAM-6 (sinónimos: CA 15-3, DF3) y HMF-1 no tuvieron ningún efecto en el reconocimiento de células IM-9 por los linfocitos T efectoras. Se usó PBS como control negativo en estos experimentos de bloqueo. En resumen, estos dos grupos de experimentos confirman que

- 25
1. ILR2 es un antígeno asociado a tumores en el 100% (7/7) de los pacientes de LMA con A*02 positivo examinados;
 2. ILR2 está restringido por el HLA-A*02;
 3. Los linfocitos T específicos de ILR2 reconocen el ILR2 procesado naturalmente en células tumorales, mientras que, al mismo tiempo, el péptido de ILR2 parece estar ausente en las células progenitoras de CD34⁺ y de la médula ósea.
30
 4. La interacción entre las células efectoras y diana puede ser inhibida específicamente con anticuerpos monoclonales contra MHC de clase I, TCR o CD8.

Diana: LLC

35 Los linfocitos T específicos para el ILR2 de restricción de HLA-A*02 fueron probados en células tumorales de pacientes de LLC (8 pacientes; muestras LLC-01, -02, -03, -04, -05, -06, -07, -08). Las células de pacientes con A*02 positivo (4/8) fueron reconocidas en todos los casos (4/4). Las células de pacientes con A*02 negativo no fueron reconocidas en ningún caso (0/4) (figura 9A). El experimento se repitió (figura 9B) con cinco pacientes más de LLC, de los cuales tres (3/5) eran A*02 positivo. Las células LLC de 3/3 pacientes con A*02 positivo fueron reconocidas, mientras que las células diana con A*02 negativo se reconocieron 0/2, por lo que estos experimentos adicionales confirman los resultados mencionados anteriormente. Conclusión y resumen:
40

1. ILR2 es un antígeno asociado a tumores en el 100% (7/7) de los pacientes de LLC con A*02 positivo examinados;
2. ILR2 está restringido por el HLA-A*02.

Diana: T2

45 Las células T2 son deficientes para la expresión del TAP, el «transportador asociado al procesamiento antigénico», que es responsable del lanzamiento de péptidos cortos del citoplasma al retículo endoplasmático (RE), donde los péptidos son cargados en moléculas MHC de clase I vacías. Como consecuencia, las moléculas MHC de clase I de las células T se quedan vacías si no se añaden péptidos (carga externa). Así, las células T2 que expresan moléculas de HLA-A*02 vacías en la superficie de la célula son dianas óptimas para establecer curvas de valoración para la destrucción celular específica de péptidos por parte de los linfocitos T con restricción de HLA-A*02. En este experimento, los linfocitos T específicos para ILR2 fueron probados en células T2 sensibilizadas de manera repetida con un epítipo bien descrito de linfocitos T del VIH o con el péptido de ILR2 ALCNTDSPL. Resultados: los linfocitos T sólo reconocieron células T2 sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR2. Las células T2 sensibilizadas de manera repetida con el
50

péptido del VIH no fueron reconocidas. Las dianas T2 sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR2 fueron lisadas de un modo dependiente de dosis. La lisis no alcanzó la saturación en el ámbito de las concentraciones probadas (figura 10A).

Diana: T2 + ILR2

- 5 Se llevó a cabo un análisis de inhibición de dianas frías como el que se describió más arriba en el epígrafe «T2 + ILR1». Los resultados de este experimento confirman que ni los péptidos irrelevantes para los CTL específicos de ILR2 (Survivin e ILR1) ni las células T2 sin cargar, que muestran moléculas de HLA-A*02 vacías en sus superficies, compiten por la lisis de dianas cargadas con el péptido de ILR2 por CTL específicos de ILR2. Por el contrario, una vez que las
- 10 dianas sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR2 sintético, o las células tumorales de LMA que muestran ILR2 en el contexto de HLA-A*02, son usadas como dianas secundarias (frías), entonces éstas compiten con las células diana primarias (T2 calientes, sensibilizadas de manera repetida con el péptido de ILR2) por la lisis por el CTL específico de ILR2 (figura 10B).

En resumen, ambos péptidos de ILR son candidatos para el desarrollo de vacunas terapéuticas basadas en péptidos para los pacientes de cáncer en general.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Immatix biotechnologies GmbH
- 5 <120> Identificación de un epítipo de linfocitos T presentado por el antígeno HLA-A2 y derivado de la proteína del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal y usos de éste
- 10 <130> FB15297
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.3
- 15 <210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 20 <400> 1
- Leu Leu Ala Ala Arg Ala Ile Val Ala Ile
1 5 10
- 25 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 30 <400> 2
- Ala Leu Cys Asn Thr Asp Ser Pro Leu
1 5
- 35 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 40 <400> 3
- Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5
- 45 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 50 <400> 4
- 55 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5
- 60 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 65 <400> 5

Leu Tyr Leu Lys Asn Tyr Arg Ile Ala
 1 5

5 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

Leu Ala Ala Arg Ala Ile Val Ala Ile
 1 5

15 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 7

Leu Leu Leu Ala Ala Arg Ala Ile Val
 1 5

25 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 8

Val Leu Gln Met Lys Glu Glu Asp Val
 1 5

35 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 9

45 Asn Leu Lys Arg Thr Trp Glu Lys Leu
 1 5

50 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 10

Val Ala Ile Glu Asn Pro Ala Asp Val
 1 5

60 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 11

Tyr Val Asn Leu Pro Thr Ile Ala Leu
 1 5
 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 12
 Met Leu Ala Arg Glu Val Leu Arg Met
 1 5
 15
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 13
 Ser Glu Gly Val Gln Val Pro Ser Val
 1 5
 25
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 14
 Phe Leu Ala Ala Gly Thr His Leu Gly
 1 5
 35
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 15
 Lys Leu Leu Leu Ala Ala Arg Ala Ile Val
 1 5 10
 45
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 16
 Ala Ile Glu Asn Pro Ala Asp Val Ser Val
 1 5 10
 55
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 17
 65

<400> 17

Leu Met Trp Trp Met Leu Ala Arg Glu Val
1 5 10

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido asociado a un tumor, seleccionado del grupo que consta de a) un péptido que muestra una longitud total de 10 aminoácidos, que constan de una secuencia según la ID de SEQ n.º 1 (LLAARAIVAI), o b) un péptido mimético retroinverso de éste.
2. El péptido asociado a tumor conforme a la reivindicación 1, con la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, en particular al HLA-A*0201.
3. El péptido asociado a tumor conforme a las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el mencionado péptido es parte de una proteína de fusión con un epítipo estimulador CD4⁺ del toxoide del tétanos.
- 10 4. Un ácido nucleico que codifica a un péptido según cualquiera de las reivindicaciones a a) y 2 a 4.
5. El ácido nucleico según la reivindicación 4, que es ADN, ADNc, APN, ACN, ARN o combinaciones de éstos.
6. Un vector de expresión capaz de expresar un ácido nucleico según la reivindicación 4 ó 5.
7. Una célula huésped asociada que consta de un ácido nucleico según la reivindicación 4 ó 5, o un vector de expresión según la reivindicación 6, donde dicha célula huésped no es una célula madre embrionaria.
- 15 8. Un método para producir un péptido asociado a tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a), 2 y 3, método que consta de un cultivo de la célula huésped según la reivindicación 7 y del aislamiento del péptido de la célula huésped o de su medio de cultivo.
- 20 9. Un compuesto farmacéutico que consta de un péptido asociado a tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico según la reivindicación 4 ó 5 o un vector de expresión según la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Uso de un péptido asociado a tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un ácido nucleico conforme a las reivindicaciones 4 ó 5, o un vector de expresión conforme a la reivindicación 6 en la fabricación de un medicamento para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos tal y como se detalla en la reivindicación 1.
- 25 11. Un método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, método que comprende el contacto *in vitro* de los CTL con moléculas humanas 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 CTL, en donde el antígeno es un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a), 2 ó 3.
- 30 12. El método conforme a la reivindicación 11, donde la célula que presenta el antígeno consta de un vector de expresión según la reivindicación 6.
13. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 en las que la molécula MHC de clase I es HLA-A*0201.

Figura 1

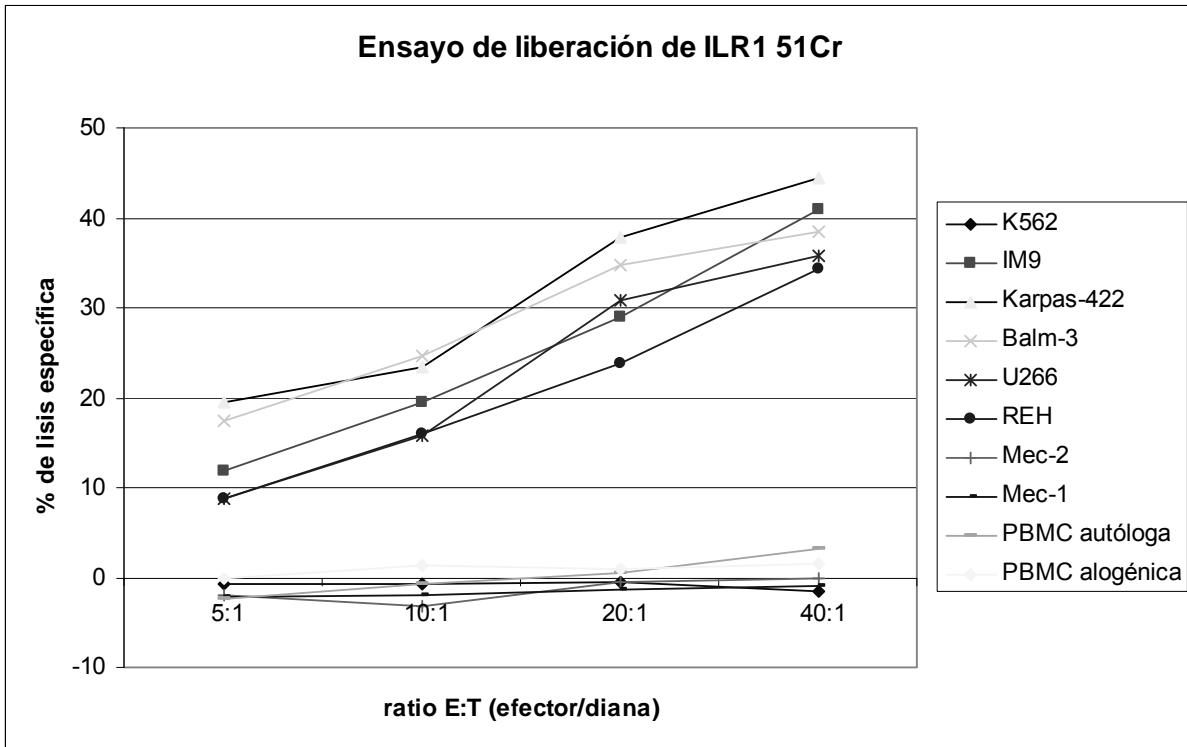


Figura 2

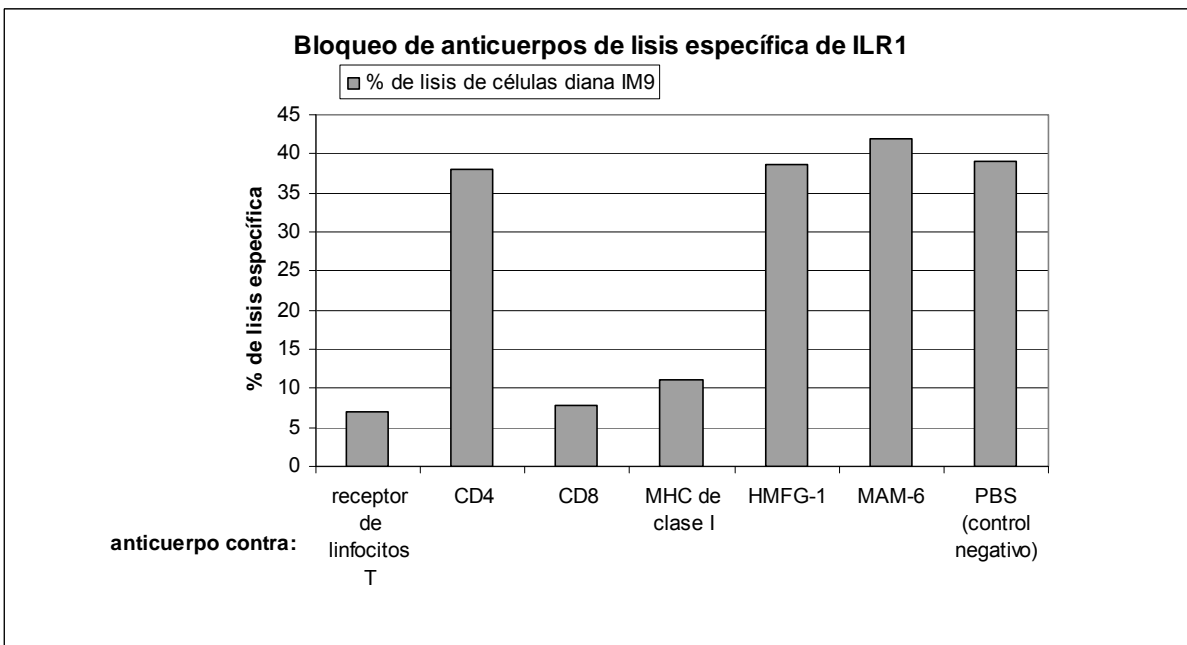
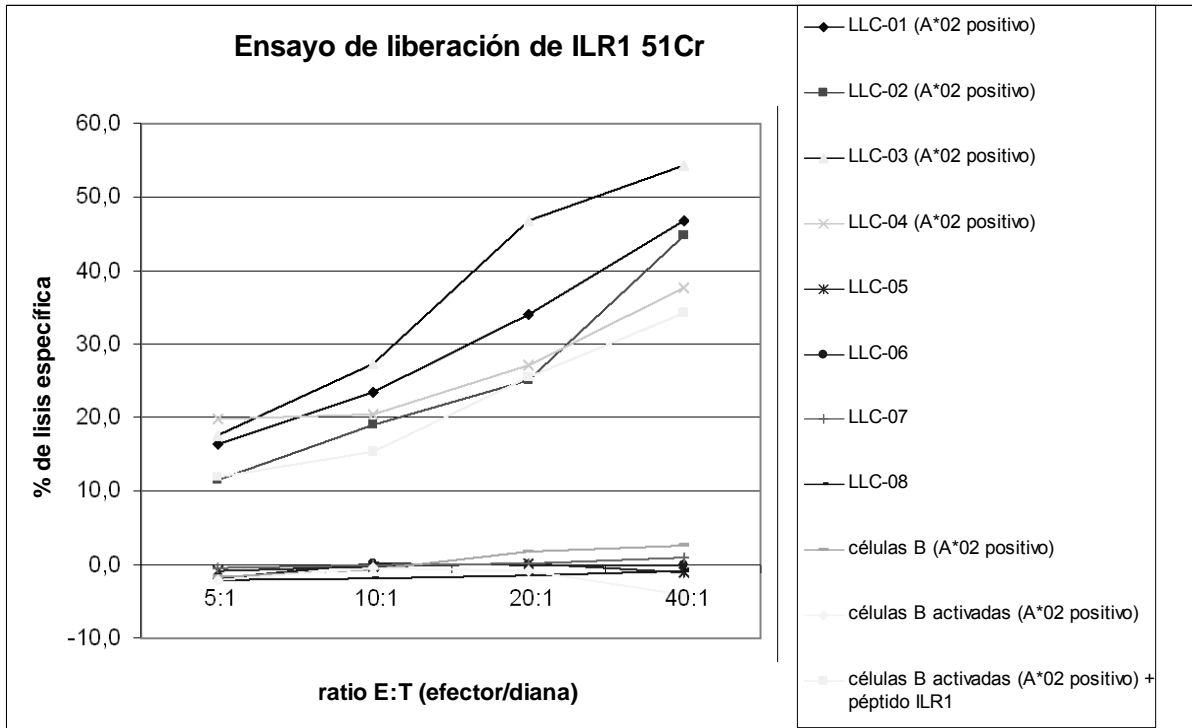


Figura 3

(A)



(B)

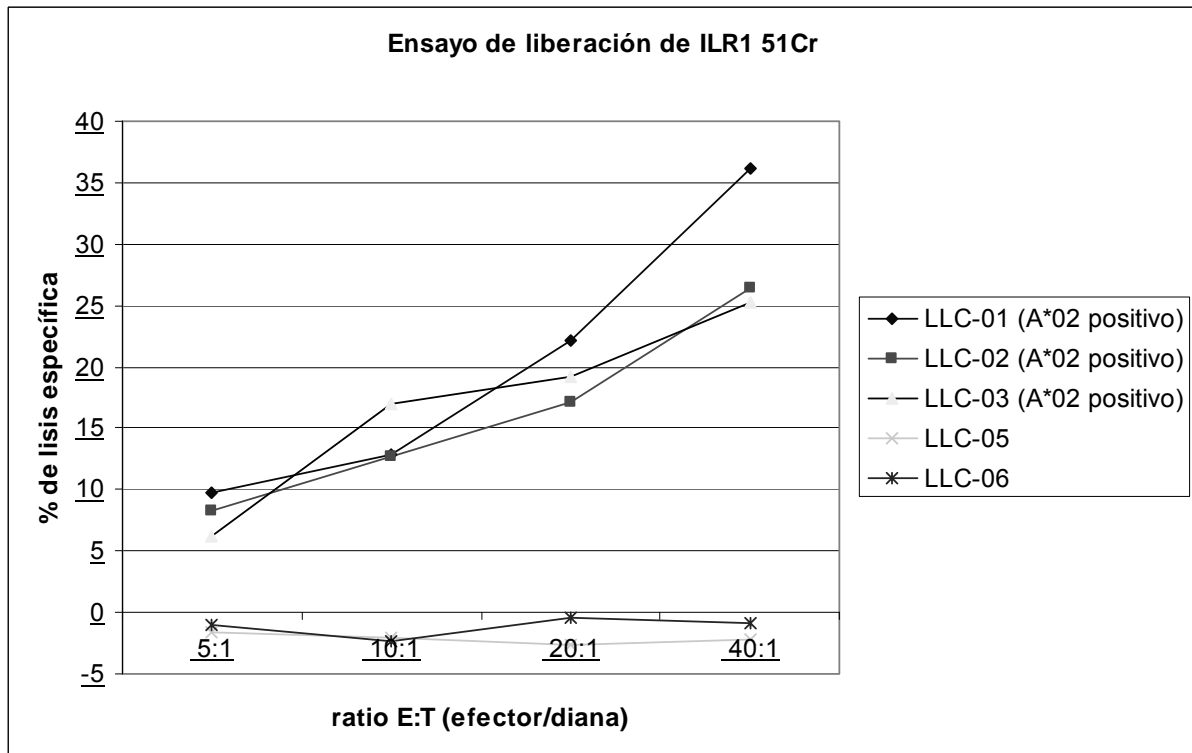
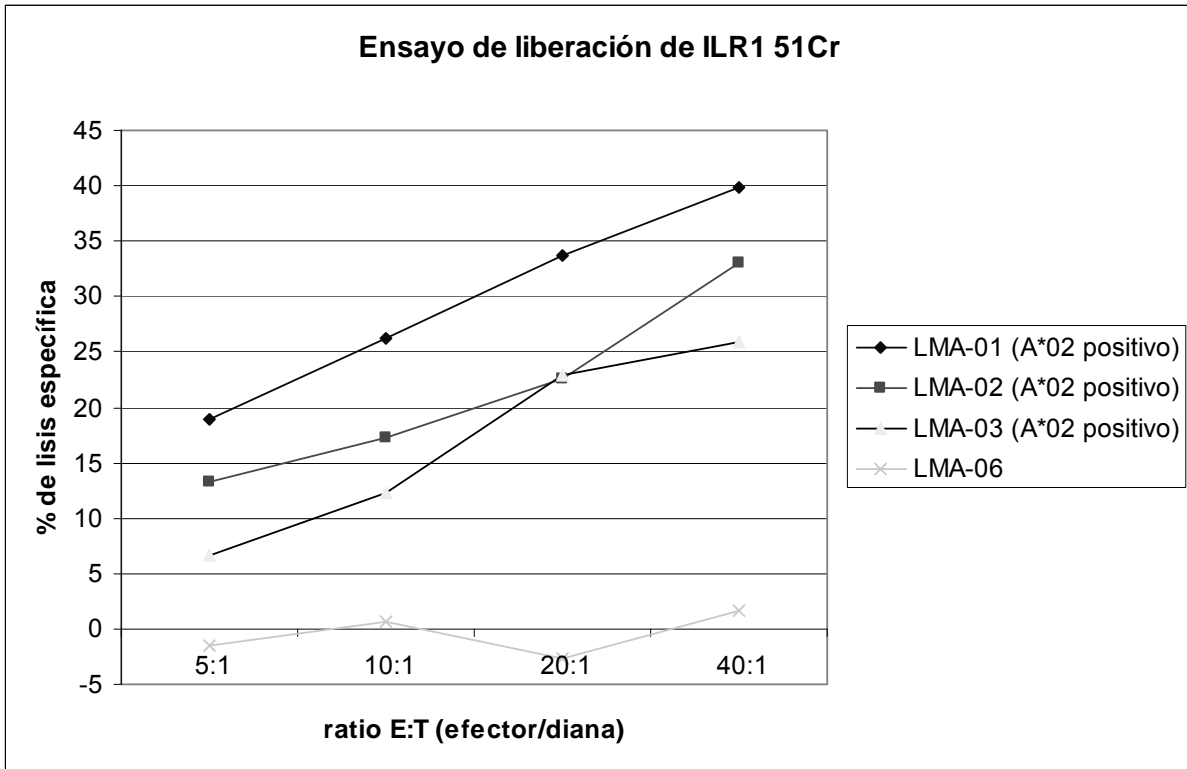


Figura 4

(A)



(B)

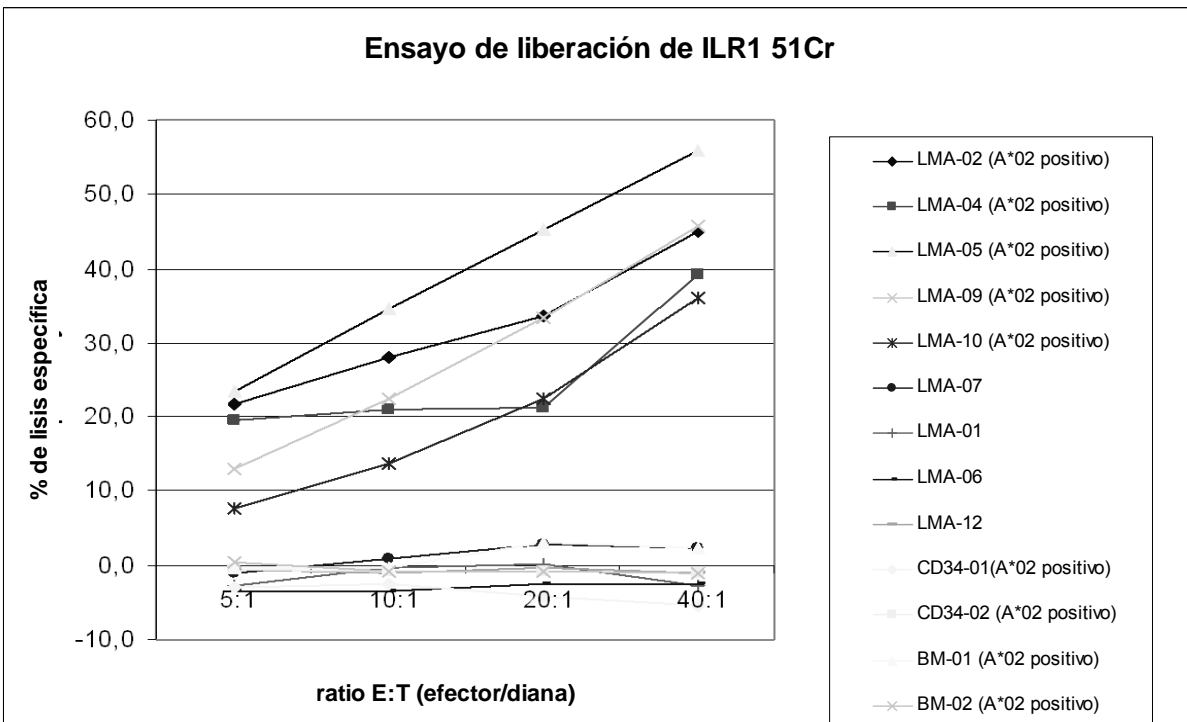


Figura 5A

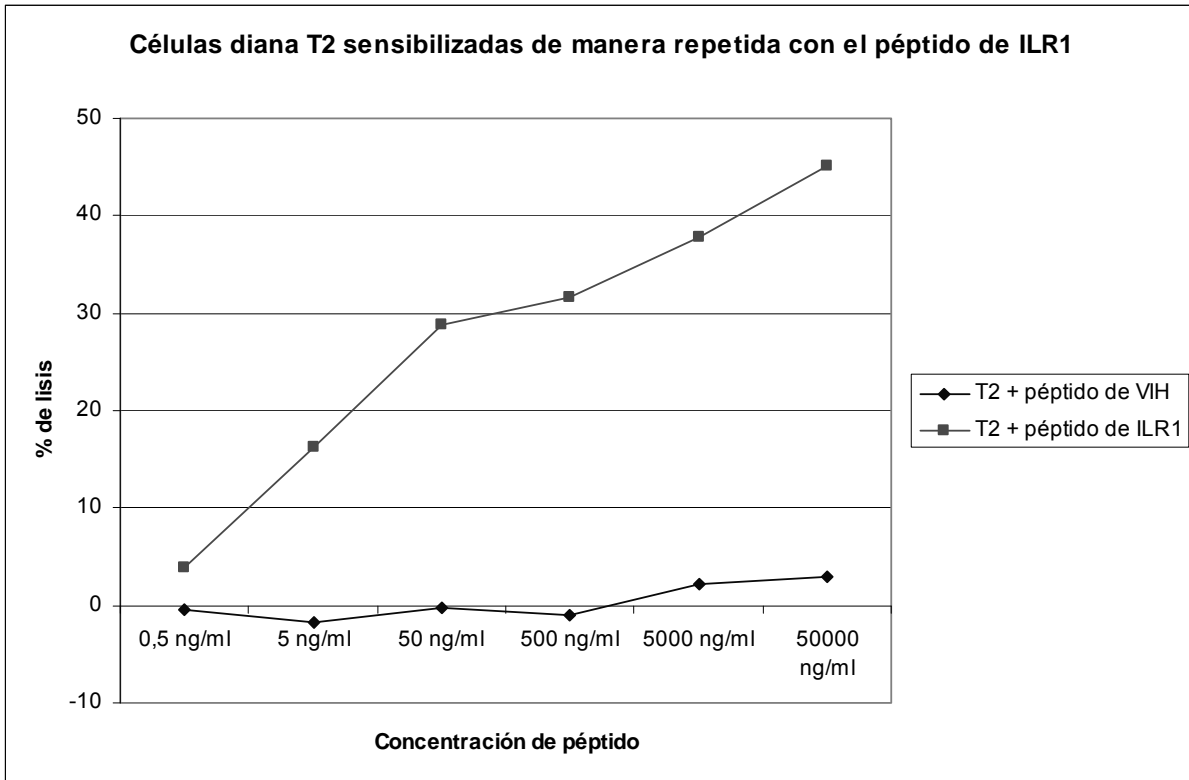


Figura 5B

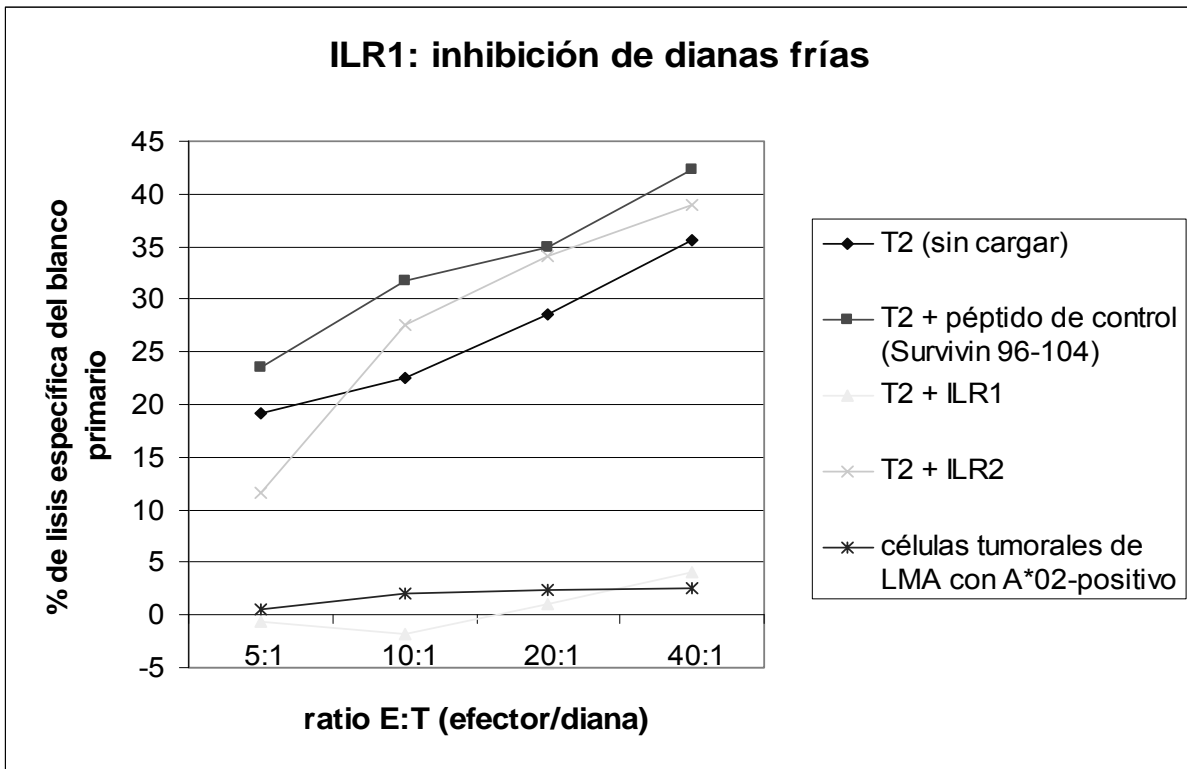


Figura 6

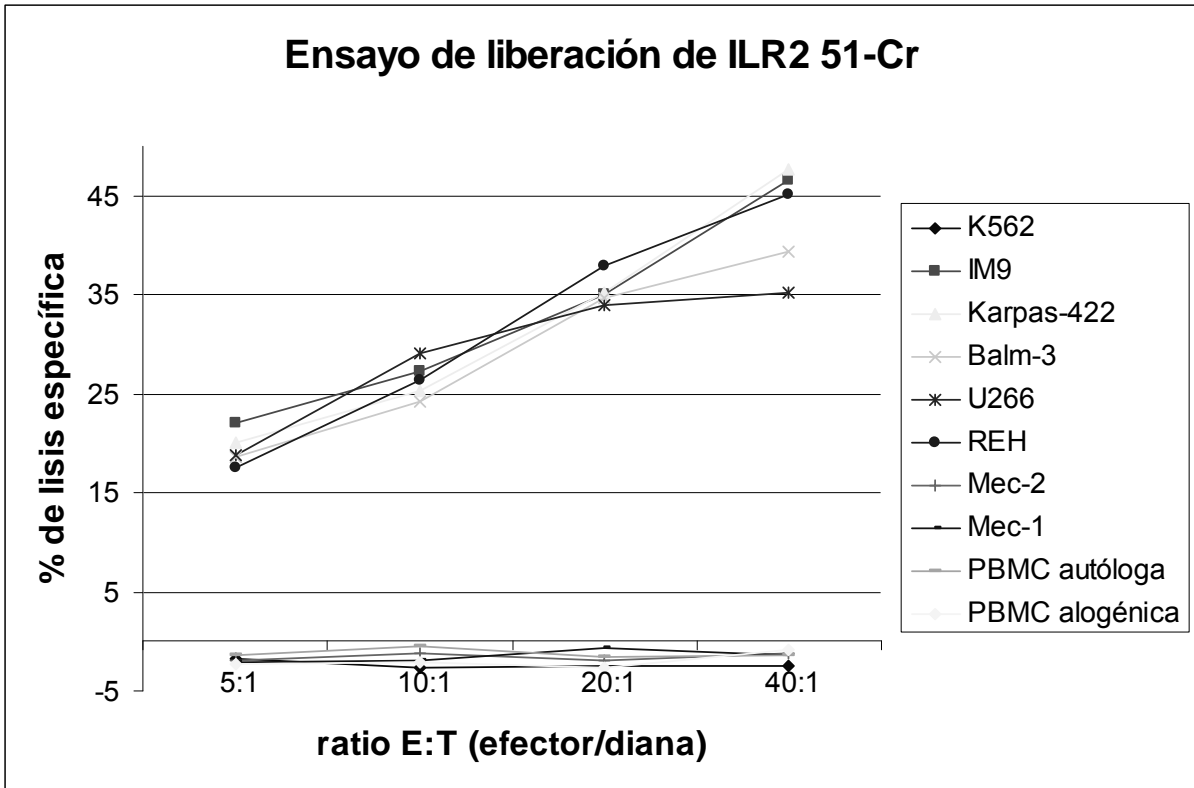


Figura 7

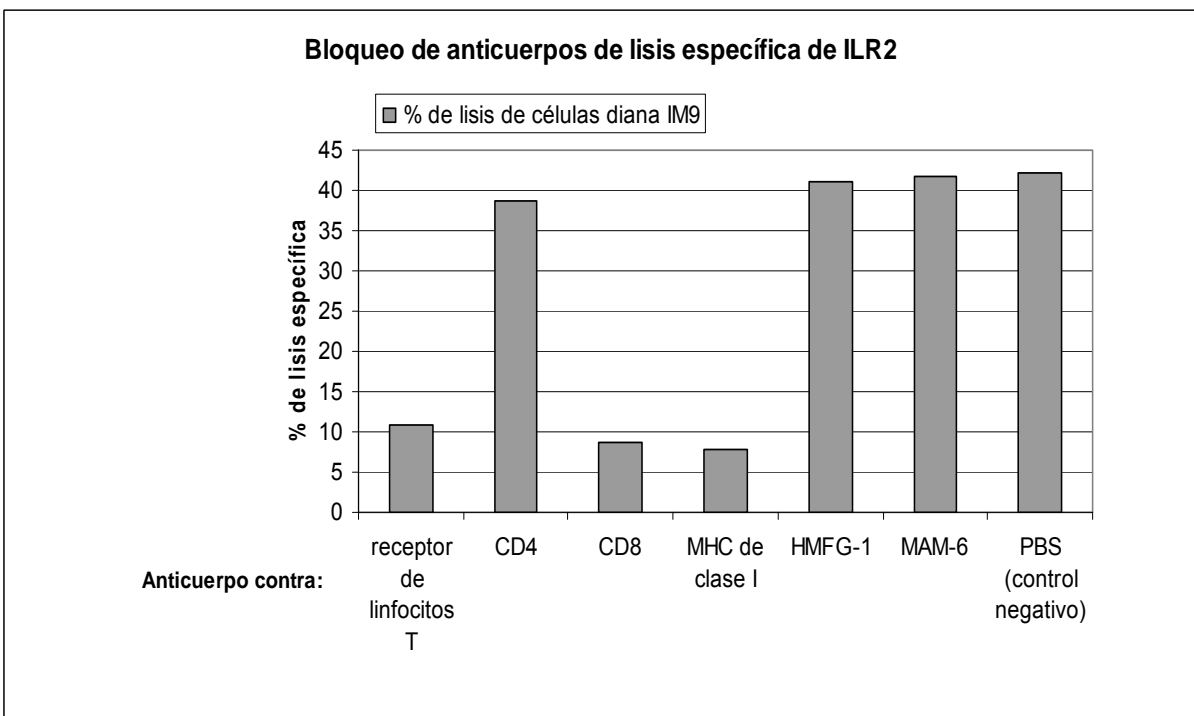
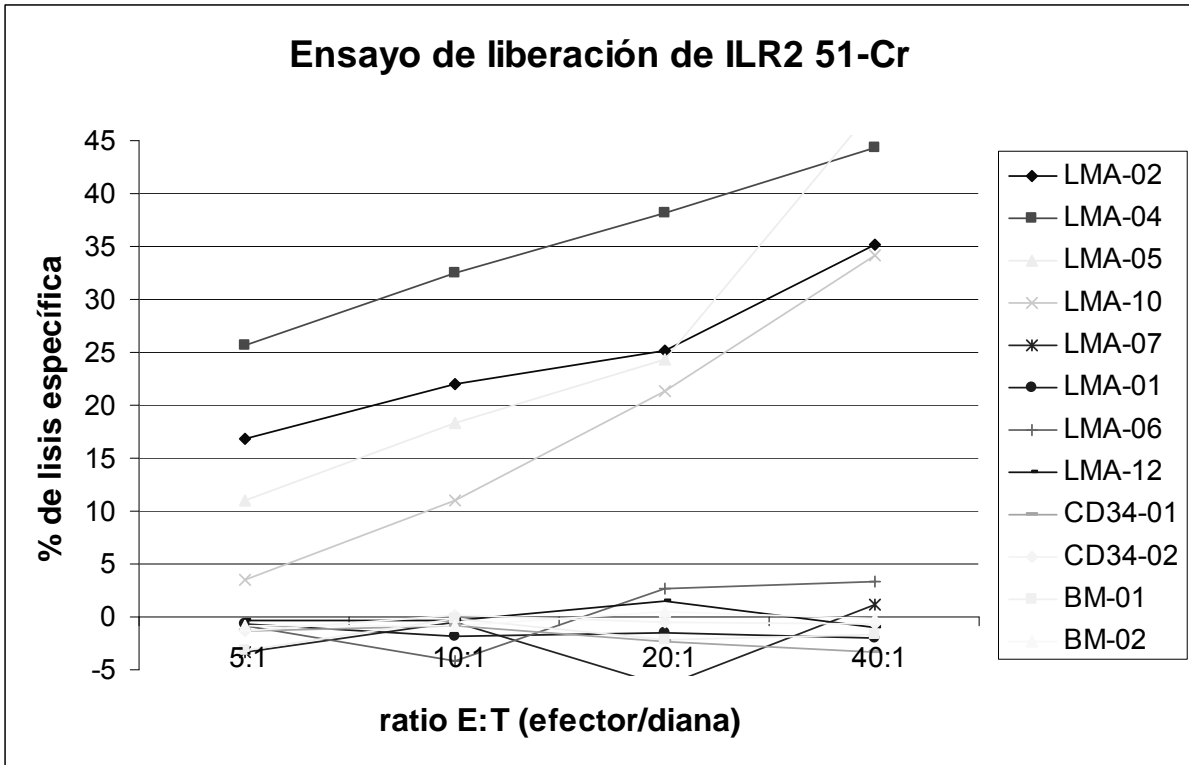


Figura 8

(A)



(B)

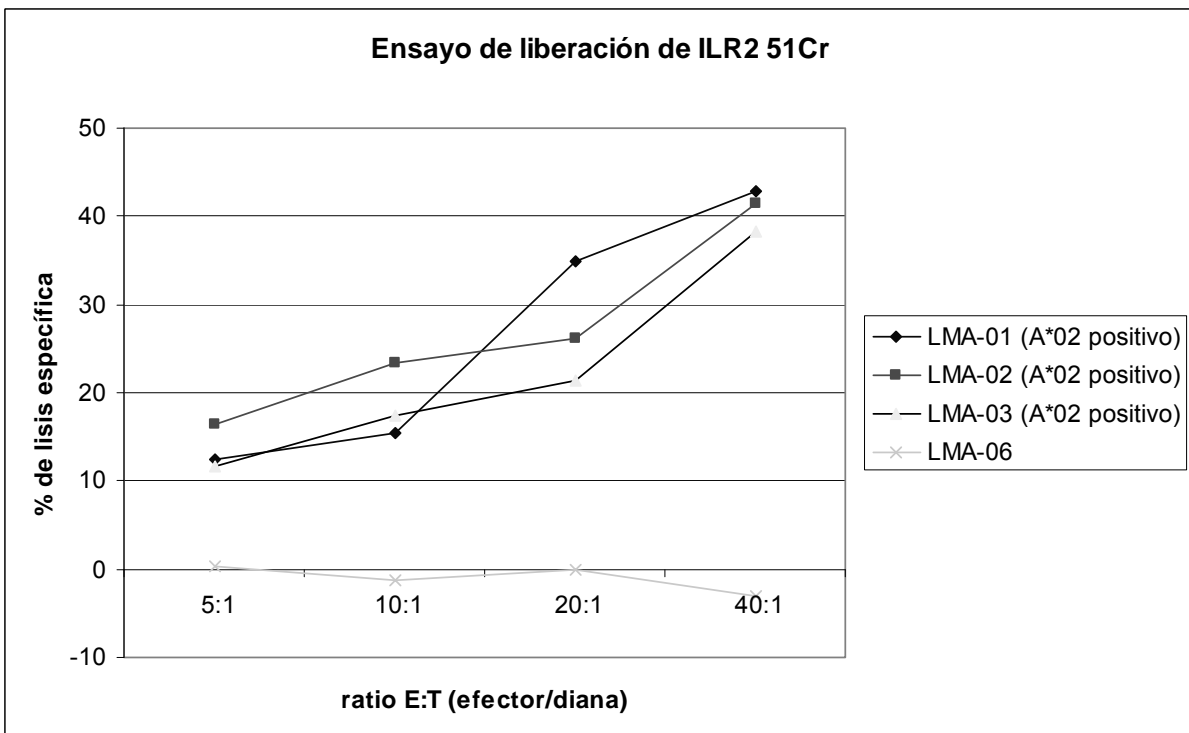
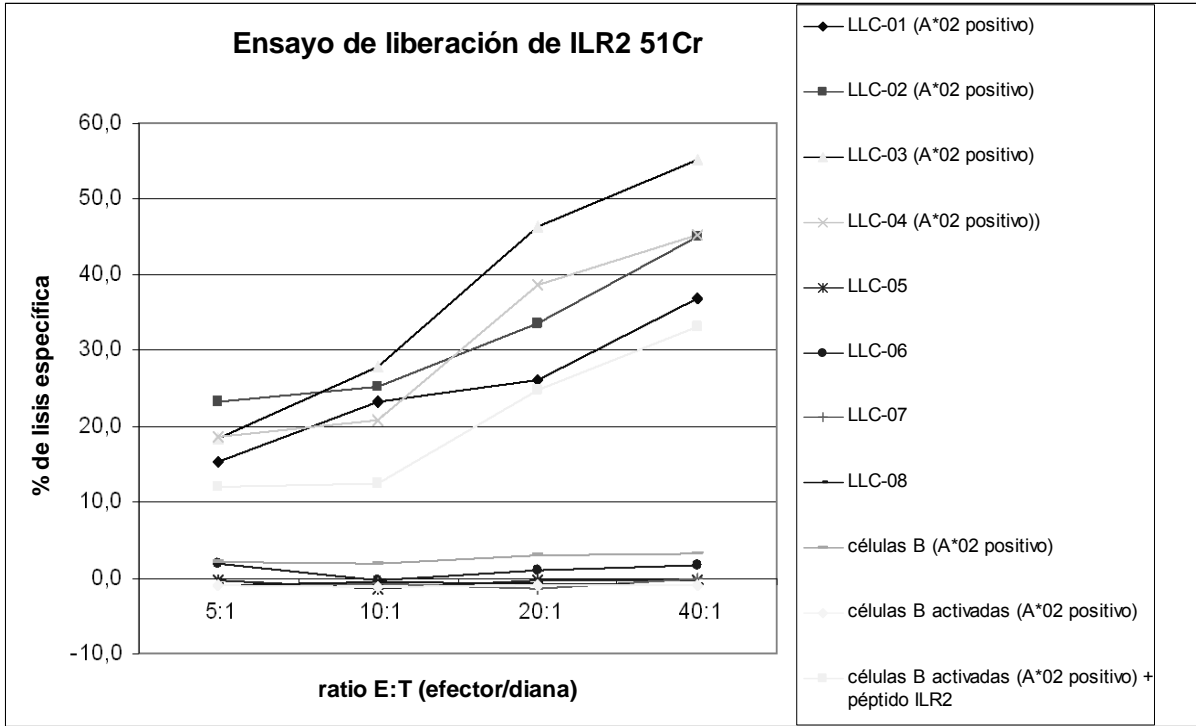
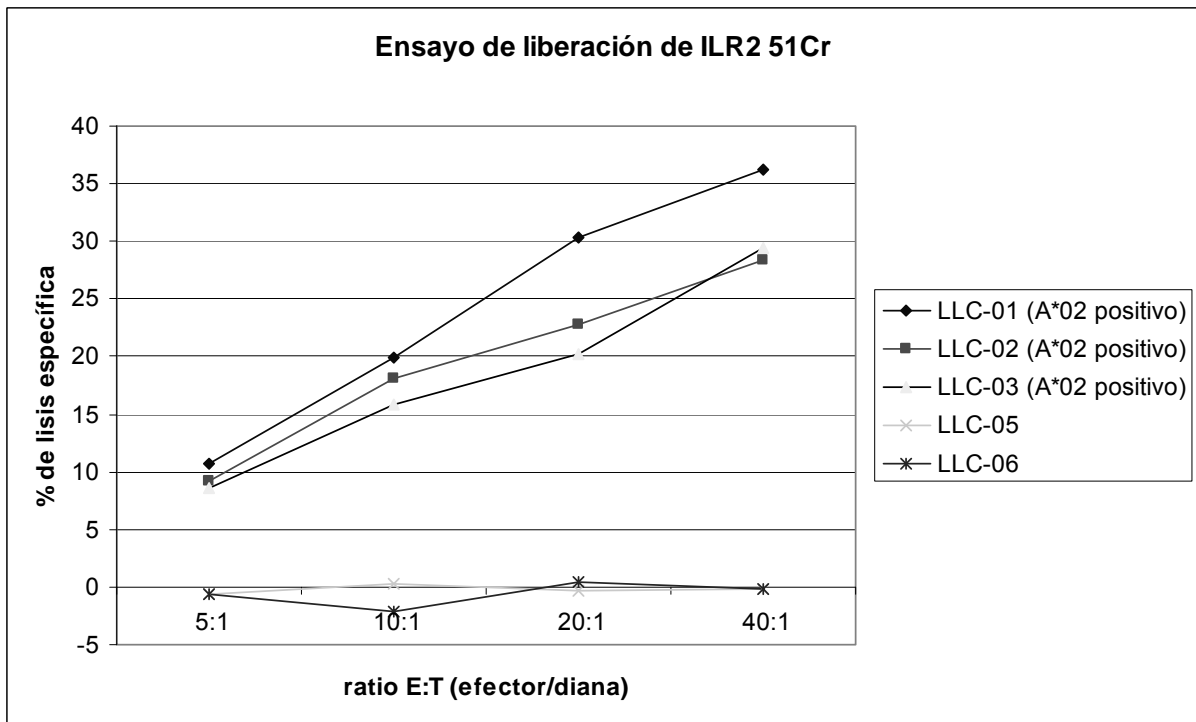


Figura 9

(A)



(B)



0

Figura 10A

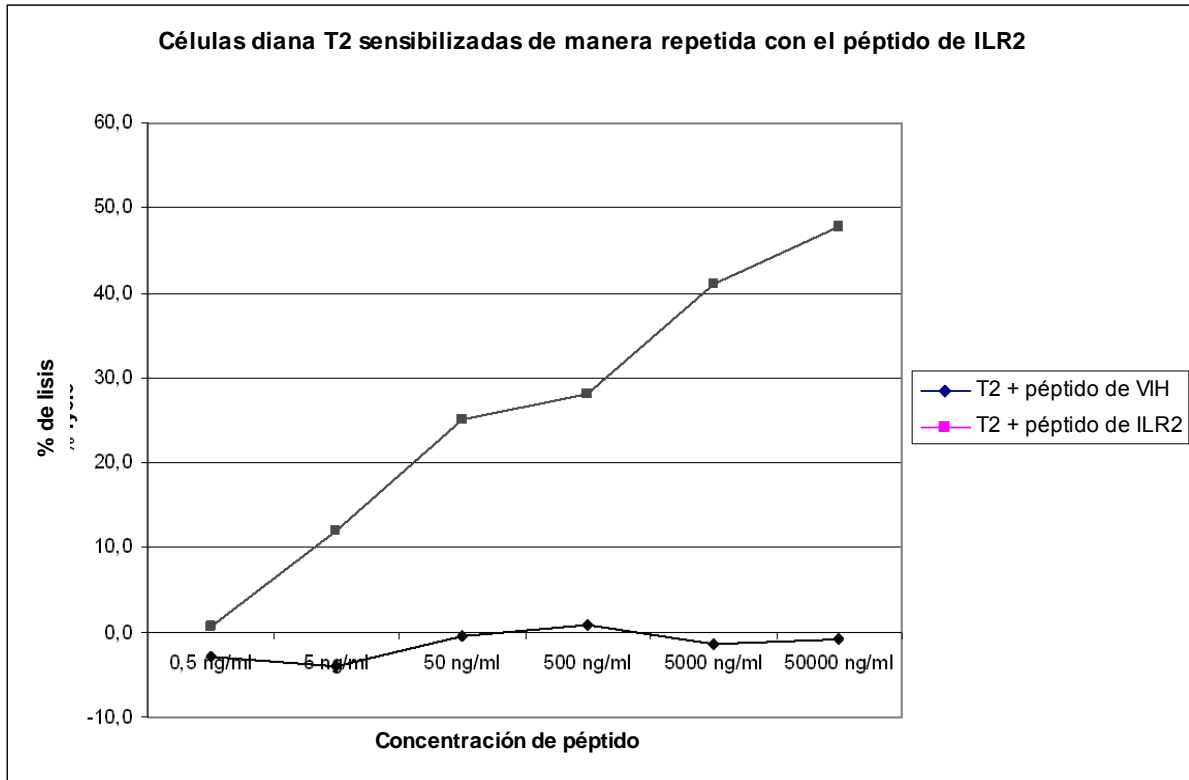


Figura 10B

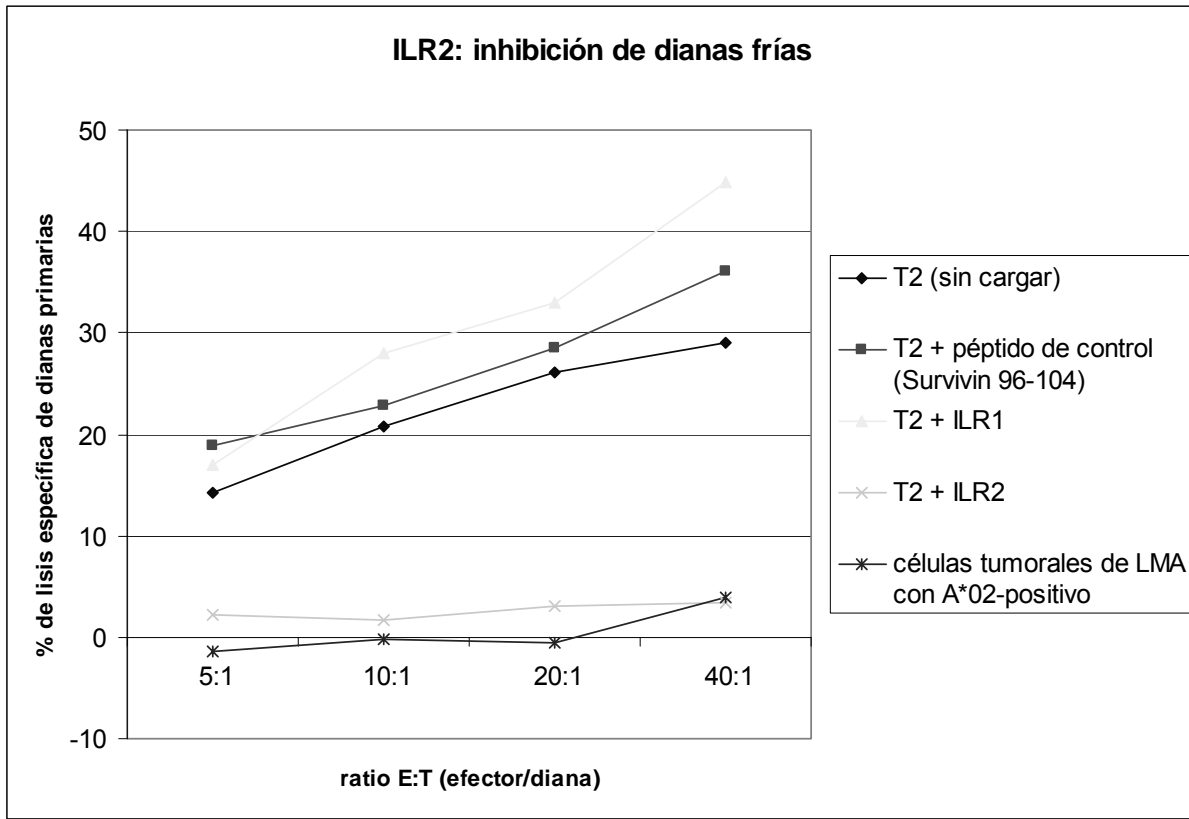
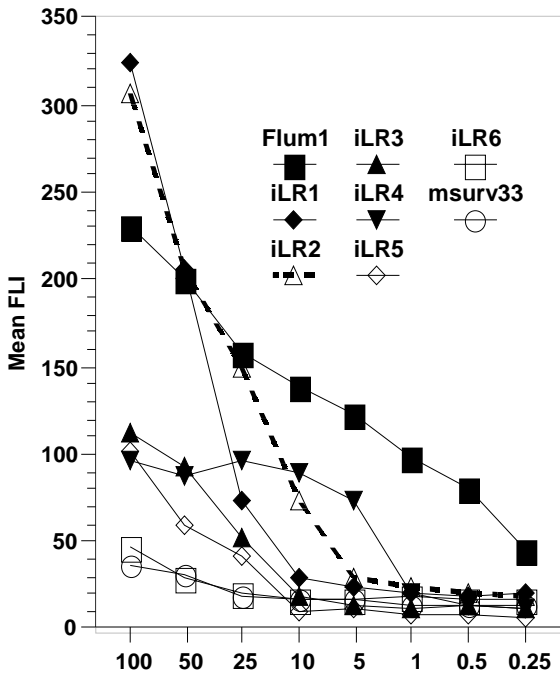
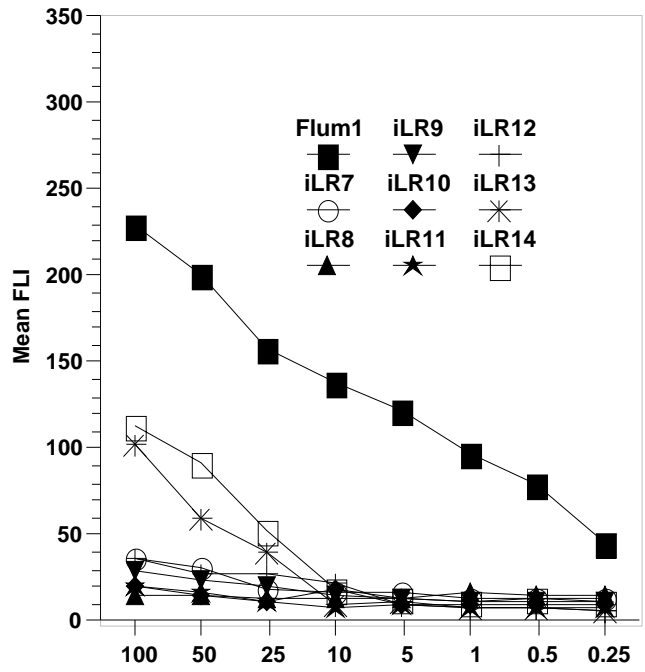


Figura 11A



Concentración del péptido (micromol)
Mean FLI = FLI medio

Figura 11B



Concentración del péptido (micromol)