

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 907**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09011319 .2**  
96 Fecha de presentación: **05.09.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2135878**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **PÉPTIDOS ASOCIADOS A TUMORES UNIDOS PROMISCUAMENTE A MOLÉCULAS DEL ANTÍGENO DE LEUCOCITO HUMANO (HLA) DE CLASE II.**

30 Prioridad:  
**05.09.2005 EP 05019254**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2012**

73 Titular/es:  
**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH  
PAUL-EHRLICH-STRASSE 15  
72076 TÜBINGEN, DE**

72 Inventor/es:  
**Dengjel, Jörn**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 907 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos asociados a tumores unidos promiscuamente a moléculas del antígeno de leucocito humano (HLA) de clase II

5 La presente invención se refiere a métodos inmunoterapéuticos y a moléculas y a células para su uso en métodos inmunoterapéuticos. En concreto, la presente invención se refiere a la inmunoterapia del cáncer y, en particular, al cáncer renal y de colon. La presente invención se refiere, además, a epítomos peptídicos de linfocitos T colaboradores asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, que actúan como ingredientes activos de vacunas que estimulan las respuestas inmunológicas contra los tumores. En particular, 10 la presente invención se refiere a una secuencia peptídica novedosa derivada de moléculas HLA de clase II de líneas celulares tumorales humanas, que pueden ser usadas en la composición de vacunas para provocar respuestas inmunológicas antitumorales.

## Antecedentes de la invención

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

20 Determinados elementos de la respuesta inmunológica celular son capaces de reconocer y destruir células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos de poblaciones de células destructoras de tumores o de sangre periférica sugiere que estos linfocitos tienen un papel importante en la defensa inmunológica natural contra el cáncer (Cheever y col, «Annals N.Y. Acad. Sci.» 1993 690: 101-112). En particular, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (TCD8<sup>+</sup>), que reconocen péptidos que alojan moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de, normalmente, 8 a 10 residuos derivados de proteínas ubicadas en el citosol, tienen un papel importante en esta 25 respuesta. Las moléculas MHC humanas también se designan antígenos de leucocito humano (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de las células con un núcleo con péptidos resultantes de la división proteolítica de proteínas endógenas y péptidos más largos; las moléculas MHC de clase II, que sólo se encuentran en células profesionales presentadoras de antígenos (APC). Presentan péptidos de proteínas exógenas que son absorbidos por las APC durante el proceso de endocitosis y, posteriormente, son procesadas. Los complejos de péptido y MHC de clase I son reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. Los complejos de péptido y MHC de clase II son reconocidos por linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup>. 30

Los linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup> tienen un papel importante en la organización de las funciones efectoras de las respuestas antitumorales de los linfocitos T y, por esta razón, la identificación de epítomos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) puede ser de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunes antitumorales (Kobayashi H, R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta y E. Celis; 2002; *Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen*; «Clin. Cancer Res»; 8: 3219-3225. Gnjatic, S, D. Atanackovic, E. Jäger, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth y L. J. Old; 2003; *Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses*; «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.»; 100 (15): 8862-7). 35 40

En muestras de mamíferos como, por ejemplo, ratones, se mostró que, incluso en ausencia de linfocitos T citotóxicos (CTL) efectoras (es decir, de linfocitos T CD8<sup>+</sup>), los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son suficientes para inhibir la visualización de tumores por medio de la inhibición de la angiogénesis por secreción de interferón-γ (IFNγ) (Qin, Z. y T. Blankenstein; 2000; *CD4+ T-cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells*; «Immunity»; 12: 677-686). Adicionalmente, se mostró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que reconocen péptidos de antígenos asociados a tumores presentados por moléculas HLA de clase II pueden contrarrestar la progresión del tumor por medio de la inducción de un anticuerpo (Ac) (Kennedy, R. C, M. H. Shearer, A. M. Watts y R. K. Bright; 2003; *CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen*. «Cancer Res.» 63: 1040-1045). A diferencia de los péptidos asociados a tumores unidos a moléculas HLA de clase I, hasta ahora sólo se han descrito un pequeño número de ligandos de TAA de clase II ([www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org), [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)). Debido a que la expresión constitutiva de moléculas HLA de clase II normalmente está limitada a células del sistema inmune (Mach, B, V. Steimle, E. Martinez-Soria y W. Reith; 1996; *Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease*; «Annu. Rev. Immunol.»; 14: 301-331), no se consideró posible el aislamiento de péptidos de clase II directamente de tumores primarios. Por lo tanto, se han descrito numerosas estrategias para dirigir antígenos a la vía de procesamiento de 45 50 55 clase II de células presentadoras de antígenos (APC). Por ejemplo, la incubación de APC con el antígeno en cuestión

- 5 para permitir que sea absorbido, procesado y presentado (Chaux, P, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon y P. van der Bruggen; 1999; *Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes*; «J. Exp. Med.»; 189: 767-778); o la transfección de células con genes o minigenes codificantes del antígeno en cuestión y fusionados con la cadena invariante, que media en la translocación de antígenos al compartimento lisosomal de procesamiento y unión del MHC de clase II (MIIC).
- 10 Para que un péptido provoque una respuesta inmunológica celular, debe estar unido a una molécula MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de polimorfismos específicos de la secuencia de los aminoácidos del péptido. Los péptidos de unión a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 residuos y contienen dos residuos conservados en su secuencia que interaccionan con el surco de unión correspondiente de la molécula MHC.
- 15 En ausencia de inflamación, la expresión de moléculas MHC de clase II está restringida principalmente a células del sistema inmune, especialmente a células profesionales presentadoras de antígenos (APC) como, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos o células dendríticas.
- 20 Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, es decir, sus epítomos, pueden ser moléculas derivadas de cualquier tipo de proteína como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. Además, los antígenos asociados a tumores, por ejemplo, pueden estar presentes sólo en células tumorales, como productos de genes mutados o a partir de marcos de lectura abiertos (ORF) alternativos o del empalme de proteínas (Vigneron, N, V. Stroobant, J. Chapiro, A. Ooms, G. Degiovanni, S. Morel, P. van der Bruggen, T. Boon, B. J. van den Eynde; *An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome*; «Science»; 23 de abr. 2004; 304 (5670): 587-90). Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son las estructuras específicas de tejidos, como los antígenos CT (testículo canceroso) que son expresados en distintos tipos de tumor y en tejido sano del testículo.
- 25 Se han identificado diversos antígenos asociados a tumores. Además, se están dedicando muchos esfuerzos a la identificación de antígenos adicionales asociados a tumores. Algunos grupos de antígenos asociados a tumores, también llamados por los expertos «antígenos específicos de tumor», son específicos de tejidos. Algunos ejemplos incluyen, sin limitarse a ellos, la tirosinasa para el melanoma, el PSA y PSMA para el cáncer de próstata y los cruzamientos cromosómicos, como el bcr/abl, en el linfoma. Sin embargo, muchos de los antígenos asociados a tumores que se han identificado tienen lugar en muchos tipos de tumores y, algunos, como las proteínas oncogénicas y/o los genes supresores de tumores (los genes supresores de tumores para el cáncer renal, por ejemplo, son analizados en Linehan, W. M, M. M. Walther, B. Zbar; *The genetic basis of cancer of the kidney*; «J Urol»; dic. 2003;170 (6 Pt 1): 2163-72), que son los que realmente causan el evento de transformación, tienen lugar en casi todos los tipos de tumor. Por ejemplo, las proteínas celulares normales que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, como las p53 (que es un ejemplo de gen supresor de tumor), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones y resultar en una regulación hacia arriba de la expresión de estos productos genéticos, transformándolos así en oncogénicos (McCartey y col; «Cancer Research»; 1998; 15: 58 2601-5. Disis y col; «Ciba Found. Symp»; 1994; 187: 198-211). Estas proteínas mutantes pueden ser el blanco de una respuesta inmune específica de tumor en muchos tipos de cáncer.
- 30 Para que las proteínas puedan ser reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos de tumor y para que se puedan utilizar en terapia, deben cumplirse una serie de requisitos. El antígeno debe estar expresado principalmente por células tumorales, y no por tejidos sanos normales o en pequeñas cantidades. También es deseable, no sólo que el antígeno correspondiente esté presente en un tipo de tumor, sino que, además, aparezca en concentraciones altas (en número de copias por célula, por ejemplo). La presencia de epítomos en la secuencia de aminoácidos del antígeno es esencial, ya que el péptido («péptido inmunógeno») que deriva de un antígeno asociado a un tumor debe inducir una respuesta de los linfocitos T in vitro o in vivo.
- 35 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, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon y P. van der Bruggen; 1999; *J. Exp. Med*; 189, 767-778). Otras estrategias usan las proteínas de fusión, que contienen secuencias blanco lisosomales. Expresadas en APC, estas proteínas de fusión dirigen a los antígenos al compartimento de procesamiento de clase II (Marks, M. S, P. A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P. J. Peters y J. S. Bonifacino; 1995; *J. Cell Biol*; 131, 351-369. Rodríguez, F, S. Harkins, J. M. Redwine, J. M. de Pereda y J. L. Whitton; 2001; *J. Virol*; 75, 10421-10430).
- 40 En la inmunización contra los tumores, los linfocitos T colaboradores desempeñan una función importante en la organización de la función efectora de los CTL. Los epítomos de linfocitos T colaboradores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T colaboradores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra células tumorales que presentan MHC/péptidos asociados a tumores en sus superficies. De esta forma, los epítomos peptídicos de linfocitos T colaboradores asociados a

tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden actuar como ingredientes activos de vacunas que estimulen las respuestas inmunológicas contra los tumores.

5 La tarea principal en el desarrollo de una vacuna tumoral es, por tanto, la identificación y caracterización de novedosos antígenos asociados a tumores y epítomos inmunógenos de linfocitos T colaboradores derivados de ellos que puedan ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD4<sup>+</sup>. Un objeto de la presente invención es, por tanto, proporcionar novedosas secuencias de aminoácidos para el péptido que tiene la habilidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase II.

10 El documento WO 99/32620 describe péptidos con propiedades de proliferación y protección celular. Preferiblemente, estos péptidos tendrán una longitud de entre 61 y 115 aminoácidos. A pesar de esto, SEQ ID n.º 47 del documento WO 99/32620 describe una secuencia 21mer específica, a saber: HPLHSKIIIIKKGHAKDSQRY. La SEQ ID n.º 47 es utilizada como «bloque de construcción» para péptidos más grandes, como los que se utilizan en la terapia contra el cáncer. No obstante, la función de los péptidos en el documento WO 99/32620 es diferente de la actividad inmunológica que se describe en la presente invención.

15 La obra de SCHMID MICHAEL et al., «Insulin-like growth factor binding protein-3 is overexpressed in endothelial cells of mouse breast tumor vessels». INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 103, n.º 5, 20 de febrero de 2003 (20-2-2003), páginas 577-586, no revela secuencias de péptidos específicos, y sólo menciona el IGFBP-3 como un marcador potencial de tumores, puesto que la proteína aparece sobreexpresada en células endoteliales malignas de ratones.

20 Conforme a la presente invención, este objeto se disuelve con un péptido asociado a un tumor, donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos HSKIIIIKKGHAKDSQ, según la SEQ ID n.º 25. El péptido tiene la habilidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase II.

25 En la presente invención, los inventores demuestran que es posible aislar y caracterizar péptidos unidos a moléculas HLA de clase II directamente de tumores de mamíferos, preferiblemente humanos y sólidos como, por ejemplo, de carcinomas de células renales y carcinomas de colon. Los monocitos de infiltración expresaron moléculas MHC de clase II así como células tumorales y, además, las células tumorales mostraron una regulación hacia arriba de varios productos génicos inducidos por citocina o quimiocina como, por ejemplo, productos génicos inducidos por interferón-γ.

30 La presente invención describe péptidos provenientes de antígenos asociados a la génesis de tumores y con la habilidad de unirse a moléculas HLA de clase II para desencadenar una respuesta inmune de leucocitos humanos, especialmente linfocitos T o linfocitos T CD4<sup>+</sup> o linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediadores de respuestas inmunes de tipo TH1. Los péptidos provienen de antígenos asociados a tumores, especialmente con funciones en los procesos de, por ejemplo, proteólisis, angiogénesis, crecimiento celular, regulación de ciclo celular, división celular, regulación de la transcripción, regulación de la traducción o invasión de tejidos, como, por ejemplo, péptidos asociados a tumores a partir de la metaloproteínasa 7 de la matriz (MMP7; SEQ ID No. 1) y de la proteína de unión 3 del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP3; SEQ ID No. 25).

35 En la presente invención, los inventores también proporcionan pruebas definitivas de que los péptidos asociados a tumores unidos de forma promiscua a moléculas HLA de clase II, especialmente a los alelos HLA de clase II codificados genéticamente por locus HLA-DR del genoma humano, son capaces de provocar respuestas inmunes mediadas por linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos. Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica humana, demostrándose que los péptidos en cuestión son adecuados para desencadenar respuestas de linfocitos T del sistema inmune humano contra péptidos seleccionados del peptidoma de la célula tumoral. Teniendo en cuenta que los péptidos pueden ser sintetizados químicamente y usados como ingredientes activos de preparaciones farmacéuticas, los péptidos proporcionados por la presente invención pueden ser usados para inmunoterapia, preferiblemente para inmunoterapia del cáncer.

40 Con el fin de identificar ligandos de HLA de clase II de TAA para el desarrollo de inmunoterapia basada en péptidos, los inventores intentaron aislar péptidos presentados por HLA-DR directamente de tumores sólidos diseccionados, en particular de carcinoma de células renales (RCC), de los que se ha informado que pueden expresar moléculas de clase II (Gastl, G, T. Ebert, C. L. Finstad, J. Sheinfeld, A. Gomahr, W. Aulitzky y N. H. Bander; 1996; *Major histocompatibility complex class I and class II expression in renal cell carcinoma and modulation by interferon gamma*; «J. Urol.» 155: 361-367). Incluso aunque la mayoría de las células tumorales sean de clase II negativa, los espectómetros de masas habituales deben proporcionar la sensibilidad requerida para identificar péptidos de clase II a partir de números mínimos de células tumorales o de leucocitos de infiltración que puedan presentar de forma cruzada TAA o de células del estroma en el perímetro del tumor en crecimiento.

55 Las razones para centrarse en el RCC para demostrar técnicamente el concepto fueron las siguientes: alrededor de 150.000 personas en todo el mundo son diagnosticadas cada año de RCC. La enfermedad está asociada a una

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

Durante el trabajo científico de preparación de la presente invención, los inventores pudieron aislar ligandos de clase II de diez muestras de RCC, tres carcinomas colorrectales (CCA) y un carcinoma de células transicionales (TCC). Solo algunos ligandos seleccionados de TAA identificados por medio de este enfoque poseen la capacidad de:

- 20
1. provenir de antígenos con una asociación tumoral conocida;
  2. estar unidos al alelo HLA-DR de clase II más común, el HLA DRB1\*0101; y
  3. tener características que les diferencian de la mayoría de los ligandos de HLA de clase II, de forma que cumplen con los criterios con respecto a su secuencia de aminoácidos primaria que les permite unirse promiscuamente a moléculas HLA-DR a partir de, al menos, dos alelos diferentes.

25 Tal y como se ejemplificó con un péptido de MMP7 (SEQ ID n.º 1), se descubrió que estos péptidos asociados a tumores y unidos promiscuamente a HLA-DR son reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Un primer aspecto de la invención proporciona un péptido compuesto por una secuencia de aminoácidos conforme a la secuencia SEQ ID n.º 25 (para los números de registro, véase la tabla adjunta más abajo).

30 Tal y como se describe más abajo, el péptido que forma la base de la presente invención ha sido identificado por ser presentado por células portadoras de MHC de clase II (RCC). Por tanto, este péptido, así como otros péptidos que contengan la secuencia (a saber, péptidos derivados), provocará una respuesta específica de los linfocitos T, si bien el alcance de dicha respuesta podría variar de un péptido a otro. Podrían producirse diferencias por mutaciones en el mencionado péptido, por ejemplo (véase más abajo). El experto en la materia conoce bien los métodos que se pueden aplicar para determinar el alcance de una respuesta inducida por un péptido individual, en particular con respecto a los ejemplos contenidos aquí y en la literatura sobre la materia.

35 Preferentemente, el péptido conforme a la presente invención consiste en una secuencia de aminoácidos conforme a la secuencia SEQ ID n.º 25.

40 Las cadenas laterales de uno o dos de los residuos de aminoácidos pueden ser 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 de la misma forma que un péptido que consista en la secuencia de aminoácidos dada. Por ejemplo, un péptido puede modificarse de forma que al menos mantenga, o incluso mejore, la habilidad para interactuar y unir una molécula MHC apropiada, como la HLA-A, y de forma que al menos mantenga, o incluso mejore, la habilidad para generar CTL activado que reconozca y mate células que expresen 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 de unión de HLA-A son residuos conservados que forman una secuencia central que se ajusta al motivo de unión del surco de unión del HLA.

45 Aquellos 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 a la reactividad del linfocito T ni elimine la unión con el MHC relevante.

50 Se sabe, además, que los péptidos presentados por MHC de clase II están compuestos de una «secuencia central» con un determinado motivo de aminoácidos específico de HLA y, opcionalmente, extensiones N- y/o C-terminal que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, son considerados irrelevantes en la interacción del péptido y el linfocito T). El péptido puede ser usado o bien directamente, para cargar moléculas MHC de clase II, o bien la secuencia puede ser clonada en los vectores según la descripción que se detalla más abajo.

Si un péptido que es mayor de unos 12 residuos de aminoácidos es usado directamente para unirse a una molécula MHC, se prefiere que los residuos que flanquean la región central de unión de HLA sean los que no afecten a la habilidad del péptido de unirse específicamente al surco de unión de la molécula MHC o de presentar al péptido al CTL.

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

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

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

30 Normalmente, el péptido de la invención es aquel que, si está expresado en una célula presentadora de antígenos, puede ser procesado de forma que se produce un fragmento capaz de unirse a una molécula MHC adecuada y puede ser presentado por la célula apropiada y provocar una respuesta de linfocitos T adecuada. Se apreciará que, en algunas aplicaciones, el péptido pueda ser usado directamente (es decir, no es producido por expresión de un polinucleótido en la célula de un paciente o en una célula administrada a un paciente).

35 El péptido de la invención es capaz de unirse al HLA-DR. En particular, se prefiere que el péptido se una de forma selectiva al HLA-DRB1\*0101.

40 El péptido de la invención es particularmente útil en métodos inmunoterapéuticos para detectar y destruir células que expresan de forma aberrante polipéptidos que forman la base del péptido de la presente invención. Debido a que el péptido específico está compuesto por la secuencia de aminoácidos dada, se prefiere que el péptido de la invención sea tal que se una a HLA-DR y que, una vez formado, el complejo HLA-DR-péptido, cuando esté presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada, sea capaz de provocar la producción de un CTL que reconozca una célula que exprese de forma aberrante un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos dada.

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

50 Los péptidos (al menos los que contienen enlaces peptídicos entre residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados por el modo de poliamida Fmoc de síntesis de péptidos de fase sólida, tal y como describen Lu y col. (1981) «J. Org. Chem» 46, 3433 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 de alta base lábil se lleva a cabo utilizando piperidina al 20% en N, N-dimetilformamida. Las funcionalidades de la cadena lateral pueden estar protegidas como sus butil éteres (en el caso de la serina treonina y de la tirosina), butil ésteres (en el caso del ácido glutámico y del ácido aspártico), derivado del butiloxycarbonilo (en el caso de la lisina y la histidina), derivado del tritilo (en el caso de la cisteína) y de 4-methoxy-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (en el caso de la arginina). En donde

- la glutamina o la asparagina son residuos C-terminales, se hace uso del grupo 4,4'-dimetoxibencihidrido para la protección de las funcionalidades amido de la cadena lateral. El apoyo de la fase sólida se basa en un polímero polidimetil-acrilamido constituido a partir de los tres monómeros dimetilacrilamido (monómero esqueleto), bisacriloletileno diamino (interconector) y acrilolsarcosino metil éster (agente funcionalizador). El agente ligado
- 5 divisible péptido-resina usado es el derivado del ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético ácido lábil. Todos los derivados de aminoácidos se añaden como sus derivados anhídridos simétricos preformados, con la excepción de la asparagina y la glutamina, que se añaden usando un procedimiento inverso de acoplamiento mediado por N, N-diciclohexil-carbodiimida/1hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección son controladas usando
- 10 procedimientos analíticos de isotina, ácido trinitrobenzenosulfónico o ninhidrina. Al completarse la síntesis, los péptidos se separan de la resina con eliminación concomitante de los grupos de protección de la cadena lateral por medio del tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% que contenga una mezcla depuradora al 50%. Los depuradores utilizados normalmente son 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, O. Marder, F. Albericio F; *From production of peptides in milligram amounts for research to multi-tons quantities for drugs of the future* «Curr Pharm Biotechnol.» Feb. de 2004; 5 (1): 29-43 y las referencias citadas en dicho documento).
- 15 El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío, con la posterior trituración con éter dietílico, proporcionando el péptido crudo. Los depuradores se eliminan por un procedimiento de extracción simple que, en la liofilización de la fase acuosa, proporciona un péptido crudo libre de depuradores. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden adquirir en Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, UK.
- 20 La purificación se puede realizar mediante técnicas, 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 por gradiente de agua/acetonitril.
- 25 El análisis de los péptidos puede llevarse a cabo por medio de la cromatografía en capa delgada, la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase invertida, el análisis de los aminoácidos después de la hidrólisis ácida, el análisis de espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos y el análisis de espectrometría de masa MALDI y ESI-Q-TOF.
- 30 Un aspecto más de la invención proporciona un ácido nucleico (es decir, un polinucleótido) que codifica el 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.
- 35 Se han desarrollado una variedad de métodos para ligar polinucleótidos, especialmente ADN, con vectores; por ejemplo, mediante extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, se pueden añadir extensiones complementarias del homopolímero al segmento de ADN que se vaya a insertar en el ADN vector. El vector y el segmento de ADN se unen entonces, mediante un enlace de hidrógeno, entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.
- 40 Los conectores sintéticos que contengan uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores. El segmento de ADN, generado por digestión de restricción de endonucleasa como se describió anteriormente, es tratado con la ADN polimerasa T4 bacteriófaga o la ADN polimerasa I de E. coli, enzimas que eliminan los extremos 3' monocatenarios con sus actividades exonucleolíticas 3'-5' y rellenan los extremos 3' con sus actividades de polimerización.
- 45 La combinación de estas actividades genera, por tanto, segmentos de ADN de extremo romo. Los segmentos de extremo romo se incuban entonces con exceso molar de moléculas de conexión, en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la unión de moléculas de ADN de extremo romo, como la ADN ligasa T4 bacteriófaga. Por tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN que portan secuencias de ligador polimérico en sus extremos. Estos segmentos de ADN son divididos entonces con la enzima de restricción apropiada y ligados a un vector de expresión que ha sido dividido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.
- 50 Los ligadores sintéticos que contienen una variedad de sitios de endonucleasa de restricción se pueden adquirir de diversas fuentes, incluyendo International Biotechnologies Inc, New Haven, CN, EE. UU.
- 55 Una forma deseable de modificar el ADN codificante del polipéptido de la invención es usar la reacción en cadena de la polimerasa descrita por Saiki y col. (1988) «Science» 239, 487-491. Este método puede usarse para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo manipulando los sitios de restricción apropiados, o puede usarse para modificar en ADN de otras formas útiles conocidas por los expertos en la materia. En este método, para que el ADN sea amplificado enzimáticamente es flanqueado por dos cebadores específicos que se incorporan al ADN amplificado. Estos cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción

que pueden ser usados para la clonación en vectores de expresión mediante métodos conocidos por los expertos en la materia.

5 El ADN (o, en el caso de los vectores retrovirales, el ARN) se expresa entonces en un huésped apropiado para producir un polipéptido de la invención. Así, el ADN que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención puede ser usado de acuerdo con técnicas conocidas, modificadas convenientemente en vista de las enseñanzas contenidas en la presente invención, para construir un vector de expresión que entonces es usado para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido de la invención. Dichas técnicas incluyen las descritas en las patentes de EE. UU. n.º 4.440.859, concedida el 3 de abril de 1984 a Rutter y col; 4.530.901, concedida el 23 de julio de 1985 a Weissman; 4.582.800, concedida el 15 de abril de 1986 a Crowl; 10 4.677.063, concedida del 30 de junio de 1987 a Mark y col; 4.678.751, concedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel; 4.704.362, concedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura y col; 4.710.463, concedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray; 4.757.006, concedida el 12 de julio de 1988 a Toole Jr. y col; 4.766.075, concedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel y col. y 4.810.648, concedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker.

15 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.

20 Generalmente, el ADN se inserta en un vector de expresión como, por ejemplo, un vector plasmídico, con la orientación adecuada y el marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, el ADN puede unirse a las secuencias adecuadas de nucleótidos de control regulador de traducción y transcripción reconocidas por el huésped deseado, aunque tales controles suelen estar disponibles en el vector de expresión. El vector se introduce entonces en el huésped mediante las técnicas habituales. Generalmente, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar las células huésped transformadas. Una de las técnicas de selección implica la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios, 25 que codifique un carácter seleccionable en la célula transformada como, por ejemplo, la resistencia a antibióticos.

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

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

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

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

45 Un vector plasmídico típico de células de mamíferos es el pSVL, que se puede adquirir en Pharmacia, Piscataway, NJ, EE. UU. Este vector usa el promotor tardío SV40 para llevar a cabo la expresión de los genes clonados, habiéndose encontrado el mayor nivel de expresión en las células productoras de antígenos T, como las células COS-1. Un ejemplo de vector de expresión inducible de mamífero es el pMSG, que también puede adquirirse en Pharmacia. Este vector usa el promotor inducido por glucocorticoide del duplicado del terminal largo del virus del tumor mamario del ratón para llevar a cabo la expresión del gen clonado. Los vectores plasmídicos de levadura pRS403-406 y pRS413-416 son útiles y, normalmente, pueden adquirirse en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. 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). Se conocen otros vectores y sistemas de expresión para ser usados con una variedad de células huésped.

55 La presente invención también hace referencia a una célula huésped transformada con un constructo vector polinucleótido de la presente invención. La célula huésped puede ser procariótica o eucariótica. En algunas circunstancias, las células bacterianas pueden ser preferentemente células huésped procarióticas y, normalmente, son una cepa de *E. coli* como, por ejemplo, las cepas *E. coli* DH5, que pueden adquirirse en Bethesda Research

Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1, que se puede adquirir en la *American Type Culture Collection* (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (No ATCC 31343). Las células huésped eucarióticas preferidas incluyen células de levadura, insectos y mamíferos y, con preferencia, células de vertebrados como, por ejemplo, de ratón, rata, mono o líneas celulares humanas de riñón o fibroblásticas. Las células huésped de levadura incluyen las YPH499, YPH500 y YPH501, que normalmente pueden adquirirse en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células huésped de mamíferos preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), disponibles en la ATCC, como CCL61; células embrionarias de ratón suizo NIH NIH/3T3, disponibles en la ATCC, como CRL 1658; células COS-1 derivadas de riñón de mono, disponibles en la ATCC, como CRL 1650 y 293 células de riñón embrionario humano. Las células de insecto preferida son las células Sf9 que pueden sufrir transfección con vectores de expresión de baculovirus.

La transformación de los huéspedes celulares apropiados con un constructo de ADN de la presente invención se lleva a cabo con métodos bien conocidos que suelen depender del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de las células huésped procarióticas, véase, por ejemplo, Cohen y col. (1972) «Proc. Natl. Acad. Sci.» EE. UU, 69, 2110 y *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* de Sambrook y col. (1989) «Cold Spring Harbor Laboratory», Cold Spring Harbor, NY. La transformación de las células de levadura se describe en *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual* de Sherman y col. (1986) «Cold Spring Harbor» NY. También es útil *The method of Beggs* (1978) «Nature» 275, 104-109. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles para la transfección de dichas células como, por ejemplo, el fosfato cálcico y el dextran DEAE o las formulaciones de liposomas, se pueden adquirir en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. 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 el péptido 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 del péptido son las s.c, i.d, i.p, i.m e i.v. Las formas preferidas de inyección de ADN son las i.d, i.m, s.c, i.p e i.v. Se usarán dosis de entre 1 y 500 mg de péptido o ADN.

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

También se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. 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 una célula de cáncer o de tumor.

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 CD4. Sin embargo, la estimulación es más eficiente con la ayuda de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Así, las secciones de fusión de una molécula híbrida proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. 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.

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 del péptido conforme a 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, 11 o incluso más péptidos. Véase más abajo).

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.

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.

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, EE. UU.), derivado de la saponina; extractos micobacterianos y pared bacteriana mimética sintética y adyuvantes registrados como el Detox. Quil A, otro adyuvante derivado de la saponina, también puede ser usado (Superfos, Dinamarca). Se prefiere que la vacuna de ácidos nucleicos se administre sin adyuvantes. Otros adyuvantes, como el adyuvante de Freund, también pueden ser útiles. También puede ser útil administrar el péptido conjugado con la hemocianina de lapa californiana, preferentemente también con un adyuvante.

- 5 La terapia de inmunización contra el cáncer por medio de un polinucleótico 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 de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención.
- 10 Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de un péptido conforme a la invención, o de un polinucleótido o vector de expresión que codifique dicho péptido, para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune, concretamente una respuesta inmune celular y, más concretamente, una respuesta inmune mediada por linfocitos T contra células de tumores sólidos que expresan una molécula humana MHC de clase II en su superficie y presentan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. En el
- 15 contexto de la presente invención se ha descubierto de forma inesperada que las células de tumores sólidos, en comparación con las células sanas del mismo tejido, expresan la molécula humana HLA de clase II en su superficie.
- Otro aspecto de la invención proporciona, por lo tanto, 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 II con carga de antígenos, expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígenos adecuada durante un
- 20 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.
- Apropiadamente, los CTL son linfocitos colaboradores CD4<sup>+</sup>, con preferencia de tipo TH1. Las moléculas MHC de clase II pueden ser expresadas en la superficie de cualquier célula adecuada. Se prefiere que dicha célula no exprese de forma natural moléculas MHC de clase II (en cuyo caso, se realiza la transfección en la célula para que
- 25 exprese dicha molécula) o, si lo hace, sea defectuosa en las vías de procesamiento o de presentación de los antígenos. En este sentido, es posible que la célula que expresa la molécula MHC de clase II sea sensibilizada completamente con un antígeno del péptido antes de activar los CTL.
- La célula presentadora de antígenos (o célula estimulante) se caracteriza por tener en su superficie una molécula MHC de clase II y, preferentemente, no ser capaz de realizar por sí misma la carga de dicha molécula con el
- 30 antígeno seleccionado. Tal y como se describe más abajo, la molécula MHC de clase II puede cargarse fácilmente in vitro con el antígeno seleccionado.
- Preferentemente, la célula del mamífero carece o tiene un nivel o función reducida del transportador peptídico TAP. Entre las células adecuadas que carecen del transportador TAP se incluyen las T2, RMA-s y Drosophila. TAP es el transportador asociado al procesamiento antigénico.
- 35 La línea celular humana T2 con carga peptídica defectuosa está disponible en la ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE. UU., con el n.º de catálogo CRL 1992. La línea 2 de Drosophila de Schneider está disponible en la ATCC, con el número de catálogo CRL 19863. La línea celular del ratón RMA-S se describe en Karre y Ljunggren (1985), «J.Exp.Med.», 162, 1745.
- 40 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 II, así como las moléculas de estimulación conjunta, están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.
- 45 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 polipeptidos recombinantes para la liberación de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> 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
- 50 aminoácidos de la presente invención y otro epítopo estimulador de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. 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 TH<sub>1</sub> de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que apoya a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> dependientes del MHC de clase I.
- Pueden usarse otros métodos para generar linfocitos T citotóxicos in vitro. Por ejemplo, los métodos descritos en
- 55 Peoples y col. (1995) «Proc. Natl. Acad. Sci.», EE. UU., 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, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. *Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres.* «J Immunol.» 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 el péptido de la invención, son útiles para terapia. Así, otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T citotóxicos activados que pueden obtenerse por los métodos anteriores.

Otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T citotóxicos (CTL) que reconocen de forma selectiva a una célula que exprese de forma aberrante 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 de forma aberrante 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 aberrante. 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 CD4<sup>+</sup> conforme a la presente invención pueden ser células del tumor (que, a veces, expresa MHC de clase II) y/o células del estroma que rodean al tumor (células tumorales) (que, a veces, también expresan MHC de clase II).

Los TCR de clones de CTL de la invención específicos para el péptido 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.» EE. UU. 91, 12654-12658. En este constructo de cadena única, el segmento VaJ está seguido por el segmento V DJ, seguido a su vez por el segmento Cp, seguido a su vez por el segmento citoplasmático y la membrana de la cadena CD3. Este TCR de cadena única se inserta entonces en un vector de expresión retroviral (puede usarse un panel de vectores basado en su habilidad para infectar linfocitos T CD8<sup>+</sup> 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 anfotróficos de alta valoración son usados para infectar linfocitos T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> purificados, aislados de las sangre periférica de pacientes con tumor (siguiéndose el protocolo publicado por Roberts y col. (1994) en «Blood» 84, 2878-2889). Los anticuerpos Anti-CD3 son usados para desencadenar la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> infectados con anticuerpos específicos del TCR de cadena única. El análisis in vitro de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> transducidos establece que muestran la misma toxicidad específica de tumor que con el clon de CTL allo-restringido del que originalmente se clonaron las cadenas de TCR. Las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> transducidos con la especificidad esperada

pueden ser usadas en la inmunoterapia adoptiva de los pacientes con tumores. Los pacientes pueden ser tratados con entre  $10^8$  y  $10^{11}$  CTL autólogos transducidos. De forma análoga a los  $CD8^+$ , se pueden generar linfocitos T colaboradores  $CD4^+$  transducidos con constructos relacionados.

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

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

También se describe un método para matar células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención. El método comprende los siguientes pasos: (1) obtención de CTL del paciente; (2) introducción en dichas células de un polinucleótido que codifique un TCR y (3) introducción al paciente de las células producidas en el paso (2).

15 También se describe un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante 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.

20 Preferentemente, las células presentadoras de antígenos son células dendríticas. Las células dendríticas son células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetida con un péptido antigénico. El péptido antigénico puede ser cualquier péptido antigénico adecuado que desencadene una respuesta adecuada de los linfocitos T. La terapia de linfocitos T con células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetida con péptidos de un antígeno asociado a un tumor se describe en Murphy y col. (1996) «The Prostate» 29, 371-380 y en Tjua y col. (1997) «The Prostate» 32, 272-278.

25 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.

30 Convenientemente, el polinucleótido puede estar comprendido en un polinucleótido viral o en un virus. Por ejemplo, se ha demostrado que las células dendríticas transducidas por adenovirus inducen inmunidad antitumoral específica de antígeno en relación con MUC1 (véase Gong y col. [1997] «Gene Ther. 4, 1023-1028»). De forma similar, pueden usarse sistemas basados en adenovirus (véase, por ejemplo, Wan y col. [1997] «Hum. Gene Ther.» 8, 1355-1363); sistemas retrovirales (Specht y col. [1997] «J. Exp. Med.» 186, 1213-1221 y Szabolcs y col. [1997]); transferencia sanguínea mediada por partícula a células dendríticas (Tuting y col. [1997] «Eur. J. Immunol.» 27, 2702-2707) y ARN (Ashley y col. [1997] «J. Exp. Med.» 186, 1177-1182).

35 Se apreciará que, con respecto a los métodos para matar células diana en un paciente, se prefiere especialmente que las células diana sean células cancerosas y, más aún, que sean células cancerosas renales o de colon.

40 Se prefiere especialmente que los pacientes que sean tratados con los métodos tengan un haplotipo HLA-DR. 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.

45 La invención incluye en particular el uso del péptido 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.

50 En una modalidad preferida, las vacunas de la presente invención se administran a un huésped tanto solas como en combinación con otras terapias contra el cáncer para inhibir o suprimir la formación de tumores.

La vacuna de péptidos puede administrarse sin adyuvante. La vacuna de péptidos también puede administrarse con un adyuvante como BCG o alúmin. Otros adyuvantes adecuados son el estímulo QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EE. UU.), 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<sup>TM</sup> por 3M Pharma, EE. UU.), 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.
- 5 En la tabla 1 adjunta, se enumeran los péptidos identificados. Además, en la tabla se nombran las proteínas de las que deriva el péptido así como la posición respectiva del péptido en la proteína correspondiente. Además, se dan los números de registro respectivos vinculados al Genbank del *National Centre for Biotechnology Information* del *National Institute of Health* (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- 10 En otra modalidad preferida, el péptido es usado 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.
- 15 En otra modalidad preferida, el péptido es usado 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*.
- 20 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, agentes blásticos, diluyentes, aromas, lubricantes, etc. Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias estimulantes de la respuesta inmune, como las citocinas. Una lista completa de excipientes que pueden usarse para esta composición aparece, por ejemplo, en A. Kibbe, «*Handbook of Pharmaceutical Excipients*», 3. Ed., 2000, *American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press*. La composición puede usarse para la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades tumorales.
- 25 La preparación farmacéutica con el péptido de la presente invención compuesto por la secuencia ID SEQ n.º 25 es administrada a un paciente que sufra una enfermedad tumoral que esté asociada al péptido o antígeno respectivo. Así puede desencadenarse una respuesta inmune específica de CTL.
- 30 Además, una combinación de dos o varios péptidos, como se describe aquí, puede usarse como vacuna, tanto en combinación directa como dentro del mismo régimen de tratamiento. Además, pueden usarse combinaciones con otros péptidos como, por ejemplo, péptidos específicos de MHC de clase I. 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- $\gamma$  (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.
- 35 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.
- 45 Se ha comprobado que los 80 aminoácidos N-terminales de la li son suficientes para dirigir a las proteínas a la vía de procesamiento de clase II (S. Sanderson, K. Frauwirth y N. Shastri (1995), «*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*», 92, 7217-7221; R. F. Wang, X. Wang, A.C. Atwood, S.L. Topalian y S.A. Rosenberg (1999) «*Science*», 284, 1351-1354).
- 50 La identificación de epítomos de linfocitos T colaboradores de antígenos asociados a tumores sigue siendo una tarea importante en la inmunoterapia contra los tumores. En este sentido, los inventores aportan un método de aplicación general y péptidos que derivados del análisis diferencial de péptidos por espectrometría de masas para identificar ligandos MHC de clase II, presentados y procesados de forma natural, de antígenos asociados a tumores. Este enfoque combina por primera vez la transfección de APC con un vector que codifique una proteína de fusión entre la cadena invariante y el antígeno de interés, la elución de péptidos unidos a HLA y la identificación por espectrometría de masas de los péptidos derivados del antígeno presentados por el agente de transfección, por comparación con las células no transfectadas. Además, los inventores pudieron validar el método mostrando que los linfocitos T inducidos
- 55 contra el péptido identificado reconocen específicamente a los agentes de transfección que sobreexpresan el

antígeno cognado. Aunque todavía se tiene que probar la inmunogenicidad in vivo de los péptidos identificados, nuestro enfoque conduce a la caracterización exacta de los ligandos MHC de clase II procesados de forma natural. Así, los inventores evitan probar péptidos sintéticos solapados de antígenos asociados a tumores o un intervalo amplio de péptidos seleccionados por predicción de epítomos, ya que es menos exacto que la predicción de epítomos de clase I. En comparación con laboriosos ensayos de linfocitos T que podrían conducir a la identificación de crípticos epítomos de linfocitos T incapaces de inducir la activación de los linfocitos T in vivo (S. M. Anderton, N. J. Viner, P. Matharu, P. A. Lowrey y D. C. Wraith (2002), «Nat. Immunol.», 3, 175-181), el trabajo puede centrarse en los pocos péptidos que se encuentran para ser presentados. Además, con este método no es necesario producir el antígeno recombinante o disponer de líneas celulares tumorales que expresen el antígeno para probar que los péptidos se procesan de forma natural.

Los inventores usaron el N-terminal de Ii para dirigir antígenos asociados a tumores al compartimento de procesamiento de clase II de células B transformadas por el VEB. Para conseguir esto, los inventores construyeron un vector versátil con el que se puede expresar cualquier antígeno como una proteína de fusión con Ii y que ayuda a determinar el nivel de expresión de la proteína en células transfectadas mediante el análisis de transferencia Western. Ya se ha mostrado que el N-terminal de Ii es suficiente para dirigir proteínas al compartimento de procesamiento de clase II. Pero, hasta ahora, esto sólo se ha descrito en un modelo que utiliza ovalbúmina (S. Sanderson, D. Frauwirth y N. Shastri (1995) «Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.» 92, 7217-7221) para identificar antígenos desconocidos usando genotecas de ADNc que codifican proteínas de fusión (R. F. Wang, X. Wang, A. C. Atwood, S. L. Topalian y S. A. Rosenberg (1999) «Science» 284, 1351-1354) o para confirmar la especificidad de clones de linfocitos T conocidos (P. Chaux, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon y B. P. van der Bruggen (1999) «J. Exp. Med.» 189, 767-778). Los inventores no tienen conocimiento de que este método se haya usado antes para identificar péptidos unidos a MHC de clase II, presentados de forma natural, de antígenos asociados a tumores conocidos. El análisis diferencial de ligandos de clase II de células transfectadas y no transfectadas por espectrometría de masas MALDI y la posterior caracterización por espectrometría de masas ESI de los péptidos expresados diferencialmente tiene como resultado un método directo para identificar ligandos de clase II de los antígenos de interés. La transfección de las células con proteínas de fusión queratina 18 mostró que el método de los inventores es de aplicación general para los antígenos de interés. Los inventores también pudieron describir un péptido presentado por HLA-DR a partir de un transgén modelo, la queratina 18.

La identificación de epítomos de linfocitos T colaboradores de TAA sigue siendo una tarea importante en la inmunoterapia contra los tumores. Hasta ahora, se han llevado a cabo distintas estrategias para la identificación de péptidos de clase II a partir de TAA, desde la incubación de APC con el antígeno de interés para que sea absorbido y procesado (P. Chaux, V. Vantomme, V. Stroobant, K. Thielemans, J. Corthals, R. Luiten, A. M. Eggermont, T. Boon, y B. P. van der Bruggen; 1999; *Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes*. «J. Exp. Med.» 189:767-778) hasta diversas estrategias de transfección con proteínas de fusión (J. Dengjel, P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2004; *Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry*; «Eur.J.Immunol.» 34: 3644-3651). Todos estos métodos llevan mucho tiempo y muchas veces no queda claro si los ligandos de HLA identificados son realmente presentados in vivo por tejido humano. Los inventores pudieron mostrar por primera vez que es posible aislar ligandos de HLA de clase II directamente de tumores sólidos diseccionados, identificando así los péptidos que son presentados por los tumores y el tejido circundante in vivo que, por tanto, pueden ser reconocidos por linfocitos T con el receptor de linfocitos T adecuado y que expresan simultáneamente el ligando CD4 co-estimulante en su superficie. Entre las proteínas que actúan como una fuente de ligandos de HLA de clase II procesados de forma endógena, se identificaron varias proteínas de mantenimiento e inmunorelevantes. Sin embargo, también se detectaron péptidos de TAA, lo que desemboca en un enfoque directo para la identificación de relevantes ligandos de clase II in vivo de TAA.

Los inventores identificaron tres ligandos para una secuencia central de IGFBP3 y un ligando de MMP7. Los inventores descubrieron que estas proteínas están sobreexpresadas en los carcinomas de células renales. Además, se han descrito como asociadas a tumores (S. Miyamoto, K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, y A. Ochiai; 2004; *Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3*; «Cancer Res.» 64:665-671. T. Sumi, T. Nakatani, H. Yoshida, Y. Hyun, T. Yasui, Y. Matsumoto, E. Nakagawa, K. Sugimura, H. Kawashima y O. Ishiko; 2003; *Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma*. «Oncol. Rep.» 10:567-570. C. W. Cheung, D. A. Vesey, D. L. Nicol y D. W. Johnson; 2004; *The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation*; «Kidney Int.» 65:1272-1279). Estos péptidos se unieron promiscuamente a moléculas HLA de clase II y fueron capaces de activar linfocitos T CD4<sup>+</sup> de diferentes donantes sanos. Por lo tanto, el enfoque de los inventores ayudará en la identificación de nuevos péptidos candidatos de clase II de TAA para su uso en protocolos de vacunación clínica.

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.

20 En el contexto de la presente invención se ha descubierto de forma inesperada que las células de tumores sólidos, en comparación con las células sanas del mismo tejido, expresan la molécula humana HLA de clase II en su superficie. Este hecho sólo ha sido descrito una vez por Brasanac y col. (D. Brasanac, J. Markovic-Lipkovski, J. Hadzi-Djokic, G. A. Muller, C. A. Muller; *Immunohistochemical analysis of HLA class II antigens and tumor infiltrating mononuclear cells in renal cell carcinoma: correlation with clinical and histopathological data*. «Neoplasma» 1999; 46(3): 173-8), en el que se estudiaron secciones de criostato de 37 carcinomas de células renales (RCC) –25 de células claras, 10 granulares y 2 cromóforas– con el método indirecto de inmunoperoxidasa, aplicándose anticuerpos monoclonales (AcMo) a los antígenos HLA-DR, -DP y -DQ para el análisis de antígenos HLA de clase II, y AcMo anti-CD14, -CD3, -CD4 y -CD8 para células mononucleares destructoras de tumores (TIM). El número de células  
25 positivas se calculó semi-cuantitativamente y se estableció una correlación entre los resultados de la investigación inmunohistoquímica y las características clínicas (edad y sexo del paciente, tamaño del tumor y clasificación TNM) e histopatológicas (citología, histología, grado) del RCC. Todos los RCC expresaron antígenos HLA-DR, un 92% de -DQ y un 73% de -DP con una jerarquía en el nivel de expresión de -DR>-DQ>-DP, pero no se pudo establecer una correlación de importancia estadística con ninguno de los parámetros clínicos o histopatológicos analizados. Los monocitos fueron más abundantes que los linfocitos T y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> más que los CD8<sup>+</sup>, mientras que los tumores con predominancia de linfocitos T y con aproximadamente el mismo número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tuvieron el mayor diámetro medio. La activación inadecuada de los linfocitos T por células tumorales (a pesar de su capacidad para presentar antígenos) pudo ser la razón para una asociación de parámetros que indica un comportamiento tumoral más agresivo con expresión aberrante del antígeno HLA de clase II en RCC.

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

Las secuencias SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 49 muestran secuencias de péptidos de epítomos de linfocitos T que contienen péptidos presentados por el MHC de clase II.

40 Las SEQ ID n.º 50 a SEQ ID n.º 79 muestran secuencias de péptidos de la tabla 3.

45 La figura 1 muestra la expresión de moléculas HLA de clase II en RCC de tres pacientes. Mientras en el tumor del paciente RCC132 las células positivas HLA se localizaban preferentemente en el margen (A, B), los modelos de expresión HLA de clase II de los tumores de los pacientes RCC190 y RCC211 con una estructura más papilar se habían propagado de forma más uniforme (C, E, G). La visualización de macrófagos CD68<sup>+</sup> (B, D, F) en secciones seriadas de tejido ilustra una relación espacial cercana entre las células inmunes mononucleares destructoras de tumores y las células tumorales que expresan HLA II. La incubación con IgG de ratón en lugar de anticuerpos específicos reveló sistemáticamente resultados de coloración negativos (H). La T marca el tumor.

50 La figura 2 muestra un análisis FACS de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para IGFBP3<sub>169-181</sub>, MMP7<sub>247-262</sub> y CCND1<sub>198-212</sub>. Se muestran transferencias de puntos representativas de coloración de IFN $\gamma$  intracelular en contraste con CD4-FITC.

55 La figura 3 muestra una ilustración esquemática de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  específico de antígeno detectados en cada donante y para cada péptido. Se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  para cada donante y péptido usado para la estimulación. Las células se incubaron en placas de 96 pocillos –7 pocillos por donante y péptido. Los valores considerados positivos aparecen en un recuadro: el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  fue más de dos veces mayor que el control negativo sin péptido. Los porcentajes de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  detectados tras la estimulación con un péptido irrelevante guardaban

correlación con los valores tras la estimulación sin péptido, con la excepción del donante 1 después de la 3ª estimulación con IGFBP3<sub>169-181</sub>. Sin embargo, este efecto no se volvió a detectar después de la 4ª estimulación.

5 La figura 4 muestra la expresión de moléculas HLA de clase II en CCA165 (adenocarcinoma del colon diferenciado moderadamente). En la lámina propia de zonas con mucosa normal del colon (panel c y lado izquierdo del panel a, marcados con asterisco) normalmente se observan algunos macrófagos HLA positivos de clase II pero las células epiteliales eran sistemáticamente negativas para la expresión de HLA de clase II. En las células epiteliales de zonas distintas del tumor, sin embargo, se observó una expresión pronunciada de HLA II, tal y como se muestra en el lado derecho del panel a y en los paneles b y d.

10 Las figuras 5a y 5b muestran la identificación de secuencias de péptidos eluidos de moléculas HLA de clase II aisladas del tejido tumoral humano principal por espectrometría de masas. Figura 5a: fragmentos derivados de la fragmentación de ligandos HLA de clase II procesados y presentados de forma natural de MMP7 que corresponden a la secuencia de péptidos con SEQ ID n.º 1 (SQDDIKGIQKLYGKRS). Los fragmentos anotados se describen en la tabla 5. Figura 5b: fragmentos derivados de la fragmentación del péptido sintético con la secuencia de péptidos SEQ ID n.º 1. Las fragmentaciones de los péptidos procesados tanto de forma natural como sintética producen modelos de fragmentación equivalentes y permiten la deducción y confirmación de la secuencia de aminoácidos primaria de la secuencia de péptidos previamente sin caracterizar (SEQ ID n.º 1) de este ligando HLA de clase II de MMP7 humano.

15

Tabla 1: Secuencias de péptidos alineadas conforme al motivo de HLA-DRB1\*0101. Los péptidos DeCS con puntuaciones mayores de 19 se consideraron aglutinantes DRB1 \*0101.

	Secuencia									Símbolo del gen	N.º de reg.	Posición	Puntuación SYFPEITHI	ID SEQ n.º							
	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+						
				1	2	3															
1.	S	Q	D	I	K	G	I	Q	K	L	Y	G	K	R	S						
2.		N	K	Q	K	P	I	T	P	E	T	A	E	K	L	A	R	D			
3.		D	D	P	S	T	I	E	K	L	A	K	N	K	Q	K	P				
4.			N	P	L	K	I	F	S	K	R	I	L	R	R	H					
5.		E	T	G	W	L	L	L	N	K	P	L	D	R							
6.		D	N	E	L	Q	E	M	S	N	Q	G	S	K							
7.		A	A	G	L	S	T	Y	R	A	F	L	S	S	H						
8.	A	P	S	L	R	P	K	D	Y	E	V	D	A	T	L	K	S	L	N	N	Q
9.		G	P	V	D	E	V	R	E	L	Q	K	A	I	G	A	V	P			
10.		I	N	H	V	S	V	A	G	W	G	I	S	D	G						
11.	V	P	D	D	R	D	F	E	P	S	L	G	P	V	C	P	F	R			
12.	L	P	Q	S	I	V	Y	K	Y	M	S	I	R	S	D	R	S	V	P	S	
13.		I	V	H	R	Y	M	T	I	T	S	E	R	S	V	P	A				
14.		K	N	G	F	V	V	L	K	G	R	P	C	K							
15.		I	T	G	Y	I	K	Y	E	K	P	G	S	P	P						
16.		G	A	T	Y	N	I	V	E	A	L	K	D	Q							
17.	L	T	G	Y	R	V	R	T	P	K	E	K	T	G	P						
18.	I	P	G	H	L	N	S	Y	T	I	K	G	L	K	P	G					
19.		N	L	R	F	L	A	T	T	P	N	S	L								
20.	S	N	T	D	L	V	P	A	P	A	V	R	I	L	T	P	E				
21.	A	E	I	L	E	L	A	G	N	A	R	D	N								
22.	V	K	E	P	V	A	V	L	K	A	N	R	V	W	G	A	L				
23.	T	A	E	I	L	E	L	A	G	N	A	R	D	N	K						
24.	H	P	L	H	S	K	I	I	I	K	G	H	A	K							
25.	H	S	K	I	I	I	K	G	H	A	K	D	S	Q							

Tabla 1 (continuación)

26.	R P K H T R I S E L K A E A V K K D	IGFBP5	NP_000590	138-155	32	SEQ ID n.º	26
27.	G P E D N V V I Y L S R A G N P E	ISLR	NP_005536	380-397	26	SEQ ID n.º	27
28.	S R P V I N I Q K T I T V T P N	ITGA6	NP_000201	464-479	32	SEQ ID n.º	28
29.	L D L S F N Q I A R L P S G L P V	LUM	NP_002336	189-205	30	SEQ ID n.º	29
30.	K L P S V E G L H A I V S D R	MAP2K1IP 1	NP_068805	12-27	32	SEQ ID n.º	30
31.	D T S T L E M H A P R C G	MMP12	NP_002417	80-93	23	SEQ ID n.º	31
32.	D Q N T I E T M R K P R C G N P D	MMP2	NP_004521	90-106	20	SEQ ID n.º	32
33.	N P G E Y R V T A H A E G Y T P S	AEBP1	NP_001120	947-963	20	SEQ ID n.º	1
34.	L D F L K A V D T N R A S V G	PLXDC2	NP_116201	69-83	29	SEQ ID n.º	34
35.	H G N Q I A T N G V V H V I D R	POSTN	NP_006466	213-228	23	SEQ ID n.º	35
36.	R A I E A L H G H E L R P G	RBM14	NP_006319	50-63	32	SEQ ID n.º	36
37.	D P G V L D R M K K L D T N S D	S100A11	NP_005611	56-72	25	SEQ ID n.º	37
38.	N E E E I R A N V A V S G A P	SDCBP	NP_00100706	56-71	26	SEQ ID n.º	38
39.	P A I L S E A S A P I P H	SDCBP	NP_00100706	29-41	24	SEQ ID n.º	39
40.	K V I Q A Q T A F S A N P A	SDCBP	NP_00100707	14-27	30	SEQ ID n.º	40
41.	N G A Y K A I P V A Q D L N A P S	SPP1	NP_000573	185-201	19	SEQ ID n.º	41
42.	T N G V V H V I T N V L Q P P A	TGFBI	NP_000349	621-636	29	SEQ ID n.º	42
43.	T T T Q L Y T D R T E K L R P E	TGFBI	NP_000349	116-131	23	SEQ ID n.º	43
44.	G K K E Y L I A G K A E G D G	TIMP2	NP_003246	106-120	25	SEQ ID n.º	44
45.	M G E I A S F D K A K L K K T	TMSB10	NP_066926	6-20	20	SEQ ID n.º	45
46.	M A E I E K F D K S K L K K	TMSB4Y	NP_004193	6-19	19	SEQ ID n.º	46
47.	V S S I E Q K T E G A E K K	YWHAZ	NP_003397	61-75	22	SEQ ID n.º	47
48.	H S K I I I K K G H A K	IGFBP3	NP_000589	169-181	25	SEQ ID n.º	48
49.	N P P S M V A G S V V A A V	CCND1	NP_444284	198-212	24	SEQ ID n.º	49

EJEMPLOS

Material y métodos

- 5 Inmunohistología de MHC de clase II: los tumores fueron fijados en formaldehído tamponado con fosfato al 4%, adheridos en parafina, teñidos con hematoxilina y eosina y examinados por microscopio óptico. El diagnóstico del RCC se efectuó conforme a las investigaciones rutinarias histopatológicas e inmunohistológicas (S. Fleming y M. O'Donnell; 2000; *Surgical pathology of renal epithelial neoplasms: recent advances and current status*. «Histopathology» 36: 195-202).
- 10 Para la detección inmunohistológica de moléculas MHC de clase II o moléculas CD68, respectivamente, se trataron previamente 5 µm de secciones de tejido adherido en parafina con 10 mM de tampón de citrato, pH 6, seguido de la incubación con AcMo cadena alfa anti-HLA-DR de ratón (clon TAL.1B5, 1:50) o Ac CD68 (clon PGM1, 1:50) (DAKO, Hamburgo, Alemania) o IgG1 de ratón (2 µg/ml, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, EE. UU.) y se visualizaron con el kit de detección Ventana iView DAB (Nexes System, Ventana Medical Systems, Illkirch, Francia). Las secciones de tejido se sometieron a una contracoloración con hematoxilina y, finalmente, se adhirieron en Entellan.
- 15 Elución y análisis molecular de péptidos unidos a HLA-DR: se procesaron muestras congeladas de tumor de la forma descrita anteriormente (T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic y H. G. Rammensee; 2002; *Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines*; «Cancer Res.» 62: 5818-5827) y los péptidos se aislaron conforme a los protocolos habituales (J. Dengjel, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2005; *Glycan side chains on naturally presented MHC class II ligands*. «J. Mass Spectrom.» 40: 100-104) usando el AcMo específico de HLA-DR L243 (L. A. Lampson y R. Levy; 1980; *Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line*; «J. Immunol.» 125: 293-299).
- 20 Las mezclas de péptidos naturales se analizaron con un sistema de HPLC Ultimate en fase invertida (Dionex, Amsterdam, Holanda) unido a un espectrómetro de masas Q-TOF I (Waters, Eschborn, Alemania), o con un sistema de HPLC CapLC en fase invertida unido a un Q-TOF Ultima API (Waters), como se describió anteriormente (C. Lemmel, S. Weik, U. Eberle, J. Dengjel, T. Kratt, H. D. Becker, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2004; *Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling*. «Nat. Biotechnol.» 22: 450-454). Los espectros de los fragmentos se analizaron de forma manual y automática.
- 25 Análisis de la expresión génica por micromatrices de oligonucleótidos de alta densidad: El aislamiento del ARN de muestras de riñón normal autólogo y tumoral así como el análisis de la expresión génica con micromatrices de oligonucleótidos Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) se efectuaron tal y como se describió anteriormente (T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2004; *Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy*. «Cancer Immunol. Immunother.»). Los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix). Las comparaciones de pares entre el riñón normal autólogo y el tumoral se calcularon usando el la matriz normal correspondiente como fondo. No se encontraron datos de matriz de riñón normal autólogo disponibles para RCC149 y RCC211. Por lo tanto, el ARN mezclado de riñón humano sano se obtuvo comercialmente (Clontech, Heidelberg, Alemania) y se usó como fondo para estos tumores.
- 30 Maduración de células dendríticas: Las células dendríticas se prepararon usando sangre de donantes sanos. Explicado brevemente, las PBMC se aislaron usando centrifugación en gradiente estándar (Lymphocyte Separation Medium, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) y se colocaron en placas a una densidad de  $7 \times 10^5$  células/ml en medio X-Vivo 15. Después de dos horas a 37° C, se quitaron las células no adherentes y los monocitos adherentes se cultivaron durante 6 días en medio X-Vivo con 100 ng/ml de GM-CSF y 40 ng/ml de IL-4 (AL-ImmunoTools, Friesoythe, Alemania). El séptimo día, las células dendríticas inmaduras se activaron con 10 ng/ml de TNF-α (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) y 20 µg/ml de poly(IC) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) durante 3 días.
- 35 Generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de antígeno: se estimularon  $10^6$  PBMC por pocillo con  $2 \times 10^5$  células dendríticas autólogas sensibilizadas de manera repetida con péptidos (5µg/ml). Las células se incubaron en placas de 96 pocillos (7 pocillos por donante y péptido) con medio de linfocitos T: RPMI 1640 suplementado en presencia de 10 ng/ml de IL-12 (Promocell, Heidelberg, Alemania). Después de tres a cuatro días de co-incubación a 37° C, se añadió medio fresco con 80 U/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Corporation, Emeryville, CA, EE. UU.) y 5 ng/ml de IL-7 (Promocell). La reestimulaciones se efectuaron con PBMC autólogas y péptidos con una frecuencia de entre seis y ocho días.
- 40 Tinción de IFNγ intracelular: Después de tres o cuatro rondas de estimulación, las PBMC fueron descongeladas, lavadas dos veces en medio X-Vivo 15, resuspendidas a  $10^7$  células/ml en medio de linfocitos T y cultivadas durante
- 45
- 50
- 55

la noche. Al día siguiente, las PBMC, sensibilizadas de manera repetida con 5 µg/ml de péptido, se incubaron con células efectoras en un ratio de 1:1 durante 6 horas. Se añadió Golgi-Stop (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) para las últimas 4 horas de incubación.

5 Las células se analizaron usando un kit Cytofix/Cytoperm Plus (Becton Dickinson) y anticuerpos CD4-FITC- (Immunotools), IFN $\gamma$ -PE- y CD8-PerCP clon SK1 (Becton Dickinson). Para los controles negativos se mezclaron e incubaron células de siete pocillos sin péptidos o con una cantidad irrelevante. Se usó la estimulación con PMA/Ionomicina para el control positivo. Las células se analizaron en un FACSCalibur de tres colores (Becton Dickinson).

### Ejemplos

#### 10 *Expresión de HLA de clase II por el RCC*

En condiciones normales no inflamatorias, las moléculas HLA de clase II sólo deberían ser expresadas por células del sistema hematopoyético y por el epitelio tímico (B. Mach, V. Steimle, E. Martinez-Soria y W. Reith; 1996; *Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease*. «Annu.Rev.Immunol.» 14: 301-331). La situación cambia durante la inflamación. La expresión de HLA de clase II puede ser inducida en la mayoría de los tipos de células y los tejidos mediante IFN $\gamma$  (S. Leib und Gut-Landmann, J. M. Waldburger, M. Krawczyk, L. A. Otten, T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea y W. Reith; 2004; *Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes*. «Eur.J.Immunol.» 34: 1513-1525). Debido a que la incidencia de RCC viene a menudo acompañada de eventos inflamatorios (J. Y. Blay, J. F. Rossi, J. Wijdenes, C. Menetrier-Caux, S. Schemann, S. Negrier, T. Philip y M. Favrot; 1997; *Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma*. «Int. J. Cancer» 72: 424-430. U. Elsässer-Beile, M. Rindsfuser, T. Grussenmeyer, W. Schultze-Seemann y U. Wetterauer; 2000; *Enhanced expression of IFN-gamma mRNA in CD4[+] or CD8[+] tumor-infiltrating lymphocytes compared to peripheral lymphocytes in patients with renal cell cancer*. «Br. J. Cancer» 83: 637-641), las moléculas de clase II son expresadas en los alrededores de o por los tumores, según hay constancia.

#### *Tinción inmunohistoquímica de moléculas HLA de clase II*

25 Los inventores analizaron la expresión de HLA de clase II de diez muestras de RCC que comprendían carcinoma renal histológico de células claras y papilar usando tinción inmunohistoquímica y descubrieron que todas las muestras investigadas revelaban células tumorales positivas de clase II. Tal y como se ejemplifica en la figura 1A, a menudo se detectaba en el margen del tumor una expresión pronunciada de HLA de clase II. En éstas zonas, los inventores observaron un estrecha correlación espacial de células tumorales positivas de HLA con células inmunes destructoras de tumores, como se ilustra por la visualización de macrófagos CD68<sup>+</sup> en una sección e tejido seriada (figura 1B). En el RCC que revelaba una arquitectura más papilar, la expresión de moléculas HLA de clase II se distribuía de forma más uniforme por el tumor (figura 1 C, E, G). La comparación de las muestras de tinción inmunohistoquímica de HLA de clase II y CD68 en secciones de tejido seriadas demuestra claramente que, además de los macrófagos, las células tumorales también expresan HLA de clase II (figura 1 C, D y E, F). Se ha demostrado que los linfocitos T<sub>H1</sub> CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  así como las células asesinas naturales (NK) se infiltran en el RCC (J. M. Cozar, J. Canton, M. Tallada, A. Concha, T. Cabrera, F. Garrido y O. F. Ruiz-Cabello; 2005; *Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas*. «Cancer Immunol. Immunother»). Teniendo en cuenta que se encontraron células tumorales positivas de clase II predominantemente en partes exteriores de los tumores diseccionados, se podría especular que los leucocitos atraídos por el tumor producen IFN $\gamma$  que actúa en las células malignas vecinas. La expresión anormal de moléculas HLA de clase II en tejido neoplásico no está restringida al RCC. También puede detectarse en el TCC y el CCA. La figura 4 muestra la tinción inmunohistoquímica de tejido de muestra de adenocarcinoma humano del colon.

#### *Análisis de la expresión de IFN $\gamma$ y transcritos génicos inducibles por IFN $\gamma$*

45 Adicionalmente, los inventores investigaron la expresión de HLA de clase II por medio del análisis comparativo de la expresión génica, usando micromatrices de oligonucleótidos. Con esta técnica, los inventores pudieron calcular la expresión total de HLA de clase II en los tumores diseccionados independientemente de los tipos de células de expresión. Los inventores analizaron la expresión diferencial de cuatro tumores, RCC149, RCC180, RCC190 y RCC211, en comparación con el riñón de referencia normal. En los cuatro tumores, los genes codificadores de moléculas de HLA de clase II se encontraron sobreexpresados (tabla 2). Una razón posible de esto podría ser una expresión inducida por IFN $\gamma$  y, por ello, los inventores buscaron otros genes que se sabe son regulados hacia arriba por interferones (N. A. Kolchanov, E. V. Ignatieva, E. A. Ananko, O. A. Podkolodnaya, I. L. Stepanenko, T. I. Merkulova, M. A. Pozdnyakov, N. L. Podkolodny, A. N. Naumochkin y A. G. Romashchenko; 2002; *Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 2002*. «Nucleic Acids Res.» 30: 312-317). Resulta interesante destacar que se encontró un número considerable de estos genes sobreexpresado en una o más muestras de tumores. La tabla 2 muestra genes inducibles por interferón regulados hacia arriba de forma reproductiva en las cuatro muestras, conforme a los descubrimientos anteriores de los inventores (T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic y H. G.

5 Rammensee; 2002; *Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines*. «Cancer Res.» 62: 5818-5827). Entre ellos se encuentran las LMP2, LMP7 y MECL1, proteínas que se intercambian por subunidades constitutivas de la holoenzima proteolítica larga que se encuentra en el citosol, la proteasoma, para formar la inmuno-proteasoma. El intercambio de subunidades proteolíticas expresadas de forma normal de la proteasoma por subunidades inducidas por IFN $\gamma$  constituye un proceso distintivo en un medio rico en interferón. Adicionalmente, el IFN $\gamma$  se calculó directamente por PCR cuantitativo a tiempo real (TaqMan). Los tumores de la tabla 2 mostraron una sobreexpresión de IFN $\gamma$  ARNm de 5 a 60 veces mayor en comparación con las muestras autólogas de ARN normal del mismo donante (no se muestran datos). De esta forma, los resultados de los inventores indican que el IFN $\gamma$  podría tener un papel importante en el RCC y ser la razón de la expresión abundante de clase II.

10 **Tabla 2: expresión de ARNm de genes inducibles por interferón.**

La expresión en las muestras de tumor se comparó con riñones normales autólogos (RCC180, RCC190) o riñones sanos mezclados (RCC149, RCC211). Todos los genes mostraron un «aumento» en el algoritmo *change-call* del software GCOS para los cuatro tumores y se han descrito como inducibles por interferón.

Símbolo del gen	ID del gen	Título del gen	veces sobreexpresado vs. normal			
			RCC149	RCC180	RCC190	RCC211
HLA-DPA1	3113	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP alpha 1	3.5	3.7	4.9	13.9
HLA-DPB1	3115	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DP beta 1	2.6	2.5	2.8	14.9
HLA-DQB1	3119	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DQ beta 1	4.3	4.0	6.5	5.3
HLA-DRB1	3123	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR beta 1	1.2	1.9	2.8	4.3
CXCL10	3627	quimiocina (motivo C-X-C) ligando10	1.1	3.2	10.6	24.3
FCGR1A	2209	fragmento Fc de IgG, alta afinidad Ia, receptor para (CD64)	6.5	2.6	12.1	29.9
IFI16	3428	interferón, proteína 16 inducible por gamma	8.6	3.0	4.3	11.3
IFI44	10561	proteína 44 inducida por interferón	2.8	1.4	2.5	2.8
OAS1	4938	2',5'-oligoadenilato sintetasa 1, 40/46kDa	3.5	2.3	2.6	5.3
PSMB8	5696	subunidad de proteasoma, tipo beta, 8 (LMP7)	2.6	4.3	6.1	6.5
PSMB9	5698	subunidad de proteasoma, tipo beta, 9 (LMP2)	4.3	7.5	6.5	16.0
PSMB10	5699	subunidad de proteasoma, tipo beta, 10 (MECL1)	3.2	2.5	5.3	13.0
SP100	6672	antígeno nuclear Sp100	4.0	1.1	1.5	2.8

TAP1	6890	transportador 1, casete de unión a ATP, sub-familia B (MDR/TAP)	2.5	2.8	6.5	8.0
VCAM1	7412	molécula 1 de adhesión celular vascular	5.7	5.3	3.2	12.1

*Ligandos de HLA-DR aislados de tejido canceroso*

5 Conforme a datos disponibles al público, los péptidos unidos por moléculas HLA de clase II expresados en tejido de tumores sólidos hasta ahora no han sido aislados ni identificados. Los inventores analizaron diez RCC distintos, tres CCA y un TCC y pudieron aislar ligandos de HLA-DR de todas las muestras, llegando a 453 péptidos en total (no se muestran datos). Las secuencias de péptidos se determinaron uniéndose a separación cromatográfica y análisis espectrométrico de masas en tandem (LC-MS/MS), como se describió anteriormente (T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic y H. G. Rammensee; 2002; *Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines*. «Cancer Res.» 62: 5818-582. M. Schirle, W. Keilholz, B. Weber, C. Gouttefangeas, T. Dumrese, H. D. Becker, S. Stevanovic, H. G. Rammensee; *Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T-cell-independent approach*. «Eur J Immunol.»; 2000; 30(8): 2216-25). En las figuras 5a y 5b se muestra un ejemplo de la secuenciación *de novo* de péptidos por LC-MS/MS. Las secuencias deducidas de aminoácidos primarios de fragmentos de colisión anotadas en las figuras 5a y 5b se incluyen en la tabla 5. Las muestras de tumor difirieron en sus genotipos HLA, en su peso y en el número total de ligandos de HLA identificados. La tabla 3 muestra una lista representativa de péptidos y las proteínas de origen correspondientes identificados a partir de una muestra de tumor, RCC190. Los péptidos se aislaron de moléculas HLA de clase II de células, tal y como se describió anteriormente (J. Dengjel, P. Decker, O. Schoor, F. Altenberend, T. Weinschenk, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2004; *Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry*. «Eur.J.Immunol.» 34: 3644-3651).

**Tabla 3: Lista de ejemplo de ligandos de HLA-DR aislados de RCC190.**

Se muestran las secuencias centrales de ligandos de HLA-DR aislados de RCC190 (HLA-DRB1\*11, DRB1\*15, DRB3, DRB5).

Símbolo del gen	ID del gen	Secuencia de péptidos (SEQ ID n.º)	Título del gen
ACTG1	71	WISKQEYDESGPSIVHRKCF (SEQ ID n.º 50)	actina, gamma 1 propéptido
ALB	213	LKKYLYEIARRHP (SEQ ID n.º 51)	precursor de la albúmina
ALB	213	TLVEVSRNLGKVG (SEQ ID n.º 52)	precursor de la albúmina
ALB	213	TPTLVEVSRNLGKVGS (SEQ ID n.º 53)	precursor de la albúmina
APOA2	336	EKSKEQLTPLIKKAGTELVNF (SEQ ID n.º 54)	precursor de la apolipoproteína A-II
APOB	338	YPKSLHMYANRLDHR (SEQ ID n.º 55)	precursor de la apolipoproteína B
C1R	715	EPYYKMQTRAGSRE	componente del complemento 1,

## ES 2 373 907 T3

		(SEQ ID n.º 56)	subcomponente r
C4B	721	APPSGGPGFLSIERPDSRPP (SEQ ID n.º 57)	proteína del componente del complemento 4B
C4BPA	722	FGPIYNYKDTIVFK (SEQ ID n.º 58)	proteína de unión del componente del complemento 4, alpha
CALR	811	SPDPSIYAYDNF (SEQ ID n.º 59)	precursor de la calreticulina
CALR	811	EPPVIQNPEYKGEWKPRQIDNPD (SEQ ID n.º 60)	precursor de la calreticulina
CFL1	1072	GVIKVFNDMKVRK (SEQ ID n.º 61)	cofilina 1 (no muscular)
CPE	1363	APGYLAITKKVAVPY (SEQ ID n.º 62)	precursor de la carboxipeptidasa E
FCGBP	8857	ASVDLKNTRGREEFLTA (SEQ ID n.º 63)	proteína de unión del fragmento Fc de IgG
FCN1	2219	GNHQFAKYKSFKVADE (SEQ ID n.º 64)	precursor de la ficolina 1
FTL	2512	VSHFFRELAEEKREG (SEQ ID n.º 65)	ferritina, polipéptido ligero
FTL	2512	TPDAMKAAMALEKK (SEQ ID n.º 66)	ferritina, polipéptido ligero
GAPD	2597	FVMGVNHEKYDN (SEQ ID n.º 67)	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAPD	2597	TGVFTTMEKAGAH (SEQ ID n.º 68)	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GAPD	2597	ISWYDNEFGYSNRVVDLMAHMASKE (SEQ ID n.º 69)	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HIST1H1C	3006	GTGASGSFKLNKKAASGEAKPK (SEQ ID n.º 70)	familia histona H1, miembro 2
HLA-DQB1	3119	DVGVYRAVTPQGRPD (SEQ ID n.º 71)	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, precursor de DQ beta 1
HLA-DRB1	3123	DVGEFRAVTELGRPD (SEQ ID n.º 72)	complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, precursor de DR beta 1

IGFBP3	3486	HPLHSKIIIIKKGHAK (SEQ ID n.º 73)	proteína 3 de unión del factor de crecimiento similar a la insulina
KNG1	3827	DKDLFKAVDAALKK (SEQ ID n.º 74)	quininógeno 1
NPC2	10577	KDKTYSYLNKLPVK (SEQ ID n.º 75)	enfermedad de Niemann-Pick, precursor del tipo C2
S100A8	6279	VIKMGVAAHKKSHEESHKE (SEQ ID n.º 76)	proteína A8 de unión del calcio S100
SERPINA1	5265	MIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID n.º 77)	inhibidor de serina (o cisteína) proteínasa, clado A (alfa 1 antiproteínasa, antitripsina), miembro 1
SOD1	6647	GPHFNPLSRKHGGPK (SEQ ID n.º 78)	superóxido dismutasa 1, soluble
TF	7018	DPQTFYYAVAVVKKDS (SEQ ID n.º 79)	transferrina

5 No se encontró una correlación entre el peso del tumor y el número de ligandos de HLA identificados. Las proteínas de origen de los péptidos se pudieron dividir en dos grupos. Por una parte se encontraron ligandos que deberían ser presentados por leucocitos como péptidos de componentes de complementos (proteínas alfa de unión a C4, C4A y C3, por ejemplo) y otras proteínas unidas a funciones específicas de células del sistema inmune (CD14 y proteína de unión al fragmento Fc de IgG, por ejemplo). Por otro lado, los inventores pudieron revelar la naturaleza y características de péptidos desconocidos presentados por células tumorales de TAA sobreexpresado como, por ejemplo, de la vimentina, la metaloproteínasa 7 de la matriz, el factor 1alfa de elongación de traducción eucariótica y la nicotinamida N-metiltransferasa. Esta observación coincide con los datos inmunohistoquímicos (figuras 1 y 4) y demuestra que las células tumorales positivas de HLA de clase II y los leucocitos destructores estaban presentes en muestras analizadas y que los péptidos eluidos provienen de antígenos sobreexpresados en estos tipos definidos de células.

15 Con el fin de identificar péptidos de TAA, los inventores compararon las proteínas de origen de los ligandos individuales con los genes sobreexpresados detectados en análisis de micromatrices de tumores (T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic y H. G. Rammensee; 2002; *Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines*. «Cancer Res.» 62: 5818-5827. T. Krüger, O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Müller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H. G. Rammensee y S. Stevanovic; 2004; *Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy*. «Cancer Immunol.Immunother»). Los inventores identificaron un péptido de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, IGFBP3<sub>166-181</sub>, en el RCC190. Además, en el TCC108 se encontraron dos variantes de este péptido, IGFBP3<sub>169-181</sub> y IGFBP3<sub>169-184</sub>, que contienen el mismo motivo central de secuencia que es necesario y suficiente para permitir la unión al HLA-DRB1\*0101 (véase la tabla 1 como referencia). Un péptido de la metaloproteínasa 7 de la matriz, el MMP7<sub>247-262</sub>, del mismo tumor se pudo aislar (tabla 1). A nivel del ARNm, el MMP7 y el IGFBP3 estaban sobreexpresados en 13 y 22 RCC de 23 analizados, respectivamente (no se muestran datos). En total, de 453 secuencias de péptidos identificadas inicialmente (no mostradas) se han identificado los antígenos de 49 péptidos (SEQ ID n.º 1 – 49) como asociados a tumores, bien por experimentos de los inventores (se incluyen los datos en este documento) o de otros (S. Miyamoto, K. Yano, S. Sugimoto, G. Ishii, T. Hasebe, Y. Endoh, K. Kodama, M. Goya, T. Chiba, y A. Ochiai; 2004; *Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3*; «Cancer Res.» 64:665-671. T. Sumi, T. Nakatani, H. Yoshida, Y. Hyun, T. Yasui, Y. Matsumoto, E. Nakagawa, K. Sugimura, H. Kawashima y O. Ishiko; 2003; *Expression of matrix metalloproteinases 7 and 2 in human renal cell carcinoma*. «Oncol. Rep.» 10:567-570. C. W. Cheung, D. A. Vesey, D. L. Nicol y D. W. Johnson; 2004; *The roles of IGF-I and IGFBP-3 in the regulation of proximal tubule, and renal cell carcinoma cell proliferation*; «Kidney Int.» 65: 1272-1279. X. Hao, B. Sun, L. Hu, H.

5 Lahdesmaki, V. Dunmire, Y. Feng, S. W. Zhang, H. Wang, C. Wu, H. Wang, G. N. Fuller, W. F. Symmans, I. Shmulevich y W. Zhang; 2004; *Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis*. «Cancer», 100: 1110-1122. B. M. Helmke, M. Polychronidis, A. Benner, M. Thome, J. Arribas y M. Deichmann; 2004; *Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene*. «Oncol. Rep.» 12: 221-228. H. S. Hofmann, G. Hansen, G. Richter, C. Taeye, A. Simm, R. E. Silber y S. Burdach; 2005; *Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients*. «Clin. Cancer Res.» 11: 1086-1092. T. Kamai, T. Yamanishi, H. Shirataki, K. Takagi, H. Asami, Y. Ito y K. Yoshida; 2004; *Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer*. «Clin. Cancer Res.» 10: 4799-4805. J. Koninger, N. A. Giese, F. F. di Mola, P. Berberat, T. Giese, I. Esposito, M. G. Bachem, M. W. Buchler y H. Friess; 2004; *Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action*. «Clin. Cancer Res.» 10: 4776-4783. M. Mori, H. Shimada, Y. Gunji, H. Matsubara, H. Hayashi, Y. Nimura, M. Kato, M. Takiguchi, T. Ochiai y N. Seki; 2004; *S100A11 gene identified by in-house cDNA microarray as an accurate predictor of lymph node metastases of gastric cancer*. «Oncol. Rep.», 11: 1287-1293. D. K. Nagler, S. Kruger, A. Kellner, E. Ziomek, R. Menard, P. Buhtz, M. Krams, A. Roessner y U. Kellner; 2004; *Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia*. «Prostate», 60: 109-119. A. Nanda, P. Buckhaults, S. Seaman, N. Agrawal, P. Boutin, S. Shankara, M. Nacht, B. Teicher, J. Stampfl, S. Singh, B. Vogelstein, K. W. Kinzler y C. B. St; 2004; *Identification of a binding partner for the endothelial cell surface proteins TEM7 and TEM7R*. «Cancer Res.» 64: 8507-8511. I. S. Patel, P. Madan, S. Getsios, M. A. Bertrand y C. D. MacCalman; 2003; *Cadherin switching in ovarian cancer progression*. «Int. J. Cancer» 106: 172-177. G. Santelli, D. Califano, G. Chiappetta, M. T. Vento, P. C. Bartoli, F. Zullo, F. Trapasso, G. Vigiuetto y A. Fusco; 1999; *Thymosin beta-10 gene overexpression is a general event in human carcinogenesis*. «Am. J. Pathol.» 155: 799-804. D. Schneider, J. Kleeff, P. O. Berberat, Z. Zhu, M. Korc, H. Friess y M. W. Buchler; 2002; *Induction and expression of betaig-h3 in pancreatic cancer cells*. «Biochim. Biophys. Acta» 1588: 1-6. J. B. Welsh, L. M. Sapinoso, S. G. Kern, D. A. Brown, T. Liu, A. R. Bauskin, R. L. Ward, N. J. Hawkins, D. I. Quinn, P. J. Russell, R. L. Sutherland, S. N. Breit, C. A. Moskaluk, H. F. Frierson Jr. y G. M. Hampton; 2003; *Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum*. «Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.», 100: 3410-3415. D. Xie, J. S. Sham, W. F. Zeng, L. H. Che, M. Zhang, H. X. Wu, H. L. Lin, J. M. Wen, S. H. Lau, L. Hu y X. Y. Guan; 2005; *Oncogenic role of clusterin overexpression in multistage colorectal tumorigenesis and progression*. «World J. Gastroenterol.» 11: 3285-3289). El análisis de ejemplo del potencial inmunoestimulador de péptidos unidos a alelos de HLA-DR comunes revela la existencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de antígeno contra IGFBP3<sub>169-181</sub> y MMP7<sub>247-262</sub>.

35 La unión promiscua de la SEQ ID n.º 1 a varios alelos de HLA-DR se puede revelar por varios métodos: los ligandos de determinadas moléculas MHC/HLA portan aminoácidos relacionados químicamente en determinadas posiciones de su secuencia primaria, lo que permite la definición de un motivo peptídico para cada alelo de MHC/HLA (K. Falk, O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung y H. G. Rammensee; *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*; «Nature»; 1991; 351 (6324): 290-6). SYFPEITHI matrices de motivos deducidas de motivos refinados basados exclusivamente en el análisis de ligandos naturales por degradación Edman y espectrometría de masas en tandem. Estas matrices permiten la predicción de péptidos de una secuencia de proteínas dada presentada moléculas MHC de clase II o clase II (O. Rotzschke, K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, P. Walden y H. G. Rammensee. *Exact prediction of a natural T-cell epitope*; «Eur J Immunol.»; 1991; 21 (11): 2891-4).

45 Aplicando los principios de las predicciones hechas con el algoritmo SYFPEITHI (H. G. Rammensee, J. Bachmann y S. Stevanovic; 1997; *MHC Ligands and Peptide Motifs*. «Springer-Verlag», Heidelberg, Alemania. H. Rammensee, J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bacher, S. Stevanovic; *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*; «Immunogenetics»; 1999; 50 (3-4): 213-9) a la mencionada secuencia peptídica de ejemplo (SEQ ID n.º 1), se clasificó la unión de la SEQ ID n.º 1 a varios alelos de HLA-DR comunes (véase tabla 7). El algoritmo se ha usado con éxito para predecir epítomos de clase I y clase II de varios antígenos como, por ejemplo, del TAA humano TRP2 (predicción de un ligando de HLA de clase I) (34) y SSX2 (predicción de un ligando de HLA de clase II) (Neumann F, Wagner C, Stevanovic S, Kubuschok B, Schormann C, Mischo A, Ertan K, Schmidt W y Pfreundschuh M; *Identification of an HLA-DR-restricted peptide epitope with a promiscuous binding pattern derived from the cancer testis antigen HOM-MEL-40/SSX2*; «Int J Cancer.» 2004; 112 (4): 661-8). El umbral de puntuación de 18 o más para una unión de importancia se definió en base a los análisis de puntuaciones de uniones para ligandos peptídicos de HLA-DR de unión promiscua publicadas con anterioridad. La unión promiscua se define como la unión de un péptido con buena fuerza de unión, revelada por una puntuación de 18 o más en el test SYFPEITHI, a dos o más alelos de HLA-DR comunes. Los alelos de HLA-DR más comunes se describen en la tabla 7. Los locus de HLA-A y HLA-DR se encuentran en combinaciones de desequilibrio de unión de HLA-A2 y HLA-DR específico que se favorecen en comparación con otros. Los genotipos de HLA-DR de los tumores de origen se analizaron y se confirmó que, en ambos casos, se trataba de los HLA-DRB1\*11 y DRB1\*15. En la tabla 4 se describen los residuos de aminoácidos conservados preferidos para los alelos de HLA de clase II más comunes (DRB1\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*0401, DRB1\*0701, DRB1\*1101, and DRB1\*1501). Por ejemplo, el alelo de HLA de clase II DRB1\*0301 une preferentemente en su surco de unión péptidos que muestran residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 4, 6 y 9 del extremo N- a C-terminal de la secuencia central de cualquier péptido dado. Concretamente, el

DRB1\*0301 muestra una buena unión si la secuencia central del péptido tiene un residuo de glutamato (D) en la posición 4; L, I, F, M o V en la posición 1; K, R, E, Q o N en la posición 6 y Y, L o F en la posición 9.

**Tabla 4: Motivos peptídicos de alelos HLA-DR comunes.**

Se describen aminoácidos conservados en un código de letras en las cavidades de unión correspondientes.

5

alelo de HLA	Posición														
	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+
													1	2	3
DRB1*0101				Y			L		A			L			
				V			A		G			I			
				L			I		S			A			
				I			V		T			V			
				F			M		C			N			
				A			N		P			F			
				M			Q					Y			
				W											
DRB1*0301				L			D		K			Y			
				I					R			L			
				F					E			F			
				M					Q						
				V					N						
DRB1*0401				F			P		N	D		D			
				Y			W		S	E		E			
				W			I		T	H		H			
				I			L		Q	K		K			
				L			V		H	N		N			
				V			A		R	Q		Q			
				M			D		R			R			
							E		S			S			
												T			T
												Y			Y
												A			A

ES 2 373 907 T3

			C	C
			I	I
			L	L
			M	M
			V	V
DRB1*0701	F	D	N	V
	Y	E	S	I
	W	H	T	L
	I	K		Y
	L	N		F
	V	Q		
		R		
		S		
		T		
		Y		
<hr/>				
DRB1*1101	W	L	R	A
	Y	I	K	G
	F	V	H	S
		M		P
		A		
		F		
		Y		
DRB1*1501	L	F	I	
	V	Y	L	
	I	I	V	
			M	
			F	
<hr/>				

5

Los resultados de los análisis *in silicio* basados en algoritmos hechos por ordenador para la predicción de la interacción entre moléculas de HLA y secuencias de péptidos proporcionados a través de [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de) indican que el péptido MMP7<sub>247-262</sub> de SEQ ID n.º 1 se une de forma promiscua a varios alelos de HLA-DR. En conformidad con los resultados del análisis predictivo, la puntuación de unión del péptido con SEQ ID n.º 1 es alta para la interacción con DRB1\*1101, DRB1\*1501, DRB1\*0401, DRB1\*0301 y DRB1\*0101 (tabla 7). Los alelos de HLA-DR analizados en este test para la interacción con la secuencia de aminoácidos cubre, al menos, un 69,6% de la

población caucásica con HLA-A2 positivo (Mori M, Beatty P. G, Graves M, Boucher K. M, Milford E. L; *HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry*; «Transplantation»; 1997; 64 (7): 1017-27). Teniendo en cuenta que no hay datos de frecuencia disponibles para el HLA-DR15, el alelo no se tuvo en cuenta para calcular la cobertura resultante de la población caucásica con HLA-A2 positivo. Por lo tanto, es muy probable que con la SEQ ID n.º 1, la cobertura de la población se aún mayor de 69,6%, lo que indica que el péptido tiene una excelente perspectiva de servir como candidato para el desarrollo de preparaciones farmacéuticas para la mayoría de pacientes de cáncer.

Sin embargo, la aplicación de los algoritmos de predicción sólo lleva a resultados concluyentes si los resultados de los análisis *in silicio* se combinan con la confirmación experimental de la unión promiscua, como se ha demostrado con estudios anteriores, que no pudieron mostrar respuestas inmunes desencadenadas por una secuencia de péptidos que se suponía buen agente de unión (Bohm C. M, Hanski M. L, Stefanovic S, Rammensee H. G, Stein H, Taylor-Papadimitriou J, Riecken E. O, Hanski C; *Identification of HLA-A2-restricted epitopes of the tumor-associated antigen MUC2 recognized by human cytotoxic T-cells*; «Int J Cancer»; 1998; 75 (5): 688-93). La predicción de productos como los mencionados en el caso anterior no puede descartarse, ya que los algoritmos usados para la predicción no tienen en cuenta que una secuencia de péptidos no se genera necesariamente en una situación *in vivo* (dentro de células vivas). La confirmación experimental se puede obtener mediante la recopilación de datos *in vitro* de pruebas biológicas como, por ejemplo, la demostración de la presencia o falta de inmunogenicidad de un péptido. Por lo tanto, se obtuvo la confirmación experimental de la unión promiscua de la SEQ ID n.º 1 mediante la recopilación de dichos datos *in vitro*. Para probar la capacidad inmuno-estimuladora de los péptidos por medio de experimentos de sensibilización *in vitro* de linfocitos T, se usaron las variantes más cortas («secuencia central») de los péptidos IGFBP3, IGFBP3<sub>169-181</sub>, y del péptido MMP7, MMP7<sub>247-262</sub>.

Con el fin de generar linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de antígeno y de probar la unión promiscua de los péptidos, se estimularon PBMC de 4 donantes sanos con alelos HLA-DR diferentes (figura 2), uno de ellos con DRB1\*1101, usando células dendríticas autólogas sensibilizadas de forma reiterada con el péptido. Además, como control positivo se usó el péptido CCND1<sub>198-212</sub>, un conocido epítipo de linfocito T (Dengjel J, Decker P, Schoor O, Altenberend F, Weinschenk T, Rammensee H. G y Stevanovic S; 2004; *Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry*; «Eur. J. Immunol.» 34: 3644-3651). Como sistema de lectura para la generación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de antígeno, se calcularon los niveles de IFN $\gamma$  mediante citometría de flujo. Los linfocitos T se analizaron, después de las estimulaciones semanales tercera y cuarta mediante tinción de IFN $\gamma$  intracelular, CD4-FITC y CD8-PerCP, para determinar el porcentaje de células productoras de IFN $\gamma$  en subpoblaciones de linfocitos T específicas. En todos los experimentos se efectuaron estimulaciones con péptidos irrelevantes y sin péptidos como controles negativos. La respuesta de IFN $\gamma$  se consideró positiva cuando el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  fue dos veces mayor en comparación con los controles negativos (Horton H, Russell N, Moore E, Frank I, Baydo R, Havenar-Daughton C, Lee D, Deers M, Hudgens M, Weinhold K y Mc Elrath M. J; 2004; *Correlation between interferon- gamma secretion and cytotoxicity, in virus-specific memory T-cells*; «J. Infect. Dis.» 190: 1692-1696).

En tres donantes de cuatro, los inventores pudieron generar linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para ambos péptidos (figura 2). Después de las estimulaciones, no se observaron respuestas de linfocitos T en el donante 4. En el donante 1 se detectó un porcentaje de 0,05 a 0,1 de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  (figura 3) en los siete intentos de estimulación tras la tercera estimulación con el péptido IGFBP3<sub>169-181</sub>. Estos linfocitos T pudieron expandirse, en la mayoría de los casos, a un porcentaje de entre 0,09 y 0,13 mediante una ronda adicional de estimulación. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  específicos para el péptido IGFBP3<sub>169-181</sub> también se observaron en los donantes 2 y 3, con frecuencias máximas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  de 0,05% y 0,07%.

Los donantes 1, 2 y 3 también mostraron linfocitos T CD4<sup>+</sup> reactivos al péptido MMP7<sub>247-262</sub>. Las frecuencias más altas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  específicas para el péptido MMP7 se encontraron en los donantes 1 y 2, respectivamente. Los donantes 1, 2 y 3 mostraron respuestas IFN $\gamma$  al péptido CCND1<sub>198-212</sub>, que ya había sido descrito como un epítipo de linfocito T con restricción de MHC de clase II (Dengjel J, Decker P, Schoor O, Altenberend F, Weinschenk T, Rammensee H. G y Stevanovic S; 2004; *Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry*; «Eur. J. Immunol.» 34: 3644-3651).

Así, los péptidos de IGFBP3, MMP7 y CCND1 son agentes de unión promiscuos de HLA de clase II capaces de provocar respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en tres de cuatro donantes sanos con alelos HLA DR diferentes. Si se comparan los alelos HLA de los dos pacientes con tumor de los que derivan los péptidos IGFBP3 y MMP7 con los de los cuatro donantes sanos, resulta obvio que los péptidos son presentados por HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*04 y HLA-DRB1\*11. Los tres alotipos HLA DR mencionados anteriormente tienen un residuo de glicina en la posición 86 y un residuo de ácido aspártico en la posición 57 de sus cadenas  $\beta$ , respectivamente (véase [www.anthonynolan.com/HIG](http://www.anthonynolan.com/HIG)). Por lo tanto, sus características de unión para las cavidades de unión P1 y P9 son muy similares (Rammensee H. G, Bachmann J y Stevanovic S; 1997; *MHC Ligands and Peptide Motifs*. «Springer-Verlag», Heidelberg, Alemania). Ocurre lo mismo con el péptido CCND1<sub>198-212</sub>, un epítipo de linfocito T que se sabe que es presentado por HLA-DRB1\*0401 y HLA-DRB1\*0408 (Dengjel J, Decker P, Schoor O, Altenberend F,

5 Weinschenk T, Rammensee H. G y Stevanovic S; 2004; *Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry*; «Eur. J. Immunol.» 34: 3644-3651). El donante 4 porta HLA-DRB1\*0318 y HLA-DRB1\*1401, alelos con motivos peptídicos que difieren en la secuencia primaria de aminoácidos de sus cadenas β de las descritas más arriba. Esto podría explicar por qué no fue posible provocar respuestas de linfocitos T contra los dos péptidos usando células de este donante.

Resulta interesante que los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> productores de IFNγ se detectasen en dos donantes tras estimulaciones con los tres péptidos, en particular en el donante 3, pero también, en menor medida, en el donante 1 (no se muestran datos).

**Tabla 5:**

<b>Fragmento</b>	<b>Masa [M+H]<sup>+</sup></b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
b2	216,1	SQ
y4	447,3	GKRS
y6	723,4	LYGKRS
y7	851,5	KLYGKRS
y8	979,6	QKLYGKRS
y9	1092,6	IQKLYGKRS
y10	1149,7	GIQKLYGKRS
y11	1277,8	KGIQKLYGKRS
y12	1390,8	IKGIQKLYGKRS
y13	1505,9	DIKGIQKLYGKRS
y14	1620,9	DDIKGIQKLYGKRS

R 129,1 immonium R

10

**Tabla 6:**

<b>Haplotipo</b>		<b>Frecuencia</b>
<b>HLA-A</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>[%]</b>
2	1	8.8
2	2	14.9
2	3	6.1
2	4	21.3
2	5	1.2
2	6	15.2
2	7	13.0
2	8	4.2
2	9	1.2
2	10	1.4
2	11	8.7

2	12	2.6
2	n.a.	1.4

**Tabla 6:** Frecuencias de haplotipo de población caucásica norteamericana. Se muestran los haplotipos serológicos. «n.a.» significa «no asignado».

**Tabla 7:** Puntuaciones de unión de la SEQ ID n.º 1 a alelos comunes HLA-DR.

- 5 Se muestran las puntuaciones de unión SYFPEITHI de las SEQ ID n.º 1 y SEQ ID n.º 25 para los alelos HLA-DRB1 más comunes en poblaciones caucásicas. Las frecuencias de los correspondientes haplotipos serológicos de caucásicos HLA-A2<sup>7</sup> se dan entre paréntesis. Se considera que los péptidos se unen suficientemente bien a una molécula HLA de clase II si la puntuación es igual o mayor que 18.

Antígeno	alelo DRB1*					
	0101 (8.8%)	0301 (6.1%)	0401 (21.3%)	0701 (13.0%)	1101 (8.7%)	1501 (n.a.%)
SEQ ID n.º 1	35	18	20	14	26	20
SEQ ID n.º 25	28	28	20	18	26	18

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Immatix biotechnologies GmbH
- <120> Péptidos asociados a tumores unidos promiscuamente a moléculas del  
 5 antígeno de leucocito humano (HLA) de clase II
- <130> FB19802/B
- <140> EP09011319.2
- <141> 2009-09-05
- <160> 79
- 10 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 15 <400> 1
- Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser
- 1 5 10 15
- <210> 2
- 20 <211> 17
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
- Asn Lys Gln Lys Pro Ile Thr Pro Glu Thr Ala Glu Lys Leu Ala Arg
- 25 1 5 10 15
- Asp
- 30 <210> 3
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 3
- 35 Asp Asp Pro Ser Thr Ile Glu Lys Leu Ala Lys Asn Lys Gln Lys Pro

ES 2 373 907 T3

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Pro Leu Lys Ile Phe Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His

1 5 10 15

10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 5

Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg

1 5 10

<210> 6

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Asn Glu Leu Gln Glu Met Ser Asn Gln Gly Ser Lys

25 1 5 10

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Ala Gly Leu Leu Ser Thr Tyr Arg Ala Phe Leu Ser Ser His

1 5 10 15

35 <210> 8

# ES 2 373 907 T3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

5 Ala Pro Ser Leu Arg Pro Lys Asp Tyr Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys

1 5 10 15

Ser Leu Asn Asn Gln

20

10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 9

Gly Pro Val Asp Glu Val Arg Glu Leu Gln Lys Ala Ile Gly Ala Val

1 5 10 15

Pro

20

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Asn His Val Val Ser Val Ala Gly Trp Gly Ile Ser Asp Gly

1 5 10 15

30 <210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

35 Val Pro Asp Asp Arg Asp Phe Glu Pro Ser Leu Gly Pro Val Cys Pro

# ES 2 373 907 T3

1 5 10 15

Phe Arg

5

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 12

Leu Pro Gln Ser Ile Val Tyr Lys Tyr Met Ser Ile Arg Ser Asp Arg

1 5 10 15

Ser Val Pro Ser

15 20

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 13

Ile Val His Arg Tyr Met Thr Ile Thr Ser Glu Arg Ser Val Pro Ala

1 5 10 15

25 <210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

30 Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys

1 5 10

<210> 15

<211> 15

35 <212> PRT

# ES 2 373 907 T3

<213> Homo sapiens  
<400> 15  
Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro  
1 5 10 15  
5  
<210> 16  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
10 <400> 16  
Gly Ala Thr Tyr Asn Ile Ile Val Glu Ala Leu Lys Asp Gln  
1 5 10  
  
<210> 17  
15 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 17  
Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro  
20 1 5 10 15  
  
<210> 18  
<211> 16  
<212> PRT  
25 <213> Homo sapiens  
<400> 18  
Ile Pro Gly His Leu Asn Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Leu Lys Pro Gly  
1 5 10 15  
  
30 <210> 19  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 19  
35 Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu

ES 2 373 907 T3

1 5 10

<210> 20

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Asn Thr Asp Leu Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro

1 5 10 15

10

Glu

<210> 21

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn

20 1 5 10

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 22

Val Lys Glu Pro Val Ala Val Leu Lys Ala Asn Arg Val Trp Gly Ala

1 5 10 15

30 Leu

<210> 23

<211> 16

35 <212> PRT

# ES 2 373 907 T3

<213> Homo sapiens

<400> 23

Thr Ala Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys

1 5 10 15

5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 24

His Pro Leu His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys

1 5 10 15

<210> 25

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys Asp Ser Gln

20 1 5 10 15

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Pro Lys His Thr Arg Ile Ser Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Lys

1 5 10 15

30 Lys Asp

<210> 27

<211> 18

35 <212> PRT

# ES 2 373 907 T3

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Pro Glu Asp Asn Val Val Ile Ile Tyr Leu Ser Arg Ala Gly Asn

1 5 10 15

5

Pro Glu

<210> 28

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ser Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys Thr Ile Thr Val Thr Pro Asn

15 1 5 10 15

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Asp Leu Ser Phe Asn Gln Ile Ala Arg Leu Pro Ser Gly Leu Pro

1 5 10 15

25 Val

<210> 30

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Lys Leu Pro Ser Val Glu Gly Leu His Ala Ile Val Val Ser Asp Arg

1 5 10 15

35

# ES 2 373 907 T3

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 31

Asp Thr Ser Thr Leu Glu Met Met His Ala Pro Arg Cys Gly

1            5            10

<210> 32

10 <211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Asp Gln Asn Thr Ile Glu Thr Met Arg Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro

15 1            5            10            15

Asp

20 <210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

25 Asn Pro Gly Glu Tyr Arg Val Thr Ala His Ala Glu Gly Tyr Thr Pro

1            5            10            15

Ser

30

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 34

# ES 2 373 907 T3

Leu Asp Phe Leu Lys Ala Val Asp Thr Asn Arg Ala Ser Val Gly

1            5            10            15

<210> 35

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Asp Arg

10 1            5            10            15

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Ala Ile Glu Ala Leu His Gly His Glu Leu Arg Pro Gly

1            5            10

20 <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

25 Asp Pro Gly Val Leu Asp Arg Met Met Lys Lys Leu Asp Thr Asn Ser

1            5            10            15

Asp

30

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 38

# ES 2 373 907 T3

Asn Glu Glu Glu Ile Arg Ala Asn Val Ala Val Val Ser Gly Ala Pro

1 5 10 15

<210> 39

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Pro Ala Ile Leu Ser Glu Ala Ser Ala Pro Ile Pro His

10 1 5 10

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 40

Lys Val Ile Gln Ala Gln Thr Ala Phe Ser Ala Asn Pro Ala

1 5 10

20 <210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

25 Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro

1 5 10 15

Ser

30

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 42

# ES 2 373 907 T3

Thr Asn Gly Val Val His Val Ile Thr Asn Val Leu Gln Pro Pro Ala

1 5 10 15

<210> 43

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Thr Thr Gln Leu Tyr Thr Asp Arg Thr Glu Lys Leu Arg Pro Glu

10 1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gly Lys Lys Glu Tyr Leu Ile Ala Gly Lys Ala Glu Gly Asp Gly

1 5 10 15

20 <210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

25 Met Gly Glu Ile Ala Ser Phe Asp Lys Ala Lys Leu Lys Lys Thr

1 5 10 15

<210> 46

<211> 14

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Ala Glu Ile Glu Lys Phe Asp Lys Ser Lys Leu Lys Lys

1 5 10

35

ES 2 373 907 T3

<210> 47  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 47  
Val Val Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Gly Ala Glu Lys Lys  
1 5 10 15

<210> 48  
10 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 48  
His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys  
15 1 5 10

<210> 49  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 49  
Asn Pro Pro Ser Met Val Ala Ala Gly Ser Val Val Ala Ala Val  
1 5 10 15

25 <210> 50  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 50  
30 Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp Glu Ser Gly Pro Ser Ile Val His  
1 5 10 15

Arg Lys Cys Phe  
20  
35

# ES 2 373 907 T3

<210> 51  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 51  
Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro  
1 5 10

<210> 52  
10 <211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 52  
Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly  
15 1 5 10

<210> 53  
<211> 16  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 53  
Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser  
1 5 10 15

25 <210> 54  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 54  
30 Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr  
1 5 10 15

Glu Leu Val Asn Phe  
20  
35

ES 2 373 907 T3

<210> 55  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 55  
Tyr Pro Lys Ser Leu His Met Tyr Ala Asn Arg Leu Leu Asp His Arg  
1 5 10 15

<210> 56  
10 <211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 56  
Glu Pro Tyr Tyr Lys Met Gln Thr Arg Ala Gly Ser Arg Glu  
15 1 5 10

<210> 57  
<211> 20  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 57  
Ala Pro Pro Ser Gly Gly Pro Gly Phe Leu Ser Ile Glu Arg Pro Asp  
1 5 10 15

25 Ser Arg Pro Pro  
20

<210> 58  
<211> 14  
30 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 58  
Phe Gly Pro Ile Tyr Asn Tyr Lys Asp Thr Ile Val Phe Lys  
1 5 10

35

# ES 2 373 907 T3

<210> 59  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 59  
Ser Pro Asp Pro Ser Ile Tyr Ala Tyr Asp Asn Phe  
1 5 10

<210> 60  
10 <211> 23  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 60  
Glu Pro Pro Val Ile Gln Asn Pro Glu Tyr Lys Gly Glu Trp Lys Pro  
15 1 5 10 15

Arg Gln Ile Asp Asn Pro Asp  
20

20 <210> 61  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 61

25 Gly Val Ile Lys Val Phe Asn Asp Met Lys Val Arg Lys  
1 5 10

<210> 62  
<211> 15  
30 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 62  
Ala Pro Gly Tyr Leu Ala Ile Thr Lys Lys Val Ala Val Pro Tyr  
1 5 10 15

35

# ES 2 373 907 T3

<210> 63  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 63  
Ala Ser Val Asp Leu Lys Asn Thr Gly Arg Glu Glu Phe Leu Thr Ala  
1 5 10 15

<210> 64  
10 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 64  
Gly Asn His Gln Phe Ala Lys Tyr Lys Ser Phe Lys Val Ala Asp Glu  
15 1 5 10 15

<210> 65  
<211> 15  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 65  
Val Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly  
1 5 10 15

<210> 66  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 66  
30 Thr Pro Asp Ala Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys  
1 5 10

<210> 67  
<211> 12  
35 <212> PRT

ES 2 373 907 T3

<213> Homo sapiens

<400> 67

Phe Val Met Gly Val Asn His Glu Lys Tyr Asp Asn

1 5 10

5

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 68

Thr Gly Val Phe Thr Thr Met Glu Lys Ala Gly Ala His

1 5 10

<210> 69

15

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ile Ser Trp Tyr Asp Asn Glu Phe Gly Tyr Ser Asn Arg Val Val Asp

20

1 5 10 15

Leu Met Ala His Met Ala Ser Lys Glu

20 25

25

<210> 70

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

30

Gly Thr Gly Ala Ser Gly Ser Phe Lys Leu Asn Lys Lys Ala Ala Ser

1 5 10 15

Gly Glu Ala Lys Pro Lys

20

35

ES 2 373 907 T3

<210> 71  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5 <400> 71  
Asp Val Gly Val Tyr Arg Ala Val Thr Pro Gln Gly Arg Pro Asp  
1 5 10 15

<210> 72  
10 <211> 15  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 72  
Asp Val Gly Glu Phe Arg Ala Val Thr Glu Leu Gly Arg Pro Asp  
15 1 5 10 15

<210> 73  
<211> 16  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapiens  
<400> 73  
His Pro Leu His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly His Ala Lys  
1 5 10 15

<210> 74  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 74  
30 Asp Lys Asp Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys  
1 5 10

<210> 75  
<211> 14  
35 <212> PRT

# ES 2 373 907 T3

<213> Homo sapiens

<400> 75

Lys Asp Lys Thr Tyr Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Pro Val Lys

1            5            10

5

<210> 76

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 76

Val Ile Lys Met Gly Val Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser

1            5            10            15

His Lys Glu

15

<210> 77

<211> 21

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val

1            5            10            15

25 Asn Pro Thr Gln Lys

20

<210> 78

<211> 15

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys

1            5            10            15

35

ES 2 373 907 T3

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 79

Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser

1            5            10            15

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido asociado a tumor, donde el péptido consta de la secuencia de aminoácidos HSKIIIIKKGHAKDSQ conforme a la secuencia SEQ ID n.º 25.
- 5 2. Un péptido asociado a tumor de entre 9 y 30 aminoácidos, que consta de una secuencia con arreglo a la SEQ ID n.º 25, en donde uno o dos de los residuos de aminoácido son alterados mediante el reemplazo de la cadena lateral del mismo con la cadena lateral de otro aminoácido natural, de forma que el péptido todavía es capaz de unirse a una molécula HLA de la misma forma que el mencionado péptido conforme a la secuencia SEQ ID n.º 25.
- 10 3. El péptido asociado a un tumor conforme a las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido incluye enlaces no peptídicos.
4. Un ácido nucleico compuesto por una secuencia que codifica un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
5. Un vector de expresión que codifica un ácido nucleico conforme a la reivindicación 4.
- 15 6. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico conforme a la reivindicación 4, o un vector de expresión conforme a la reivindicación 5, en donde la mencionada célula huésped no es una célula madre embrionaria humana.
7. Un método para producir un péptido asociado a tumor conforme a la reivindicación 1 ó 2. El método comprende el cultivo de la célula huésped conforme a la reivindicación 6 y el aislamiento del péptido de la célula huésped o de su medio de cultivo.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende un péptido asociado a tumor conforme a la reivindicación 1 ó 2, un ácido nucleico conforme a la reivindicación 4 o un vector de expresión conforme a la reivindicación 5 y un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en forma de vacuna contra el cáncer, que comprende, opcionalmente, al menos un adyuvante adecuado.
- 25 9. El compuesto farmacéutico conforme a la reivindicación 8, que además consta, al menos, de un péptido adicional asociado a tumor de entre 9 y 30 aminoácidos que cuentan, al menos, con una secuencia según SEQ ID n.º a SEQ ID n.º 24 y SEQ ID n.º 26 a SEQ ID n.º 49.
10. Un péptido asociado a un tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, un ácido nucleico conforme a la reivindicación 4 o un vector de expresión conforme a la reivindicación 5 para su uso en medicina.
- 30 11. El uso de un péptido asociado a tumor conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o un ácido nucleico conforme a la reivindicación 4 o un vector de expresión conforme a la reivindicación 5 en la fabricación de un medicamento para destruir células de cáncer en un paciente, en donde las células de cáncer expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como la de la reivindicación 1 ó 2.
- 35 12. El uso de un péptido asociado a un tumor conforme a la reivindicación 1 ó 2 o de un ácido nucleico conforme a la reivindicación 4, o de un vector de expresión conforme a la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmune, en particular una respuesta celular inmune y, más particularmente, una respuesta inmune mediada por linfocitos T contra células de tumores sólidos que expresan una molécula MHC humano de clase II en su superficie y presentan un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como las dadas en la reivindicación 1 ó 2.
- 40 13. 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 II 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 reivindicación 1 ó 2.
- 45

Figura 1:

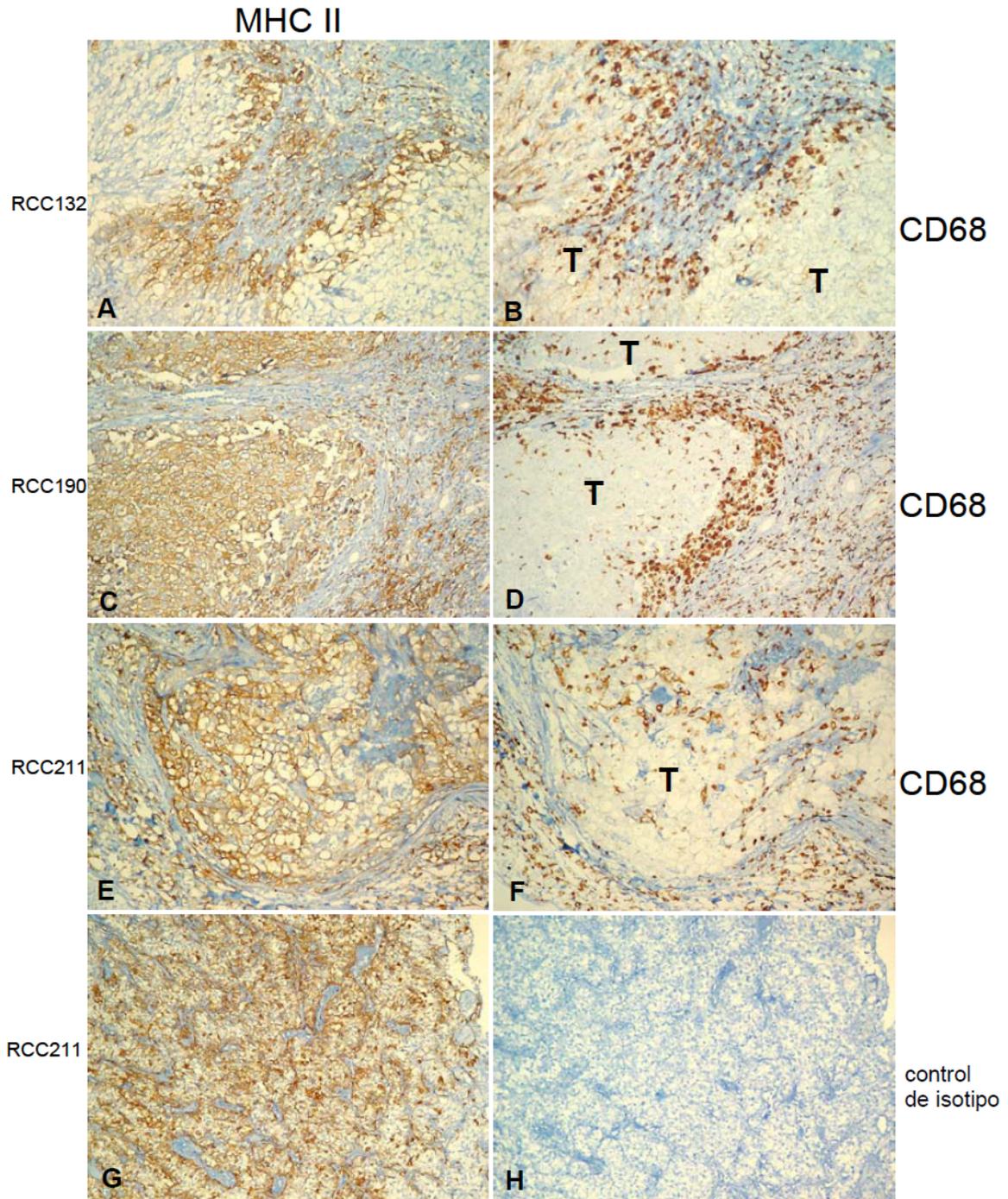
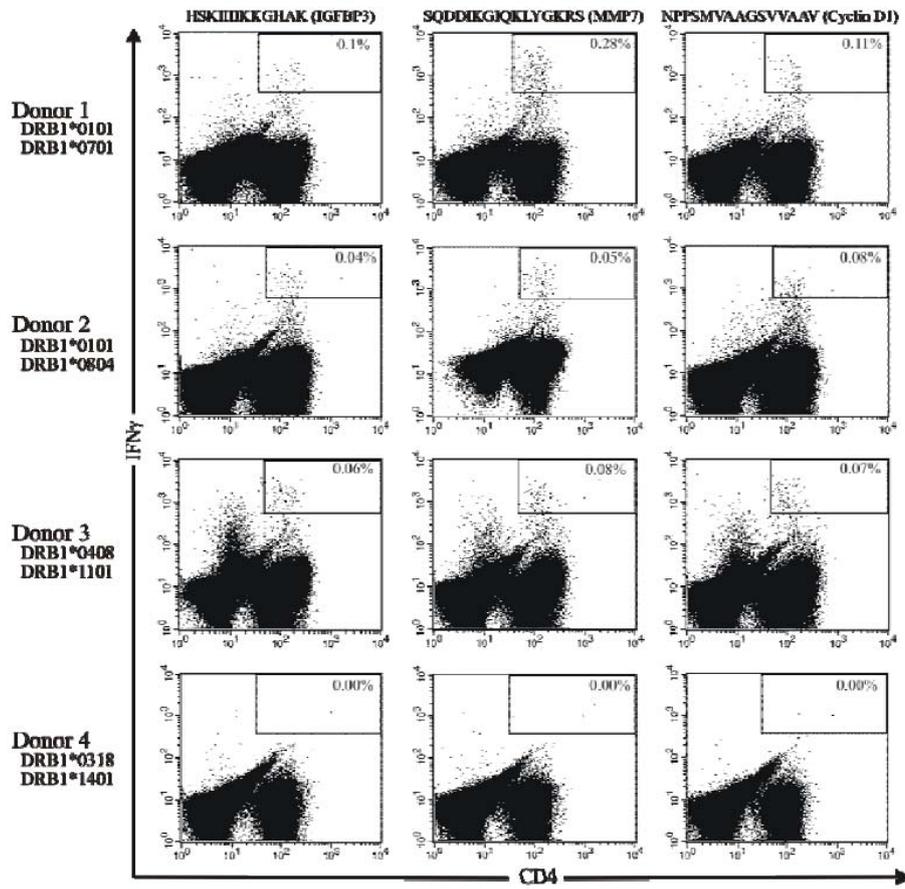


Figura 2:



5

10

Figura 3:

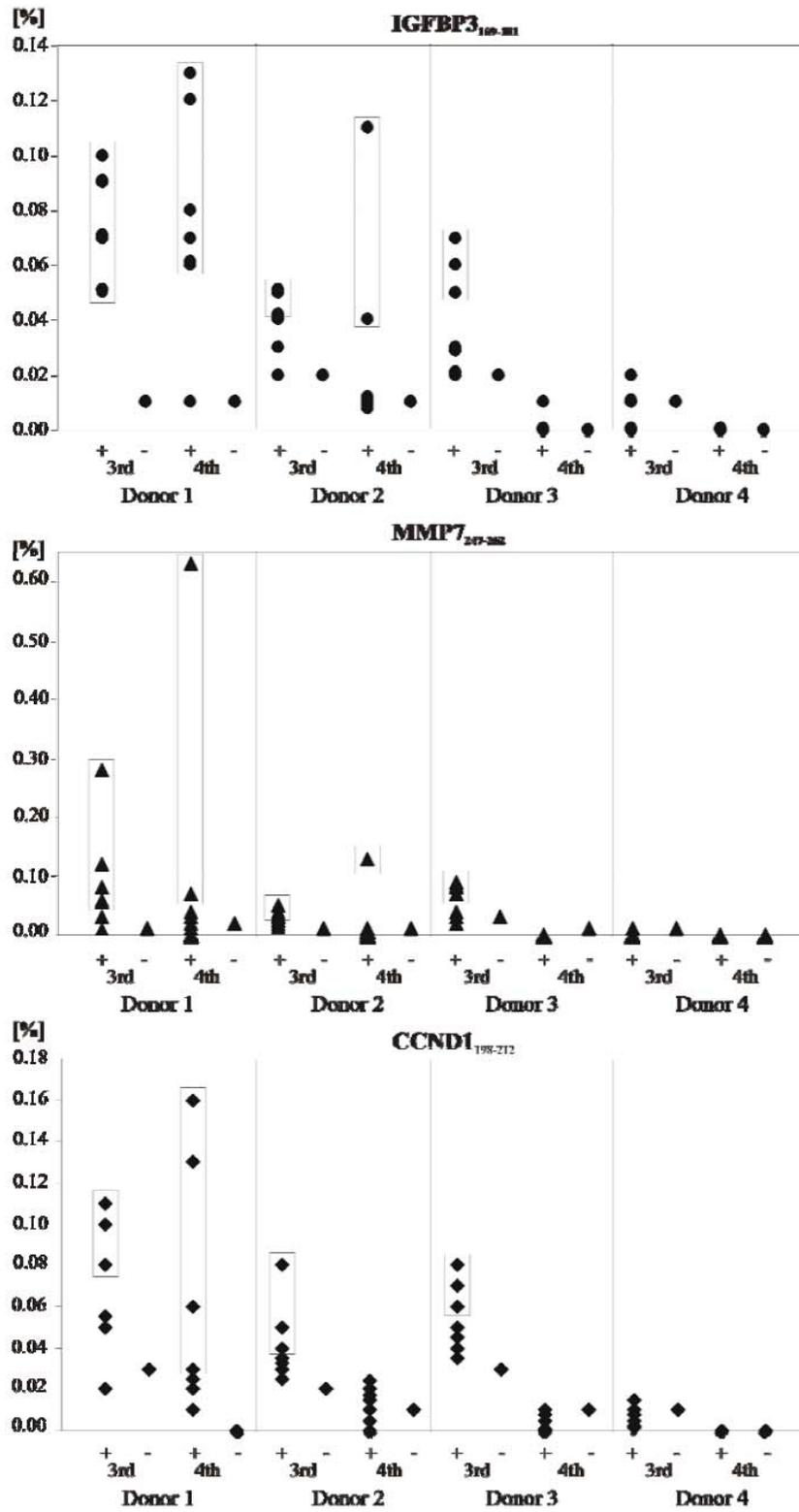


Figura 4:

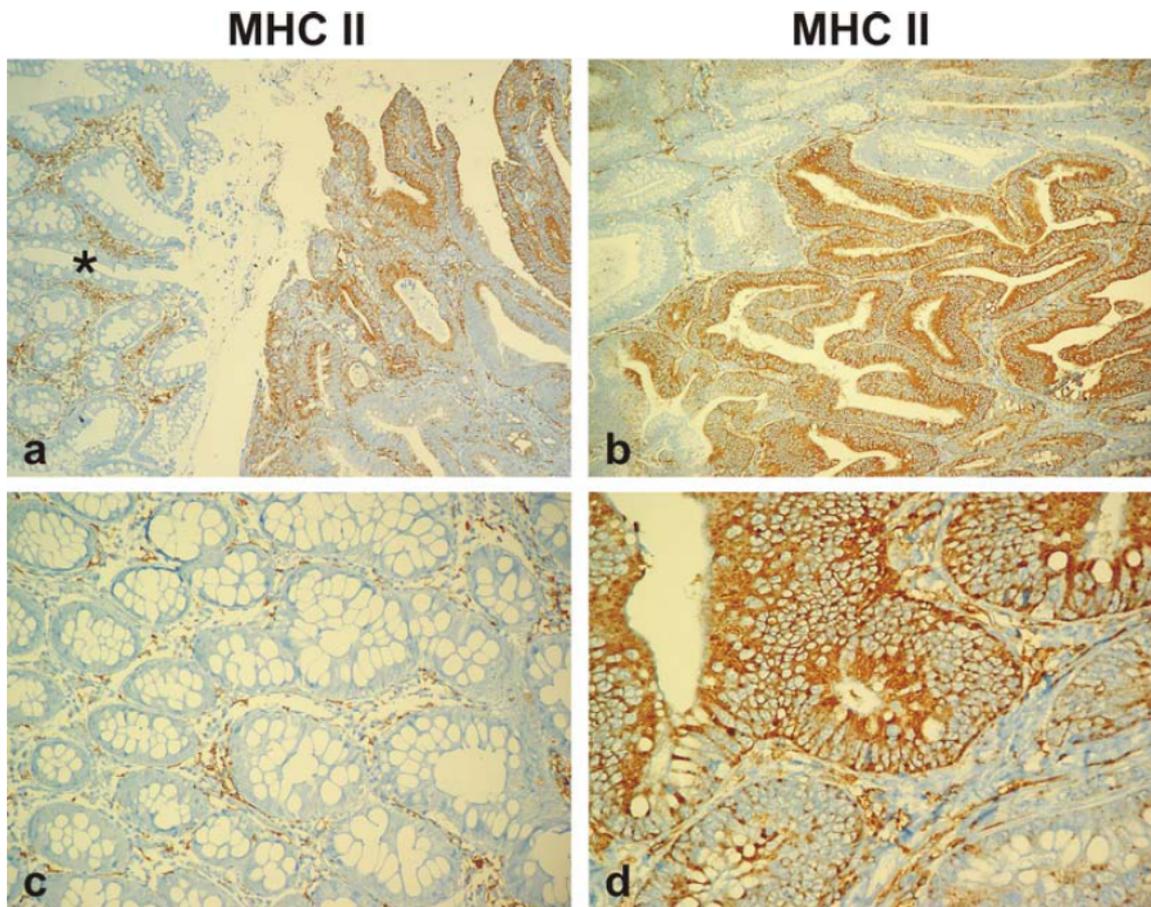


Figura 5a:

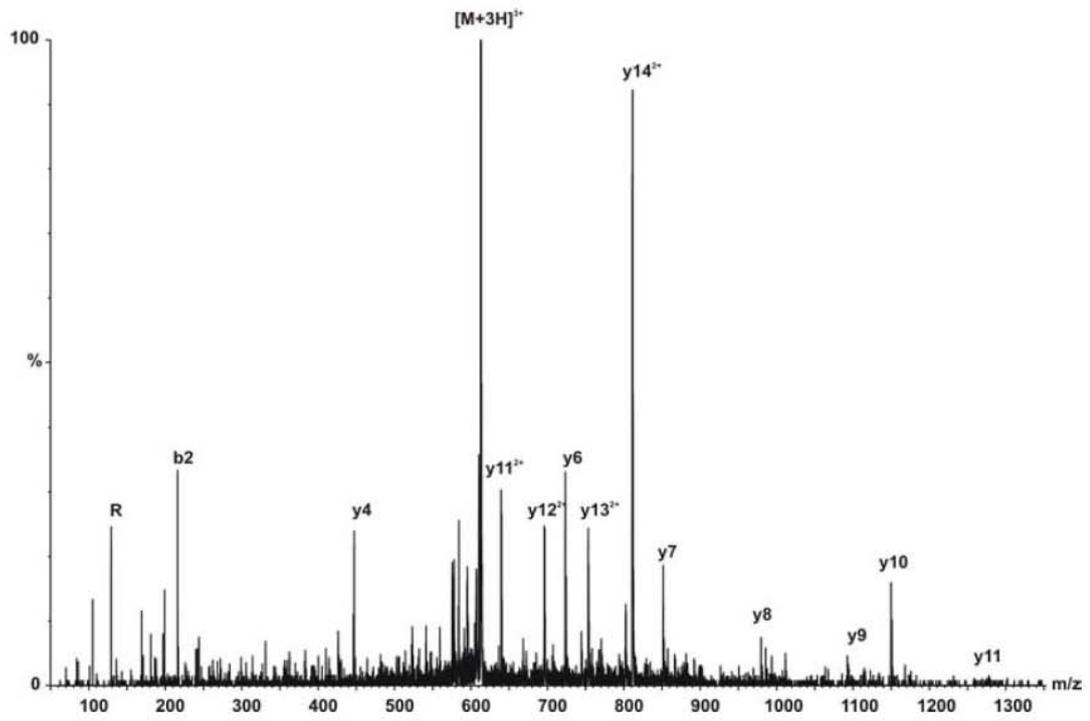


Figura 5b:

