

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 821**

51 Int. Cl.:
C12N 15/09 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **A61K 47/42** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **C07K 14/435** (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07105178 .3**
96 Fecha de presentación: **18.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1862544**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

54 Título: **Polipéptidos capaces de estimular una reacción inmune contra el cáncer**

30 Prioridad:
22.12.2000 GB 0031430

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.06.2012

73 Titular/es:
GEMVAX AS
DRAMMENSVEIEN 100
0273 OSLO, NO

72 Inventor/es:
Gaudernack, Gustav;
Sæbøe-Larssen, Stein;
Møller, Mona y
Eriksen, Jon Amund

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 382 821 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

Polipéptidos capaces de estimular una reacción inmune contra el cáncer

5 La presente invención se refiere a polipéptidos y ácidos nucleicos de ADN que codifican dichos polipéptidos, capaces de estimular una reacción inmune contra el cáncer, a los métodos para generar linfocitos T capaces de reconocer y destruir células tumorales y a composiciones farmacéuticas para el tratamiento, profilaxis o diagnosis de cáncer.

10 El cáncer se desarrolla a través de un proceso multietapa que implica varios episodios mutacionales. Estas mutaciones dan como resultado una expresión/función alterada de genes que pertenecen a dos categorías: oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes surgen en la naturaleza de proto-oncogenes a través de mutaciones puntuales o traslocalizaciones, dando como resultado con ello un estado transformado de la célula que alberga la mutación. Los oncogenes codifican para, y función a través de, una proteína. Los proto-oncogenes son genes normales de la célula que tienen el potencial de convertirse en oncogenes. En la mayoría de los casos, se ha demostrado que los proto-oncogenes son componentes de mecanismos de transducción de señal. Los oncogenes actúan de un modo dominante. Por otro lado, los genes supresores de tumor actúan de un modo recesivo, es decir a través de la pérdida de función, y contribuyen a la oncogénesis cuando ambos alelos que codifican la proteína funcional han sido alterados para producir productos génicos no funcionales.

20 En el campo de la inmunología de cáncer humano, las dos últimas décadas han contemplado importantes esfuerzos por caracterizar los antígenos específicos de cáncer genuinos. En particular, el esfuerzo se ha dedicado al análisis de anticuerpos para antígenos tumorales humanos. La técnica anterior sugiere que dichos anticuerpos pueden usarse con fines diagnósticos y terapéuticos, por ejemplo en relación con un agente anti-cancerígeno. Sin embargo, los anticuerpos sólo se pueden unir a antígenos tumorales que están expuestos sobre la superficie de células tumorales. Por esta razón, el esfuerzo para producir un tratamiento de cáncer basado en el sistema inmune del organismo ha tenido menos éxito de lo anticipado.

25 Una característica fundamental del sistema inmune es que puede distinguir moléculas propias de no propias y normalmente no reacción contra moléculas propias. Se ha demostrado que el rechazo de tejidos u órganos injertados procedentes de otros individuos es una respuesta inmune a antígenos extraños sobre la superficie de las células injertadas. La respuesta inmune comprende una respuesta humoral, mediada por anticuerpos, y una respuesta celular. Los anticuerpos son producidos y secretados por linfocitos B, y normalmente reconocen antígenos libres en conformación nativa. Por tanto, potencialmente pueden reconocer casi cualquier sitio expuesto sobre la superficie del antígeno. Al contrario que los anticuerpos, las células T, que median el brazo celular de la respuesta inmune, reconocen antígenos solamente en el contexto de moléculas de complejo de histocompatibilidad principal (MHC, del inglés "*major histocompatibility complex*"), y sólo después de un procesamiento del antígeno apropiado. Dicho procesamiento de antígeno normalmente consiste en la fragmentación proteolítica de la proteína, que da como resultado polipéptidos que se ajustan a la cavidad de las moléculas de MHC. Esto permite que las células T también reconozcan polipéptidos derivados de antígenos/fragmentos de proteína intracelulares.

35 Las células T pueden reconocer polipéptidos aberrantes derivados de cualquier zona de la célula tumoral, en el contexto de moléculas de MHC sobre la superficie de la célula tumoral. Las células T pueden ser activadas posteriormente para eliminar la célula tumoral que alberga el polipéptido aberrante. En los modelos experimentales que implican tumores murinos se ha demostrado que las mutaciones puntuales en las proteínas "propias" intracelulares pueden dar lugar a antígenos de rechazo del tumor, que consisten en polipéptidos que difieren en un único aminoácido respecto al polipéptido normal. Las células T que reconocen dichos polipéptidos en el contexto de moléculas de MHC sobre la superficie de las células tumorales son capaces de matar las células tumorales y rechazar así el tumor del hospedante (Boon y col., 1989, Cell 58: 293-303).

45 Las moléculas de MHC en humanos normalmente se denominan moléculas HLA (antígeno de leucocito humano). Existen dos clases principales de moléculas HLA: la clase I y la clase II. Las moléculas HLA de clase I se codifican mediante las sub-localizaciones de HLA A, B y C y activan principalmente células T citotóxicas CD8+. Las moléculas HLA de clase II, por otro lado, activan principalmente células T CD4+ (citotóxicas o colaboradoras), y se codifican mediante las sub-localizaciones de HLA DR, DP y DQ. Cada individuo normalmente tiene seis moléculas HLA de clase I diferentes, normalmente dos alelos de cada uno de los tres subgrupos A, B y C, aunque en algunos casos el número de moléculas HLA de clase I diferentes se reduce debido a la aparición dos veces del mismo alelo de HLA. Para una revisión general, véase Roitt, I.M. y col. (1998) *Immunology*, 5ª edición, Mosby, Londres.

55 Los productos génicos de HLA son altamente polimórficos. Diferentes individuos expresan distintas moléculas HLA que difieren de las que se dan en otros individuos. Esto explica la dificultad para encontrar donantes de órganos para trasplantes con igual HLA. La significancia de la variación genética de las moléculas HLA en inmunología subyace en su papel como genes de respuesta inmune. A través de su capacidad de unión de polipéptidos, la presencia o la ausencia de determinadas moléculas HLA gobierna la capacidad de un individuo para responder a epítopos de polipéptido específicos. Como consecuencia, las moléculas HLA influyen en la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad.

Las células T pueden inhibir el desarrollo y el crecimiento de cáncer mediante una variedad de mecanismos. Las células T citotóxicas, tanto las HLA de clase I CD8+ restringidas como las HLA clase II CD4+ restringidas, pueden matar directamente células tumorales que presenten los antígenos tumorales apropiados. Normalmente, las células T CD4+ colaboradoras son necesarias para las respuestas de células T CD8+ citotóxicas, pero si el polipéptido antígeno se presenta mediante un APC apropiado, las células T CD8+ citotóxicas pueden ser activadas directamente, lo que da como resultado una respuesta más rápida, más fuerte y más eficiente.

En la Solicitud de Patente Internacional PCT/N092/00032 (publicada como WO 92/14756) se describen polipéptidos sintéticos y fragmentos de productos proteínicos de oncogenes que tienen un punto de mutación o traslocalizaciones con respecto a su proto-oncogén o proteína génica supresora de tumor. Estos polipéptidos corresponden, cubren completamente o son fragmentos del fragmento de proteína de oncogén procesado o del fragmento de gen supresor tumoral tal como se presentan por células cancerosas u otras células presentadoras de antígenos, y son presentados como un complejo HLA-polipéptido por al menos un alelo en cada individuo. Se demostró que los polipéptidos inducen respuestas de células T específicas frente al fragmento de proteína de oncogén real producido por la célula mediante procesamiento y presentado en la molécula HLA. En particular, se describe en el documento WO 92/14756 que los polipéptidos derivados de la proteína p21-*ras* que presentaban mutaciones puntuales en posiciones concretas de aminoácidos, a saber, posiciones 12, 13 y 61. Se ha demostrado que estos polipéptidos son efectivos a la hora de regular el crecimiento de células cancerosas *in vitro*. Además, se demostró que los polipéptidos provocan inmunidad de células T CD4+ frente a células cancerosas albergando la proteína de oncogén p21-*ras* mutada a través de la administración de dichos polipéptidos en vacunación o en esquemas de terapia contra el cáncer. Posteriormente se ha demostrado que estos polipéptidos también provocan inmunidad de células T CD8+ contra células cancerosas albergando la proteína de oncogén p21 *ras* mutada a través de la administración mencionada anteriormente (Gjertsen, M.K. y col., 1997, Int. J. Cancer 72: 784-790).

La Solicitud de Patente Internacional PCT/N099/00143 (publicada como WO 99/58552) describe polipéptidos sintéticos y fragmentos de productos proteicos mutantes que surgen de las mutaciones estructurales que se producen en los genes de células cancerosas. Estos polipéptidos corresponden, cubren completamente o son fragmentos del fragmento de proteína mutante de estructura procesada tal como es presentado por células cancerosas u otras células presentadoras de antígenos, y son presentados como un complejo HLA-polipéptido por al menos un alelo de cada individuo. En particular, se describen los polipéptidos que son resultado de mutaciones estructurales en los genes BAX y hTGFβ-RII. Se demostró que dichos polipéptidos son efectivos para estimular células T CD4+ y CD8+ de un modo específico.

Sin embargo, los polipéptidos descritos anteriormente serán útiles solo en cierto número de cánceres que implican oncogenes con mutaciones puntuales, mutaciones estructurales o traslocalización en un proto-oncogén o gen supresor tumoral. Existe una enorme necesidad de un tratamiento o vacuna anti-cáncer que sea efectiva contra un rango genérico de cánceres.

La acción concertada de una combinación de oncogenes y genes supresores tumorales alterados da como resultado una transformación celular y el desarrollo de un fenotipo de malignidad. Sin embargo, dichas células son propensas a la senescencia y tienen una longevidad limitada. En la mayoría de los cánceres, la inmortalización de las células tumorales requiere la activación de un complejo enzimático denominado telomerasa. En las células somáticas normalmente la subunidad catalítica de la holoenzima telomerasa, hTERT (transcriptasa inversa de telomerasa humana, del inglés “human telomerase reverse transcriptase”), no es expresada. Otros eventos adicionales, tales como la acción de proteínas codificadas por un virus tumoral o una desmetilación de sitios promotores silenciados (metilados), pueden dar como resultado la expresión de los genes que codifican los componentes del complejo de telomerasa funcional en células tumorales.

Debido a la presencia de telomerasa en la mayoría de los tipos de células cancerosas, la enzima ha sido descrita como un candidato general de vacuna contra el cáncer (Solicitud de Patente Internacional N° PCT/N099/00220, publicada como WO 00/02581. El documento WO 00/02581 describe un método para prevenir o tratar el cáncer mediante la generación de respuesta de células T contra células que expresan telomerasa en un mamífero que padece (o que tiene probabilidad de padecer) un cáncer. En WO 00/02581 se demuestra que se pueden estimular tanto células T CD4+ como células T CD8+ mediante la administración de polipéptidos que tengan secuencias derivadas de dicha proteína de telomerasa.

En bibliografía se han publicado variantes de división alternativas de pre-ARNm de telomerasa (Kilian, A. y col., 1997, Hum. Mol. Genet. 6: 2011-2019). Kilian y col. (1997, ver anterior) indicaron que debía destacar que varias variantes de división estaban localizadas dentro del dominio crítico RT (transcriptasa inversa) de hTERT. Sin embargo, concluyeron que no se había obtenido un entendimiento completo de la significancia de las variantes de división de hTERT y que se requería más caracterización funcional adicional.

El análisis de la secuencia genómica completa del gen *hTERT* ha verificado que las diferentes variantes de división de ARNm surgen del uso de sitios de división alternativos en el pre-ARNm de hTERT (Wick, M. y col., 1999, Gene 232: 97-106). En comparación con el ARNm de hTERT de longitud completa, se han detectado al menos cinco variantes de división adicionales. En la Figura 1 se muestra un dibujo esquemático de dichas variantes, y la Figura 2

muestra un alineamiento de las proteínas codificadas. Dos de las variantes de división, denominadas α -del (o DEL1) y β -del (o DEL2), representan eliminaciones de secuencias codificadoras específicas. La variante α -del ha borrado los primeros 36 nucleótidos del exón 6 y codifica una proteína que carece de una tira de 12 aminoácidos internos. En la variante β -del faltan 182 nucleótidos que representan los exones 7 y 8 completos, lo que conduce a un cambio en el marco de lectura abierto y una proteína truncada con un extremo carboxilo de 44 aminoácidos de longitud no presente en la proteína hTERT de longitud completa. El resto de variantes de división son el resultado del uso de sitios de división alternativos localizados dentro de regiones de intrón, lo que produce la inserción de secuencias de intrón dentro del marco de lectura abierto y una terminación prematura de la traducción. La variante injerto- σ (o INS1) procede de una inserción de los primeros 38 nucleótidos del intrón 4. El injerto- σ no contiene un codón de detención, sino que en su lugar el marco de lectura de abierto se extiende 22 nucleótidos en la secuencia normal usando un marco de lectura alternativo. La variante injerto- γ (o INS3) está provocada por la inserción de los últimos 159 nucleótidos del intrón 14. La Ins-4 contiene los primeros 600 nucleótidos del intrón 14 y al mismo tiempo tiene eliminado el exón 15 y la mayor parte del exón 16. Las proteínas truncadas que proceden de la traducción de estas variantes de división se muestran en la Figura 2.

Varios estudios recientes han determinado la regulación de la actividad de telomerasa, y se han publicado varias correlaciones entre la transcripción de ARNm de hTERT y la actividad de telomerasa para varias líneas celulares y tejidos (Nakamura, T.M. y col., 1997, *Science* 277: 955-959; Meyerson, M. y col., 1997, *Int. J. Cancer* 85: 330-335; Nakayama, J. y col., 1998, *Nature Genet.* 18: 65-68; Liu, K. y col., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5147-5152). Otros estudios han demostrado que la actividad de telomerasa se ve regulada al alza a través de la fosforilación de la proteína hTERT mediante la proteína quinasa C α , e inversamente, regulada a la baja por la presencia de inhibidores de proteína quinasa C y fosfatasa 2A (Li, H. y col., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 16729-16732; Li, H. y col., 1998, *J. Biol. Chem.* 273: 33436-33442; Bodnar, A.G. y col., 1996, *Exp. Cell Res.* 228: 58-64; Ku, W.C. y col., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 241: 730-736). La división alternativa del pre-ARNm de hTERT representa un mecanismo adicional para regular la actividad de telomerasa, y se ha demostrado que media en la regulación a la baja durante el desarrollo renal fetal y en tejidos adultos de ovario y útero (Ulaner, G.A. y col., 1998, *Cancer Res.* 58: 4168-4172; Ulaner, G.A. y col., 2000, *Int. J. Cancer* 85: 330-335). Los estudios anteriores se han centrado en las variantes de división α y β , presumiblemente porque eliminan secuencias que se cree que codifican estructuras de transcriptasa inversa críticas (Lingner, J. y col., 1997, *Science* 276: 561-567).

La presente invención proporciona péptidos y ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos basados en las variantes de división TERT γ y σ , y el uso novedoso de dichos péptidos y ácidos nucleicos en medicina.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención se proporciona un polipéptido para su uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer; en donde el polipéptido: a) comprende una secuencia dada en la SEC ID N°: 1 ó 2; b) comprende 8 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1 ó 2, siempre que al menos uno de dichos 8 aminoácidos contiguos sea de la SEC ID N°: 1; o c) comprende 8 aminoácidos contiguos que solo tienen una, dos o tres sustituciones de aminoácidos respecto a los 8 aminoácidos contiguos descritos antes en b), siempre que al menos uno de los 8 aminoácidos contiguos presentes sea de la SEC ID N° 1;

en donde el polipéptido es capaz de inducir una respuesta de células T.

El término "comprende" usado en la presente memoria incluye "consta". El polipéptido (o ácido nucleico) de la presente invención puede estar flanqueado por uno o más residuos de aminoácido (o ácido nucleico) a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, el polipéptido puede ser parte de una proteína de fusión que tenga uno o más dominios flanqueantes en el extremo N o C para permitir la purificación de la proteína de fusión.

Los cambios o modificaciones (sustituciones) de aminoácidos en el polipéptido pueden realizarse en particular en los residuos ancla que se ajustan a las moléculas de HLA o MHC para la presentación a las células T. De este modo se puede lograr propiedades de unión e inmunogénicas mejoradas del polipéptido con moléculas de HLA o MHC (véase Bristol, J.A. y col., 1998, *J. Immunol.* 160(5): 2433-2441; Clay, T.M. y col., 1999, *J. Immunol.* 162(3): 1749-1755).

El polipéptido descrito anteriormente opcionalmente puede:

a) tener al menos un 55% de identidad de secuencia con una molécula que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 1, determinada mediante una búsqueda NCBI BLASTP Versión 2.1.2 con parámetros por defecto; o

b) tener al menos un 55% de identidad de secuencia con una molécula que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 2, determinada mediante una búsqueda NCBI BLASTP Versión 2.1.2 con parámetros por defecto.

El programa NCBI BLASTP puede encontrarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, y los parámetros por defecto se pueden cambiar usando la búsqueda avanzada. Pueden requerirse valores superiores a las "Expect" por defecto cuando se busca con secuencias pista pequeñas para presentar coincidencias. La expresión "identidad de secuencia" usado en la presente memoria se refiere a residuos de aminoácido en secuencias alineadas óptimamente que coinciden exactamente en las posiciones relativas correspondientes. Por ejemplo, el programa

NCBI BLASTP proporciona un valor de porcentaje de identidad entre la secuencia pista (del inglés "query") y la secuencia sujeto ("hit").

El polipéptido descrito anteriormente puede comprender una secuencia como la proporcionada en la SEC ID N°: 1 ó 2, o puede ser un fragmento de una secuencia como la mostrada en la SEC ID N°: 1 ó 2.

5 Aunque los polipéptidos que son presentados por moléculas HLA de clase II son de longitud variable (12-25 aminoácidos), los polipéptidos presentados por moléculas HLA de clase I normalmente deben tener una longitud de nueve aminoácidos a fin de ajustarse al punto de unión de HLA de clase I. Un polipéptido de mayor longitud no se unirá si no puede ser procesado internamente por un APC o una célula diana, tal como una célula cancerosa, antes de presentarse en la zona de unión restringida de HLA de clase I. Sólo se ha publicado un número limitado de desviaciones de este requisito de nueve aminoácidos, y en dichos casos la longitud del polipéptido presentado ha sido de ocho o de diez aminoácidos. Para una revisión de la unión de polipéptidos a moléculas de MHC véase Rammensee, H.-G. y col. (1995) *Immunogenetics* 41: 178-228 y Barinaga (1992), *Science* 257: 880-881. Male, D.K. y col. (1996, *Advanced Immunology*, Mosby, Londres) proporciona información de antecedentes en el campo de la inmunología.

15 La respuesta de células T generada por el polipéptido descrito anteriormente puede ser generada después de una ruptura intracelular del polipéptido para proporcionar un fragmento que se ajuste en un punto de unión de MHC o HLA. Alternativamente, el polipéptido descrito anteriormente puede no necesitar una ruptura intracelular para ajustarse a un punto de unión de MHC o HLA de clase I. En este caso, el polipéptido puede tener una longitud de entre 8 y 10 aminoácidos. También se proporciona un polipéptido descrito anteriormente que no necesita una ruptura intracelular para ajustarse a un sitio de unión de MHC o de HLA de clase II. En este caso, el polipéptido puede tener una longitud de entre 12 y 25 aminoácidos.

La respuesta de células T de acuerdo con la presente invención puede aumentar el número y/o la actividad de células T colaboradoras y/o células T citotóxicas.

25 También se proporciona un polipéptido que no estimula una respuesta de células T citotóxicas sustancial en un paciente contra uno o más de los siguientes elementos: células madre de médula ósea, células epiteliales de criptas colónicas o linfocitos.

Además se proporciona de acuerdo con la presente invención una molécula de ácido nucleico para su uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune frente al cáncer; en donde la molécula de ácido nucleico:

30 a) tiene una cadena que codifica un polipéptido descrito anteriormente, tal como se ha descrito anteriormente;
b) tiene una cadena que es complementaria a una cadena como se ha descrito antes en a); o
c) tiene una cadena que se hibrida con una molécula como se ha descrito antes en a) o b) en condiciones severas.

Las condiciones de hibridación severas se discuten en detalle en las páginas 1.101-1.110 y 11.45-11.61 de Sambrook, J. y col. (1989, *Molecular Cloning*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).
35 Un ejemplo de condiciones de hibridación que pueden usarse implica el uso de una disolución de pre-lavado de 5 X SSC, 0,5% de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) e intentar la hibridación durante una noche a 55°C usando 5 X SSC. La hibridación de secuencias de ácido nucleico dentro del alcance de la presente invención incluye sondas, cebadores o fragmentos de ADN. El término cebador incluye un oligonucleótido de cadena sencilla que actúa como punto de inicio de la síntesis de ADN dirigida con plantilla en las condiciones apropiadas (por ejemplo, en presencia de cuatro trifosfatos de nucleósido diferentes y un agente para la polimerización, tal como ADN o ARN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada.

También se proporciona un vector o célula para su uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

45 Además se describe un agente de unión para su uso en medicina; en donde el agente de unión se une a un polipéptido descrito anteriormente como se ha descrito anteriormente. Dicho agente de unión puede ser específico para un polipéptido como el descrito anteriormente. Dicho agente de unión puede ser un anticuerpo o un fragmento del mismo. Dicho agente de unión puede ser lectina.

El término anticuerpo en sus diversas formas gramaticales se usa en la presente memoria para referirse a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de combinación de anticuerpo o paratopo. Dichas moléculas también se denominan "fragmentos de unión de antígeno" de moléculas de inmunoglobulina. Las moléculas de anticuerpos ilustrativas son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contengan el paratopo, incluyendo aquellas porciones que se conocen en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. El término anticuerpo también pretende abarcar anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos

- quiméricos, humanizados o primatizados (anclados a CDR) y otros similares, así como anticuerpos quiméricos o de cadena sencilla anclados a CDR, que comprenden porciones de dos especies diferentes. Para la preparación de anticuerpos véase Harlow, E. y Lane, D. (1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor). Se pueden usar adyuvantes inmunológicos para vacunas que comprenden lecitina para estimular la producción de anticuerpos (véase por ejemplo la patente de EE.UU. N° 4.803.070).
- Adicionalmente, de acuerdo con la presente invención se proporciona un linfocito T para su uso como medicamento; en donde el linfocito T es capaz de matar una célula que expresa un polipéptido descrito anteriormente de acuerdo con la presente invención o de ayuda para matar dicha célula. Dicho linfocito T puede ser una célula T citotóxica o una célula T colaboradora.
- También se proporciona una línea celular clonal para su uso como medicamento que comprende una pluralidad de linfocitos T como se ha descrito anteriormente. También se proporciona una mezcla de linfocitos T para uso como medicamento que comprende una célula T colaboradora o una línea celular clonal de dichas células y una célula T citotóxica o una línea celular clonal de dichas células.
- También se describe un método para generar linfocitos T capaces de reconocer y destruir células tumorales en un mamífero, que comprende tomar una muestra de linfocitos T de un mamífero y cultivar la muestra de linfocitos T en presencia de al menos un polipéptido descrito anteriormente en una cantidad suficiente para generar linfocitos T específicos de proteína de injerto y de hTERT y/o linfocitos T específicos de proteína de injerto σ de hTERT.
- También se proporciona un linfocito B que puede ser útil para generar anticuerpos de acuerdo con la presente invención. También se incluye los hibridomas que son capaces de generar anticuerpos de acuerdo con la presente invención (véase por ejemplo Koehler y col., 1975, *Nature* **256**: 495-497; Kosbor y col., 1983, *Immunol. Today* **4**: 72; Cote y col., 1983, *PNAS USA* **80**: 2026-2030; Cole y col., 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc., Nueva York, páginas 77-96).
- De acuerdo con la presente invención, se proporciona además el uso de un polipéptido como el descrito anteriormente, de un ácido nucleico como el descrito anteriormente, de un vector o célula como los descritos anteriormente, de un linfocito T como el descrito anteriormente, de una línea celular como la descrita anteriormente, o de una mezcla de linfocitos T como la descrita anteriormente, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer. El cáncer puede ser un cáncer de mamífero. En particular, el cáncer puede ser un cáncer humano. Por ejemplo, el cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma maligno, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer cervical o un carcinoma del tracto biliar.
- Dicho medicamento puede ser una vacuna.
- Los polipéptidos descritos en la presente memoria son particularmente adecuados para su uso en una vacuna capaz de estimular de forma segura una inmunidad de células T CD4+ ó CD8+. Como los polipéptidos se pueden producir sintéticamente, los medicamentos que incluyen los polipéptidos no incluyen genes cancerígenos transformantes u otros sitios o materiales que pudieran producir efectos perniciosos. Los polipéptidos pueden estar dirigidos para la respuesta de un tipo particular de células T sin los efectos secundarios de otras respuestas no deseadas.
- Se describe además una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como el descrito anteriormente, un ácido nucleico como el descrito anteriormente, un vector o célula como los descritos anteriormente, un agente de unión como el descrito anteriormente, un linfocito T como el descrito anteriormente, una línea celular como la descrita anteriormente, o una mezcla de linfocitos T como la descrita anteriormente.
- Dicha composición farmacéutica puede comprender un polipéptido capaz de inducir una respuesta de células T dirigida contra un polipéptido producido por un oncogén o contra una proteína supresora tumoral mutante, o un ácido nucleico que codifique dicho polipéptido, o un agente de unión que se una a dicho polipéptido, o una célula T que sea capaz de matar a una célula que expresa dicho polipéptido o de ayudar en la muerte de dicha célula. Los ejemplos de dichos oncogenes o proteínas supresoras tumorales mutantes incluyen p21-*ras*, Rb, p53, abl, gip, gsp, ret ó rtk. El objetivo del oncogén pueden ser los polipéptidos p21-*ras* descritos en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/NO92/00032 (con N° de Publicación WO 92/14756).
- También se describe una preparación combinada que comprende un componente de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente para un uso simultáneo, separado o secuencial en una terapia contra el cáncer.
- También se describe una composición farmacéutica o una preparación combinada como la descrita anteriormente que además comprende un vehículo, diluyente, aditivo, estabilizante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables; incluyendo además dicha composición o preparación combinada de forma opcional uno o más de: una citocina o factor de crecimiento (por ejemplo IL-2, IL-12 y/o GM-CSF) y otro polipéptido que surja de una mutación de estructura (por ejemplo, una mutación de estructura en el gen BAX o hTGF β -R11).
- El efecto estimulador sobre las células T CD4+ y CD8+ de un modo específico por acción de los polipéptidos

resultado de mutaciones de estructura en los genes BAX y hTGF β -RII se describe en el documento WO 99/58552 (ver más arriba).

La composición farmacéutica o la preparación combinada descrita anteriormente puede ser una vacuna.

5 La composición farmacéutica o la preparación combinada descritas anteriormente pueden comprender o pueden ser capaces de producir moléculas antisentido.

También se describe un método para la preparación de una composición farmacéutica como la descrita anteriormente, que comprende las etapas de combinar los componentes descritos anteriormente con un vehículo, diluyente, aditivo, estabilizante y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica puede comprender cualquiera de las siguientes mezclas:

- 10 a) una mezcla de al menos un polipéptido descrito anteriormente junto con otro polipéptido que tenga una secuencia diferente;
- b) una mezcla de al menos un polipéptido descrito anteriormente junto con otro polipéptido que tenga una secuencia solapada, de tal modo que los polipéptidos sean adecuados para ajustarse a diferentes alelos de MHC o HLA;
- 15 c) una mezcla de ambas mezclas a) y b);
- d) una mezcla de varias mezclas a);
- e) una mezcla de varias mezclas b); o
- f) una mezcla de varias mezclas a) y varias mezclas b).

20 Los polipéptidos de la mezcla pueden estar unidos covalentemente unos con otros para formar polipéptidos de mayor tamaño o incluso polipéptidos cíclicos. Los propios polipéptidos pueden estar en forma lineal o cíclica.

También se describe un composición de diagnóstico que comprende un polipéptido como el descrito anteriormente, un ácido nucleico como el descrito anteriormente, un vector o célula como los descritos anteriormente, un agente de unión como el descrito anteriormente, un linfocito T como el descrito anteriormente, una línea celular como la descrita anteriormente, o una mezcla de linfocitos T como la descrita anteriormente.

25 También se describe un kit diagnóstico como el descrito anteriormente.

También se facilita un método para el tratamiento o la profilaxis de un cáncer de un organismo humano o animal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica descrita anteriormente a un paciente o animal que lo necesite. La invención incluye un método para el tratamiento o la profilaxis de un paciente o animal que padece un cáncer, comprendiendo el método la administración a dicho

30 paciente o animal de una composición farmacéutica descrita anteriormente en una cantidad suficiente para estimular una respuesta de células T contra dicho cáncer. El método de tratamiento también puede incluir la estimulación *in vivo* o *ex vivo* con una composición farmacéutica descrita anteriormente. La terapia *ex vivo* puede incluir el aislamiento de células dendríticas u otras células presentadoras de antígeno adecuadas procedentes de un paciente o un animal, cargar dichas células con al menos un polipéptido o ácido nucleico descritos anteriormente, e infundir

35 dichas células cargadas de vuelta al paciente o al animal. Los polipéptidos o ácidos nucleicos descritos anteriormente también pueden usarse en un método de vacunación de un paciente con el objetivo de obtener resistencia frente al cáncer. A veces los oncogenes están asociados a virus. La presente invención también es adecuada para el tratamiento de determinados trastornos víricos.

40 Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en una cantidad en el intervalo de 1 microgramo (1 μ g) a 1 gramo (1 g) a un paciente humano o individuo promedio que vaya a ser vacunado. Se prefiere usar una dosis menor, en el intervalo de 1 microgramo (1 μ g) a 1 miligramo (1 mg) para cada administración.

Las dosis exactas, es decir las dosis farmacéuticamente aceptables, y el régimen de administración de las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención pueden ser fácilmente determinadas por el especialista en la técnica, por ejemplo usando ensayos de dosis-respuesta.

45 La administración puede tener lugar una vez o varias veces según sea adecuado para establecer y/o mantener la inmunidad de células T deseada. Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse, simultáneamente o por separado, junto a compuestos tales como citocinas y/o factores de crecimiento, es decir, interleucina-2 (IL-2), interleucina-12 (IL-12), factor estimulador de colonia de macrófagos de granulocito (GM-CSF) u otros similares con el objetivo de fortalecer la respuesta inmune como es sabido en la técnica. Los polipéptidos

50 pueden usarse en una vacuna o en una composición terapéutica tanto solos como en combinación con otros materiales. Por ejemplo, el polipéptido o polipéptidos pueden suministrarse en la forma de un conjugado de polipéptido el cual se sepa que induce una respuesta de células T citotóxicas de alta afinidad (Deres, K. y col., 1989, Nature 342: 561-564).

55 Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un individuo o animal en la forma de vacunas de ADN. El ADN que codifica el(los) polipéptido(s) puede estar en la forma de ADN plásmido clonado u

oligonucleótido sintético. El ADN se puede administrar junto con citocinas, tales como la IL-2, y/u otras moléculas co-estimuladoras. Las citocinas y/o las moléculas co-estimuladoras pueden administrarse en la forma de plásmido o de ADN de oligonucleótido.

5 Se ha demostrado que la respuesta a una vacuna de ADN se incrementa en presencia de secuencias de ADN inmunoestimuladoras (ISS). Estas pueden adoptar la forma de estructuras hexaméricas que contienen CpG metilado, según la fórmula: 5'-purina-purina-CG-pirimidina-pirimidina-3'. Por tanto, las vacunas de ADN de acuerdo con la presente invención pueden incorporar estas u otras ISS, en el ADN que codifica la proteína de injerto y de hTERT y/o la proteína de injerto σ de hTERT, en el ADN que codifica la citocina u otras moléculas co-estimuladoras, o en ambos. En Tighe y col. (1998, *Immunology Today*, 19(2): 89-97) se proporciona una revisión de las ventajas de la vacunación de ADN.

10 La secuencia de polipéptido mostrada en la Figura 4 representa la descripción de la Figura 5C de Kilian y col. (1997, ver más arriba) de 46 residuos de aminoácido del extremo C-terminal de la variante de división de injerto y de hTERT de aproximadamente 1100 residuos de aminoácidos, que incluye 44 aminoácidos de la SEC ID N°: 1. La secuencia proporcionada por Kilian y col. (1997, ver más arriba) muestra el "extremo C alternativo" de la proteína variante de división de injerto y de hTERT. (Kilian y col., 1997, ver más arriba, indican que la correspondiente secuencia de ADN se proporciona con el número de acceso del GenBank AF015950). Kilian y col. (1997, ver más arriba) no describe como una entidad separada al polipéptido de acuerdo con las SEC ID N°: 1, 2 ó 5 en el extremo C-terminal de la proteína variante de división de injerto y de hTERT, y no describen o sugieren un uso medicinal del polipéptido de acuerdo con la SEC ID N°: 1, 2 ó 5.

15 Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden ser producidos mediante procesos convencionales, por ejemplo, mediante los diversos métodos de síntesis de polipéptidos conocidos en la técnica. De forma alternativa, pueden ser fragmentos de una proteína de injerto y de hTERT y/o una proteína de injerto σ de hTERT producida mediante ruptura, por ejemplo, usando bromuro de cianógeno, y posterior purificación. También se puede usar la ruptura enzimática. La proteína de injerto y de hTERT y la proteína de injerto σ de hTERT, o los péptidos, también pueden encontrarse en la forma de proteínas o polipéptidos expresados recombinantes.

20 La secuencia de ácido nucleico del extremo 3' de la variante de división de injerto y de hTERT de aproximadamente 3100 pb, parte de la cual codifica el extremo C-terminal de la correspondiente proteína que incluye la SEC ID N°: 1, se proporciona en la Figura 4 de Kilian y col. (1997, ver más arriba). La secuencia de ácido nucleico en las fronteras exón-intrón de las variantes de división de hTERT INS1 (equivalente a la variante de división de injerto σ) e INS3 (equivalente a la variante de división de injerto γ), tal como se describen en la Figura 2B de Wick y col. (1999, ver más arriba), se muestran en la Figura 5. Los ácidos nucleicos mostrados en la Figura 5, tal como se describen en la Figura 2B de Wick y col. (1999, ver más arriba), incluyen nucleótidos que codifican residuos de aminoácido presentes en la SEC ID N°: 1-6 y 11. Wick y col. (1999, ver más arriba) no hacen una referencia específica a la existencia de los ácidos nucleicos mostrados como entidades distintas o a su uso médico. Wick y col., 1999, ver más arriba, proporcionan una referencia a la secuencia de nucleótidos completa de su gen de hTERT en los números de acceso del GenBank AF128893 y AF128894.

25 Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse mediante síntesis de oligonucleótidos. Esto puede realizarse mediante cualquiera de los diversos métodos disponibles en la técnica. Una proteína de telomerasa que codifica ácido nucleico puede clonarse a partir de una biblioteca genómica o de ADNc, usando un escrutinio de biblioteca convencional. La sonda puede corresponder a una porción de cualquier secuencia de un gen de injerto y de hTERT o de injerto σ de hTERT conocido. Alternativamente, el ácido nucleico puede obtenerse usando Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). El ácido nucleico es preferiblemente ADN, y puede clonarse de forma adecuada en un vector. Se pueden generar sub-clones usando enzimas de restricción adecuadas. El ADN clonado o sub-clonado puede propagarse en un hospedante adecuado, por ejemplo un hospedante bacteriano. Alternativamente, el hospedante puede ser un organismo eucariótico, tal como una levadura o un baculovirus. Las proteínas o polipéptidos de injerto y de hTERT o de injerto σ de hTERT pueden producirse mediante la expresión en un hospedante adecuado. En este caso, el ADN se clona en un vector de expresión. Se dispone de una variedad de kits de expresión comerciales. Para estos propósitos se pueden usar los métodos descritos en Sambrook, J. y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

También se describe el vector o célula como se ha descrito anteriormente, opcionalmente en forma aislada.

Además se describe el agente de unión como se ha descrito anteriormente, opcionalmente en forma aislada.

Adicionalmente se describe el linfocito T como se ha descrito anteriormente, opcionalmente en forma aislada.

También se describe la línea celular clonal como se ha descrito anteriormente, opcionalmente en forma aislada.

30 Además se describe la mezcla de linfocitos T como se ha descrito anteriormente.

También se describe un dispositivo para lectura de datos mecánica (por ejemplo un disco) que comprende la

secuencia de un polipéptido o de un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente.

5 Adicionalmente se describe un método que comprende el uso de un polipéptido o de una molécula de ácido nucleico como los descritos en la presente memoria para llevar a cabo estudios de identidad de secuencia, estudios de homología de secuencia o estudios de hibridación. Dicho método puede incluir el uso de dicha secuencia para predecir la estructura y/o la función (por ejemplo, para predecir la actividad anticancerígena).

También se proporciona el uso de este método en un procedimiento de desarrollo o de escrutinio de fármacos. Además se proporciona un fármaco identificado o seleccionado mediante este procedimiento.

10 También se describe un ordenador o una base de datos que presente o almacene una secuencia de un polipéptido o molécula de ácido nucleico como los descritos en la presente memoria, o que esté preparado para llevar a cabo un método como el descrito anteriormente.

Los términos "residuo de aminoácido" y "aminoácido" se definen de forma general para incluir aminoácidos modificados e inusuales, según se define en WIPO Standard ST.25, y se incorpora aquí a modo de referencia.

El término tratamiento o terapia usado en la presente memoria incluye tratamiento o terapia profilácticos cuando sea aplicable.

15 La invención será más evidente a partir de la siguiente descripción, con referencia a las figuras acompañantes que muestran, solo a modo de ejemplo, varios polipéptidos y su uso de acuerdo con la presente invención.

De las figuras:

La Figura 1 es un dibujo esquemático del ARNm de *hTERT* de longitud completa, y de variantes de división, encontrado en líneas de células cancerosas;

20 La Figura 2 muestra un alineamiento de proteína entre una porción de la proteína de *hTERT* y las proteínas resultantes de la traducción de variantes de división;

La Figura 3 muestra los extremos carboxilo de las proteínas variantes de división de injerto γ e injerto σ de *hTERT*;

La Figura 4 muestra secuencias de la técnica anterior relacionadas con la variante de división de injerto γ de *hTERT* descrita en la Figura 5C de Kilian y col. (1997, ver más arriba);

25 La Figura 5 muestra secuencias de la técnica anterior relacionadas con las variantes de división de injerto γ y de injerto σ de *hTERT* descritas en la Figura 2B de Wick y col. (1999, ver más arriba);

La Figura 6 muestra los resultados del análisis de RT-PCR de las regiones que comprenden las variantes de división de injerto γ (A) y de injerto σ (B) de *hTERT*;

30 La Figura 7 muestra las respuestas de células T inducidas en muestras de sangre humana por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11;

La Figura 8 muestra la proliferación de clones de células T inducida por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11; y

La Figura 9 muestra la proliferación de otros clones de células T inducida por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11.

35 En la Figura 1, la posición de los intrones presentes en el pre-ARNm de *hTERT* se indica mediante la letra "i" seguida de un número apropiado. Las variantes de inserción y de eliminación se muestran como cajas cuadradas; el relleno sombreado representa secuencias que codifican secuencia de proteína que no está presente en la proteína de *hTERT* de longitud completa. La posición y la orientación de los cebadores de oligonucleótidos usados para analizar las diferentes variantes de división se indican con flechas.

40 En la Figura 2, se muestra la numeración de aminoácidos encima de la secuencia. Los aminoácidos se representan mediante su abreviatura de una letra estándar conocida en la técnica.

45 En la Figura 3, la SEC ID N°: 1 refleja la cola truncada de la proteína de injerto γ de *hTERT* y la SEC ID N°: 2 refleja el mismo polipéptido con una extensión en el extremo amino con los nueve aminoácidos que se encuentran normalmente en dichas posiciones en el producto de expresión de injerto γ de *hTERT* natural (subrayado). La SEC ID N°: 3 refleja la cola truncada de la proteína de injerto σ de *hTERT*. La SEC ID N°: 4 refleja la SEC ID N°: 3 con una extensión en el extremo amino con los nueve aminoácidos que normalmente se dan en dichas posiciones en el producto de expresión de injerto σ de *hTERT* natural (subrayado).

En la Figura 4, las uniones exón/intrón de la variante de división de injerto 3 (equivalente a la variante de división de injerto γ de *hTERT*) se muestra tal como se proporciona en la Figura 5C de Kilian y col. (1997, ver más arriba). Kilian

y col. (1997, ver más arriba) proporcionan la siguiente información: la secuencia de ácido nucleico se muestra por encima de una secuencia de traducción de proteína, con el intrón no dividido putativo mostrado en negrita; las uniones exón/intrón putativas están marcadas con |; la correspondencia de la numeración de secuencia de ácido nucleico es como se indica a continuación: el nucleótido 1 corresponde al nucleótido 139 de la secuencia del número de acceso AF015950 del GenBank; y los aminoácidos correspondientes al sitio de unión c-Abl/SH3 putativo están subrayados. La secuencia de aminoácidos mostrada por Kilian y col. (1997; ver más arriba) representa el extremo C-terminal de una proteína variante de división de injerto y de hTERT de aproximadamente 1100 residuos de aminoácido.

En la Figura 5, se representan los nucleótidos de las fronteras exón-intrón de las variantes de división de hTERT INS1 (equivalente a la variante de división de injerto σ) e INS3 (equivalente a la variante de división de injerto γ) como se describen en la Figura 2B de Wick y col. (1999, ver más arriba). Las secuencias intrónicas y exónicas se muestran en letras minúsculas y mayúsculas, respectivamente. Wick y col. (1999, ver más arriba) indican que la secuencia de nucleótidos de su gen hTERT ha sido depositada en el GenBank con los números de acceso AF128893 y AF128894.

Se ha establecido que las variantes de división de injerto γ y de injerto σ de hTERT son expresadas en líneas de células cancerosas y en tumores, pero son indetectables o presentan unos niveles muy bajos en células normales. Por lo tanto, la presente solicitud describe candidatos de vacuna contra el cáncer generales con una especificidad mejorada con respecto a las vacunas basadas en la variante funcional de la proteína telomerasa (hTERT). Los injertos γ y σ dan como resultado la formación de un codón de detención temprana y la expresión de una proteína que está truncada en el extremo carboxilo. Las proteínas de injerto γ y σ de hTERT truncadas no tienen actividad de telomerasa por sí mismas. En el caso de un injerto γ , la cola truncada de la proteína es una secuencia de 44 aminoácidos (SEC ID N°: 1). Un injerto σ da como resultado una proteína en la que la cola truncada es una secuencia de 20 aminoácidos (SEC ID N°: 3). Se expresan predominantemente en líneas de células cancerosas pero son indetectables, o presentan niveles muy bajos, en células normales, y por tanto son dianas para una inmunoterapia específica. Según la presente invención, los polipéptidos correspondientes al extremo carboxilo (cola truncada) de proteínas expresadas por variantes de división de injerto γ y/o de injerto σ de hTERT son útiles como agentes o vacunas anticancerígenos con la función de activar el brazo celular del sistema inmune (células T) en humanos contra células cancerosas. En una realización preferida de la invención, el polipéptido comprende la secuencia de acuerdo con la SEC ID N°: 5. En otra realización preferida de la invención, el polipéptido comprende la secuencia de acuerdo con la SEC ID N°: 6.

La SEC ID N°: 11, a la cual se hace referencia en la presente memoria, se incluye meramente con fines de ejemplo y como tal no forma parte de la presente invención.

Procedimiento experimental

Los experimentos descritos en la presente memoria describen la caracterización de variantes de división de hTERT en varias líneas de células cancerosas en comparación con células normales. Se detalla la síntesis de polipéptidos de acuerdo con la presente invención, y los experimentos para evaluar la eficacia de los polipéptidos para uso en terapia contra el cáncer. Se describe un experimento que muestra la inducción y proliferación de células T humanas por parte del péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID N°: 11.

Análisis RT-PCR de las variantes de división de injerto γ y de injerto σ de hTERT

Análisis de ARN:

Se aisló ARNm poly(A)⁺ procedente de células lisadas completamente directamente a partir de los lisatos sin purificar usando partículas magnéticas oligo(dT) (Dynal AS; Jakobsen, K.S. y col., 1990, Nucleic Acids Res. **18**: 3669). Las fracciones de ARNm citosólico se prepararon incubando células en IGEPAL al 1% (Sigma) a 0°C durante un minuto, seguido de centrifugación [10.000 g; 1 min; 4°C] para eliminar los núcleos. A continuación se aisló el ARNm Poly(A)⁺ a partir del sobrenadante usando particular oligo(dT) como se ha descrito anteriormente.

Síntesis de ADNc y PCR:

La síntesis de ADNc de primera cadena se llevó a cabo empleando procedimientos estándares usando transcriptasa inversa M-MLV RNasaH⁺ (Promega Corp.), y las reacciones PCR se llevaron a cabo usando ADN polimerasa HotStar Taq (Qiagen) y se ejecutaron para 35 ciclos sobre un ciclador térmico PTC-200 (MJ Research). Para obtener productos detectables a partir de células PBM y CD34+, el 10% de la reacción se usó como plantilla en una segunda reacción PCR y se amplificó mediante otros 15 ciclos adicionales.

Para el análisis de la variante de división de injerto γ y la variante de cebador de cadena-más se usó el cebador de cadena-más hTERT-p3195 (5-GCC TCC CTC TGC TAC TCC ATC CT – SEC ID N°: 7) y el cebador de cadena-menos hTERT-m3652 (5-CGT CTA GAG CCG GAC ACT CAG CCT TCA – SEC ID N°: 8). Aplicados al ADNc de hTERT de longitud completa y a la variante de injerto γ , estos cebadores producen fragmentos de 465 y 624 nucleótidos, respectivamente. El análisis de la variante de injerto σ se llevó a cabo usando los cebadores hTERT-P6

(5-GCC AAG TTC CTG CAC TGG CTG A – SEC ID N°: 9) hTERT-m2044 (5-GCT CTA GAA CAG TGC CTT CAC CCT CG – SEC ID N°: 10). El producto de amplificación resultante del uso de dichos cebadores con ADNc de hTERT de longitud completa y con la variante de injerto σ comprende 369 y 407 nucleótidos, respectivamente. Para verificar que estos productos de PCR representan variantes de división genuinas, los fragmentos fueron aislados del gel y analizados mediante secuenciación directa usando un secuenciador automático AB1 prism 310 (PE Corp.).

Resultados:

La actividad de telomerasa está sujeta a una regulación compleja a nivel post-transcripcional, y los métodos usados para detectar la presencia o la ausencia de proteínas de telomerasa deberían incluir mediciones directas de la propia proteína, o alternativamente de las variantes de ARNm. Además, la abundancia de las diferentes variantes de división de hTERT que se dan en las células no se correlaciona necesariamente con los niveles observados en la fracción citosólica de las mismas células (véase la Figura 6). Dichas desviaciones pueden explicarse a través de las diferencias en la eficacia con la que las variantes de ARNm son transportadas desde el núcleo hasta el compartimento citosólico, y/o mediante la estabilidad diferencial de las variantes de división específicas del citosol. Es bien conocido en la técnica que dichos mecanismos son parte del concepto de la regulación génica. Sin embargo, los estudios llevados a cabo para explicar la regulación de hTERT, que incluyen los citados anteriormente, han usado ARN o ARNm total aislado de células lisadas completamente para su análisis. Los kits y reactivos requeridos para realizar este tipo de aislamiento de ARN se encuentran ampliamente disponibles a nivel comercial. Para obtener una imagen correcta de la expresión génica, los estudios sobre la abundancia de ARNm deberían incluir el análisis de ARNm específico al compartimento citosólico.

La Figura 6 muestra los resultados del análisis de RT-PCR de las regiones que comprenden las variantes de injerto γ (A) y de injerto σ (B) de hTERT. HL60, K562 y Jurkat denotan las líneas de células cancerosas analizadas. HL60 es una línea de células de leucemia promielocítica (Soloski, J.A. y col., 1993, Blood 82: 625-632), K562 una línea de células de leucemia eritroidea (Lozzio, C.B. y col., 1975, Blood 45: 321-324), mientras que Jurkat deriva de células de leucemia de linfocito T (Gillis, S. y col., 1980, J. Exp. Med. 152: 1709-1719). Las líneas de células cancerosas HK60, K562 y Jurkat se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, en ATCC, Oslo). PBM1, PBM2, PBM3 y PBM4 representan poblaciones de células sanguíneas mononucleares periféricas (PBM) aisladas de cuatro donantes sanos diferentes. CD34 denota células madre positivas CD34 aisladas de un donante sano, y CC1/CC2 denota biopsias de cáncer de colon procedentes de dos pacientes con cáncer del Norwegian Radium Hospital, Oslo, siendo CC2a y CC2b dos muestras de tejido diseccionadas del mismo tumor. Las reacciones RT-PCR llevadas a cabo con ARNm aislado mediante lisis completa de células y con ARNm aislado a partir de fracciones citosólicas están marcadas con las letras "T" y "C", respectivamente. "M" indica una banda con marcador de peso molecular. La posición de los fragmentos de PCR que representan las variantes de división de injerto γ y σ y los respectivos productos (+) de hTERT de longitud completa se indica en el lado derecho de los paneles.

El análisis de RT-PCR mostró que ambas variantes de división de injerto γ y σ eran fácilmente detectables en todas las líneas de células cancerosas y en una de las muestras de tumor analizadas (CC2b), y apareciendo la variante de injerto σ como la más abundante en las fracciones citosólicas. Por el contrario, no fuimos capaces de detectar dichas variantes en poblaciones de ARNm citosólico aislado a partir de células PBM a pesar de la intensiva amplificación de PCR realizada sobre estas muestras. La identidad del fragmento débil de 395 pb producido con los cebadores de injerto σ sobre células PBM y positivas CD34 de momento es desconocida.

Síntesis y análisis de polipéptidos para aplicaciones relativas al cáncer

Síntesis de polipéptidos:

Los polipéptidos fueron sintetizados usando síntesis de péptidos en fase sólido con flujo continuo. Se usaron N-a-Fmoc-aminoácidos con la protección de cadena lateral apropiada. Los Fmoc-aminoácidos fueron activados para el acoplamiento como ésteres de pentafluorofenilo o usando TBTU o activación de carbodiimida de diisopropilo antes del acoplamiento. Se usó piperidina al 20% en DMF para la eliminación selectiva de Fmoc después de cada acoplamiento. La separación de la resina y la eliminación final de la protección de cadena lateral se llevó a cabo mediante TFA al 95% que contenía los agotadores apropiados. Los polipéptidos fueron purificados y analizados mediante HPLC de fase inversa. La identidad de los polipéptidos se confirmó usando espectroscopía de masas de electro-pulverización.

Evaluación de polipéptidos y terapia contra el cáncer:

Para que una vacuna contra el cáncer de acuerdo con la presente invención, y los métodos para una terapia contra un cáncer específico basados en inmunidad de células T, sean efectivos, se deben cumplir dos condiciones:

(a) el polipéptido tenga al menos 8 aminoácidos de longitud y sea un fragmento de la proteína de injerto γ de hTERT o de la proteína de injerto σ de hTERT, y

(b) el polipéptido sea capaz de inducir, bien en su longitud completa o tras el procesamiento de una célula presentadora de antígeno, respuestas de células T.

Se pueden usar los siguientes métodos experimentales para determinar si estas dos condiciones se cumplen para un polipéptido particular. En primer lugar, debería determinarse si el polipéptido particular da lugar a la estimulación de respuestas inmunes de células T *in vitro*. También será necesario establecer si los polipéptidos sintéticos corresponden, o son capaces tras un procesamiento de dar lugar, a fragmentos de polipéptido correspondientes a los fragmentos de polipéptido que se dan en las células cancerosas que albergan la proteína de injerto γ de hTERT y/o la proteína de injerto σ de hTERT, o células presentadoras de antígeno que han procesado la proteína de injerto γ de hTERT y/o la proteína de injerto σ de hTERT naturales. También se puede determinar la especificidad de células T inducidas *in vivo* mediante la vacunación con polipéptido de injerto γ de hTERT y/o de injerto σ de hTERT.

Análisis de respuesta de células T in vitro:

Es necesario determinar si las líneas de células tumorales que expresan injerto γ de hTERT y/o injerto σ de hTERT pueden ser matadas por clones de células T obtenidos a partir de sangre periférica procedente de pacientes de carcinoma después de una vacunación con polipéptido de injerto γ de hTERT y/o injerto σ de hTERT. Los clones de células T se obtienen después de clonar blastos de células T presentes en células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) procedentes de un paciente de carcinoma después de una vacunación con polipéptido injerto γ de hTERT y/o injerto σ de hTERT. El protocolo de vacunación con polipéptido incluye varias inyecciones *in vivo* de polipéptidos intracutáneamente con GM-CSF u otro adyuvante usado habitualmente. La clonación de células T se lleva a cabo llevando a placa blastos de células T respondientes a una concentración de 5 blastos por pocillo sobre placas Terasaki. Cada pocillo contiene 2×10^4 PBMC autólogas irradiadas (30 Gy) como células de sustrato. Las células se propagan con el polipéptido de injerto γ de hTERT y/o injerto σ de hTERT candidato a una concentración de 25 μ M y 5 U/mL de interleucina-2 recombinante (rIL-2) (Amersham, Aylesbury, R.U.) en un volumen total de 20 mL. Tras 9 días los clones de células T son transferidos a placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA) con 1 mg/mL de fitohemaglutinina (PHA, Wellcome, Dartford, R.U.), 5 U/mL de rIL-2 y PBMC alogénicas irradiadas (30 Gy) (2×10^5) por pocillo como células sustrato. Los clones en crecimiento son expandidos adicionalmente en placas de 24 pocillos con PHA/rIL-2 y 1×10^6 PBMC alogénicas irradiadas como células sustrato, y son escrutados en función de la especificidad de polipéptido después de 4 a 7 días.

Los clones de células T se seleccionan para una caracterización adicional. Se determina el fenotipo de superficie celular del clon de célula T para establecer si el clon de célula T es CD4+ o CD8+. El clon de célula T se incuba con dianas autólogas de células tumorales a diferentes relaciones efector diana para determinar si se produce lisis de las células tumorales. La lisis indica que la célula T tiene una reactividad dirigida contra un antígeno derivado de tumor, por ejemplo, proteínas de injerto γ de hTERT y/o proteínas de injerto σ de hTERT.

Correlación entre polipéptidos y fragmentos de injerto de hTERT in vivo:

A fin de verificar que el antígeno reconocido está asociado a proteína de injerto γ de hTERT o a proteína de injerto σ de hTERT, y para identificar la molécula HLA de clase I o de clase II que presenta el polipéptido putativo de injerto γ de hTERT o de injerto σ de hTERT al clon de célula T, se usan como células diana en los ensayos de citotoxicidad diferentes líneas de células tumorales que expresan injerto γ de hTERT o injerto σ de hTERT que tienen una o más moléculas HLA de clase I o de clase II en común con las del paciente. Las células diana son marcadas durante una noche con ^{51}Cr o ^3H -timidina ($9,25 \times 10^4$ Bq/mL), se lavan una vez y se llevan a placa con una concentración de 5000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se añaden las células T a diferentes relaciones efector diana y las placas son incubadas durante 4 horas a 37°C y a continuación recolectadas antes de ser contabilizadas en un contador de centelleo de líquidos (Packard Topcount). Por ejemplo, como células diana se puede usar la línea de células de carcinoma de vejiga T24 (12Val⁺, HLA-A1⁺, B35⁺), la línea de células de melanoma FMEX (12Val⁺, HLA-A2⁺, B35⁺) y la línea de células de carcinoma de colon SW 480 (12Val⁺, HLA-A2⁺, B8⁺) o cualquier otra línea de células tumorales positivas en telomerasa. Se puede usar como control una línea celular adecuada que no expresa proteínas de injerto γ de hTERT y/o de injerto σ de hTERT, que no debería ser lisada. La lisis de una línea celular particular indica que el clon de células T que está siendo evaluado reconoce un epítipo de injerto γ de hTERT y/o de injerto σ de hTERT procesado endógenamente en el contexto de HLA de clase I o del subtipo de clase II expresado por dicha línea celular.

Caracterización de clones de células T:

La restricción de HLA de clase I o de clase II de un clon de célula T puede determinarse mediante experimentos de bloqueo. Se pueden usar los anticuerpos monoclonales contra antígenos de HLA de clase I, por ejemplo el anticuerpo monoclonal de HLA de clase I panreactivo W6/32, o contra antígenos de clase II, por ejemplo, monoclonales dirigidos contra antígenos de HLA de clase II DR, DQ y DP (B8/11, SPV-L3 y B7/21). La actividad del clon de célula T contra la línea de células tumorales autólogas se evalúa usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas HLA de clase I y de clase II a una concentración final de 10 μ g/mL. Los ensayos se preparan como se ha descrito anteriormente por triplicado en placas de 96 pocillos y las células diana son preincubadas durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de las células T.

La fina especificidad de un clon de célula T puede determinarse usando experimentos de pulsos de polipéptido. Para identificar el polipéptido de injerto γ de hTERT y/o de injerto σ de hTERT que está siendo reconocido realmente por un clon de célula T, se ensaya un panel de polipéptidos noaméricos. Se llevan a placa fibroblastos autólogos,

5 eluidos en condiciones ácidas suaves y marcados con ^{51}Cr o ^3H -timidina, a una concentración de 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se someten a pulsos con los polipéptidos a una concentración de $1\ \mu\text{M}$ junto con b2-microglobulina ($2,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) en una incubadora con un 5% de CO_2 a 37°C antes de la adición de las células T. Los ensayos se preparan por triplicado en placas de 96 pocillos y se incuban durante 4 horas con una relación de efector a diana de 5 a 1. Los controles pueden incluir clon de célula T cultivado solo, con APC en ausencia de polipéptidos o con un polipéptido MART-1/Melan-A asociado a melanoma irrelevante.

10 También se puede usar un protocolo alternativo para determinar la especificidad fina de un clon de célula T. En este protocolo alternativo, se usa la línea de células T2 deficiente en TAP como células presentadoras de antígeno. Esta línea celular expresa solo cantidades pequeñas de antígeno HLA-A2, pero se pueden inducir niveles incrementados de antígenos de HLA de clase I mediante la adición de b2-microglobulina. Las células diana marcadas con ^3H son incubadas con diferentes polipéptidos de ensayo y polipéptidos de control a una concentración de $1\ \mu\text{M}$ junto con b2-microglobulina ($2,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$) durante una hora a 37°C . Tras el pulso de polipéptido, las células diana son lavadas intensivamente, se contabilizan y se llevan a placa con una concentración de 2500 células por pocillo en placas de 96 pocillos antes de la adición de las células T. Las placas son incubadas durante 4 horas a 37°C en CO_2 al 5% antes de ser recolectadas. Los controles incluyen el clon de célula T cultivado solo o con células diana en ausencia de polipéptidos. Los ensayos fueron realizados por triplicado en placas de 96 pocillos con una relación efector a diana de 20 a 1.

20 La sensibilidad de un clon de célula T respecto a un polipéptido particular identificado anteriormente también puede determinarse usando un experimento de dosis-respuesta. Se pueden usar fibroblastos sensibilizados a polipéptido como células diana. Las células diana son sometidas a pulsos con el péptido particular como se ha descrito anteriormente para la determinación de la especificidad fina, salvo porque los péptidos se añaden a concentraciones diferentes antes de la adición de las células T. Los controles incluyen células diana solas y células diana pulsadas con el péptido asociado a melanoma irrelevante Melan-A/Mart-1.

Inducción y proliferación de la respuesta de células T humanas al péptido de injerto σ de hTERT

25 En este experimento, se aislaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) procedentes de cuatro humanos sanos (donantes "14328", "14313", "23244" y "23255") y se imprimaron durante siete días con células dendríticas pulsadas con el péptido de SEC ID N°: 11 derivado del polipéptido de injerto σ de hTERT, seguido de dos ciclos que consistieron en siete días de re-estimulación con PBMC autólogas pulsadas con péptido. Las células dendríticas derivaron de monocitos procedentes de sangre periférica. Las células T procedentes del cultivo en masa resultante fueron evaluadas por triplicado con o sin células presentadoras de antígeno (APC) pulsadas con péptido antes de ser recolectadas a los 3 días. Para medir la capacidad proliferativa de los cultivos, se añadió ^3H -timidina ($3,7 \times 10^4\ \text{Bq}/\text{pocillo}$) al cultivo durante una noche antes de la recolección. Los cultivos con APC no pulsadas o sin APC sirvieron como controles. Los resultados que muestran la capacidad proliferativa de los cultivos se presentan en la Figura 7. A continuación se describen otros detalles adicionales del protocolo usado.

35 Los clones de células T se obtuvieron de los cultivos en masa resultantes procedentes de los donantes 14313 y 23255 no vacunados. Los clones fueron obtenidos a partir de blastos de células T presentes en PBMCs, tal como se ha descrito anteriormente en la sección "Análisis de respuesta de células T *in vitro*". Los resultados de la proliferación de los clones de células T con células presentadoras de antígeno pulsadas con péptido y no pulsadas con péptido se muestran en la Figura 8 (donante 14313) y en la Figura 9 (donante 23255).

40 Los resultados de las Figuras 7, 8 y 9 se dan como conteos medios por minuto (cpm) de medidas por triplicado. Los datos demuestran que la sangre de humano contiene células T en circulación específicas para un péptido (SEC ID N°: 11) derivado del péptido derivado del polipéptido de injerto σ de hTERT, y además que dichas células T pueden expandirse *in vitro* con una estimulación con el péptido relevante.

45 Por tanto, los experimentos de las Figuras 7, 8 y 9 demuestran que el polipéptido de injerto σ de hTERT es inmunogénico en el hombre. La estimulación *in vitro* (o *in vivo*) puede dar lugar a un aumento de las respuestas de células T específicas de proteína de injerto σ de hTERT con el potencial de reconocer el mismo antígeno cuando esté sobreexpresado por un tumor que crece en un paciente con cáncer. Este experimento en particular demuestra que en principio el péptido de la SEC ID N°: 11 podría desarrollarse como una vacuna contra el cáncer en humanos.

Protocolo para la inducción de respuesta de células T restringida a MHC de clase II

50 Día 0:

Se separaron las PBMCs de 50 mL de sangre (procedente de la capa leucocitaria). Las células fueron contabilizadas y re-suspendidas en RPMI-1640 completo/suero de conjunto 15%.

55 Los cultivos en masa fueron procesados en 1-2 pocillos sobre una placa de 24 pocillos de PBMCs a 2×10^6 células/mL en 1-1,5 mL. Se añadió $25\ \mu\text{M}$ de péptido de SEC ID N°: 11 derivado del polipéptido de injerto σ de hTERT.

Día 9-10:

5 Los cultivos en masa fueron recolectados y estimulados con PBMCs irradiadas y con péptido. Si se producía una elevada mortandad celular, los cultivos eran separados con lymphoprep, si no eran contabilizados y re-suspendidos en RPMI/suero de conjunto 15%. (Se lleva a cabo una centrifugación Lymphoprep de los cultivos en masa en tubos Falcon de 15 mL mediante 1; adición de 8 mL de suspensión celular, y 2; refuerzo con 2 mL de limphoprep. Se gira a 1500 rpm durante 30 minutos, y se lava dos veces con agua salada). Se descongeló un vial de PBMCs autólogas, se lavó, se contabilizó y re-suspendió en RPMI/FCS 15%. Las PBMCs fueron irradiadas (25 GY, 5 minutos 58 segundos). Las células fueron llevadas a placa en placas de 24 pocillos. Se estimularon $0,5-2,0 \times 10^6$ células T de los cultivos en masa con 1×10^6 células sustrato irradiadas (PBMCs) y péptido de SEC ID N°: 11 25 μ M. El volumen final fue 1 mL.

Día 12:

Se añadió IL-2 (10 U/mL). También se añadió medio si era necesario reemplazando la mitad del volumen. Los cultivos se dividieron si era necesario.

Día 17:

15 Las células T en el cultivo en masa fueron re-estimuladas como en el día 10, con PBMCs autólogas irradiadas y el péptido de SEC ID N°: 11.

Día 19:

Se añadió IL-2 (10 U/mL) a los cultivos en masa re-estimulados el día 17.

Día 24:

20 Se realizó un ensayo de proliferación para evaluar las células T en cuanto a especificidad de péptido en placas de 96 pocillos, cada condición por triplicado:

Triplicados	1-3	4-6	7-9	10-12
Controles	PBMC ¹	Tc ²	PBMC ¹ + Tc ²	PBMC ¹ + Tc ² + IL-2 ³
Muestras de ensayo	PBMC ¹ + Tc ² + Pep ⁴	PBMC ¹ +Tc ² +Pep ⁴ +IL-2 ³		

¹ 50.000 PBMCs irradiadas, ² 50.000 células T de cultivo en masa, ³ 1 U/mL, ⁴ 25 μ g/mL de péptido de SEC ID N°: 11.

En el día 2-3 del ensayo de proliferación, se añadió ³H-timidina (20 μ L) y se incubó a 37°C durante una noche antes de la recolección.

25 En una variante del protocolo (tal como se usa en el ejemplo anterior) las PBMCs fueron imprimadas, en el día 0, con células dendríticas pulsadas con SEC ID N°: 11.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Norsk Hydro ASA
 <120> Polipéptidos
 5 <130> MW J1586/07
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.0
- 10 <210> 1
 <220> 44
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
- ```

Ala Glu Glu Asn Ile Ser Val Val Thr Pro Ala Val Leu Gly Ser Gly
 1 5 10 15
Gln Pro Glu Met Glu Pro Pro Arg Arg Pro Ser Gly Val Gly Ser Phe
 20 25 30
Pro Val Ser Pro Gly Arg Gly Ala Gly Leu Gly Leu
 35 40

```
- 15 <210> 2  
 <220> 53  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2
- ```

Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Ala Glu Glu Asn Ile Ser Val
 1           5           10           15
Val Thr Pro Ala Val Leu Gly Ser Gly Gln Pro Glu Met Glu Pro Pro
          20           25           30
Arg Arg Pro Ser Gly Val Gly Ser Phe Pro Val Ser Pro Gly Arg Gly
      35           40           45
Ala Gly Leu Gly Leu
 50
    
```
- 20 <210> 3
 <220> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 25 <400> 3
- ```

Val Ala Val Leu Trp Phe Asn Phe Leu Phe Lys Gln Lys Pro Ser Val
 1 5 10 15
Ser Pro Arg Gly
 20

```
- 30 <210> 4  
 <220> 29  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

ES 2 382 821 T3

Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Val Ala Val Leu Trp Phe Asn  
 1 5 10 15

Phe Leu Phe Lys Gln Lys Pro Ser Val Ser Pro Arg Gly  
 20 25

5 <210> 5  
 <220> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

Phe Leu Phe Lys Gln Lys Pro Ser Val  
 1 5

10 <210> 6  
 <220> 18  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Arg Val Ala Val Leu Trp Phe Asn Phe Leu Phe Lys Gln Lys Pro Ser  
 1 5 10 15

Val Ser

15 <210> 7  
 <220> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

gcctccctct gctactccat cct  
 23

20 <210> 8  
 <220> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

cgtctagagc cggacactca gccttca  
 27

25 <210> 9  
 <220> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 9

gccaagttcc tgcactggct ga  
 22

35 <210> 10  
 <220> 26  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10

gctctagaac agtgccttca ccctcg  
26

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer; en donde el polipéptido: a) comprende una secuencia dada por la SEC ID N°: 1 ó 2; b) comprende 8 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 1 ó 2, con la condición de que al menos uno de dichos 8 aminoácidos contiguos proceda de la SEC ID N°: 1; o c) comprende 8 aminoácidos contiguos que tienen solo una, dos o tres sustituciones de aminoácidos respecto a los 8 aminoácidos contiguos descritos en anteriormente en b), con la condición de que al menos uno de los 8 aminoácidos contiguos presentes proceda de la SEC ID N°: 1; en donde el polipéptido es capaz de inducir una respuesta de células T.
- 10 **2.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 1; en donde el polipéptido:
- a) tiene al menos un 55% de identidad de secuencia con una molécula que comprende la secuencia de SEC ID N°: 1, determinada mediante una búsqueda con NCBI BLASTP Versión 2.1.2 con los parámetros por defecto; o
- 15 b) tiene al menos un 55% de identidad de secuencia con una molécula que comprende la secuencia de SEC ID N°: 2, determinada mediante una búsqueda con NCBI BLASTP Versión 2.1.2 con los parámetros por defecto.
- 3.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 1; en donde el polipéptido comprende una secuencia dada en la SEC ID N°: 1 ó 2 o es un fragmento de una secuencia como la mostrada en la SEC ID N°: 1.
- 20 **4.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con cualquier reivindicación precedente; en donde la respuesta de células T se genera después de la separación intracelular del polipéptido para proporcionar un fragmento que se ajusta a un sitio de unión de MHC o HLA.
- 5.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; en donde el polipéptido no necesita una separación intracelular para ajustarse al sitio de unión de MHC o HLA de clase I.
- 25 **6.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 5; en donde el polipéptido tiene una longitud de entre 8 y 10 aminoácidos.
- 30 **7.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con las reivindicación 1 a 4; en donde el polipéptido no necesita una separación intracelular para ajustarse al sitio de unión de MHC o HLA de clase II.
- 8.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con la reivindicación 7; en donde el polipéptido tiene una longitud de entre 12 y 25 aminoácidos.
- 35 **9.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con cualquier reivindicación precedente; en donde la respuesta de células T aumenta el número y/o la actividad de células T colaboradoras y/o de células T citotóxicas.
- 10.-** Un polipéptido para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer de acuerdo con cualquier reivindicación precedente; en donde el polipéptido no estimula una respuesta de células T citotóxicas sustancial en un paciente contra uno o más de los siguientes: células madre de médula ósea, células epiteliales de las criptas colónicas o linfocitos.
- 40 **11.-** Una molécula de ácido nucleico para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer; en donde la molécula de ácido nucleico: a) tiene una cadena que codifica un polipéptido como el descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; b) tiene una cadena que es complementaria con una cadena como la descrita en a) anteriormente; o c) tiene una cadena que se hibrida con una molécula como la descrita en a) o b) anteriormente en condiciones severas.
- 45 **12.-** Un vector o célula para uso como medicamento para el tratamiento de cáncer mediante la estimulación de una reacción inmune contra el cáncer que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 en forma recombinante.
- 50 **13.-** Un linfocito T para uso como medicamento; en donde el linfocito T es capaz de matar a una célula que expresa un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o de ayudar a matar dicha célula.
- 14.-** El linfocito para uso como medicamento de acuerdo con la reivindicación 13; en donde el linfocito T es una célula

T citotóxica o una célula T colaboradora.

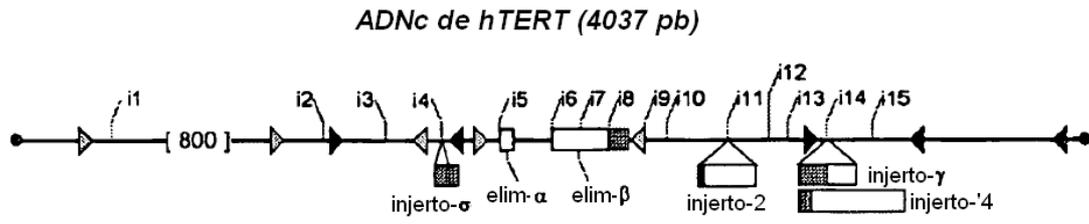
**15.**-Una línea celular clonal para uso como medicamento que comprende una pluralidad de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14.

5 **16.**-Una mezcla de linfocitos T para uso como medicamento que comprende una célula T colaboradora de acuerdo con la reivindicación 14 o una línea celular clonal de dichas células de acuerdo con la reivindicación 15 y una célula T citotóxica de acuerdo con la reivindicación 14 o una línea celular clonal de dichas células de acuerdo con la reivindicación 15.

10 **17.**-El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, el vector o célula de acuerdo con la reivindicación 12, el linfocito T de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, una línea celular de acuerdo con la reivindicación 15, o una mezcla de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el cáncer es un cáncer de mamífero.

**18.**-El polipéptido, ácido nucleico, vector o célula, linfocito T, línea celular o mezcla de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 17; en donde el cáncer es un cáncer humano.

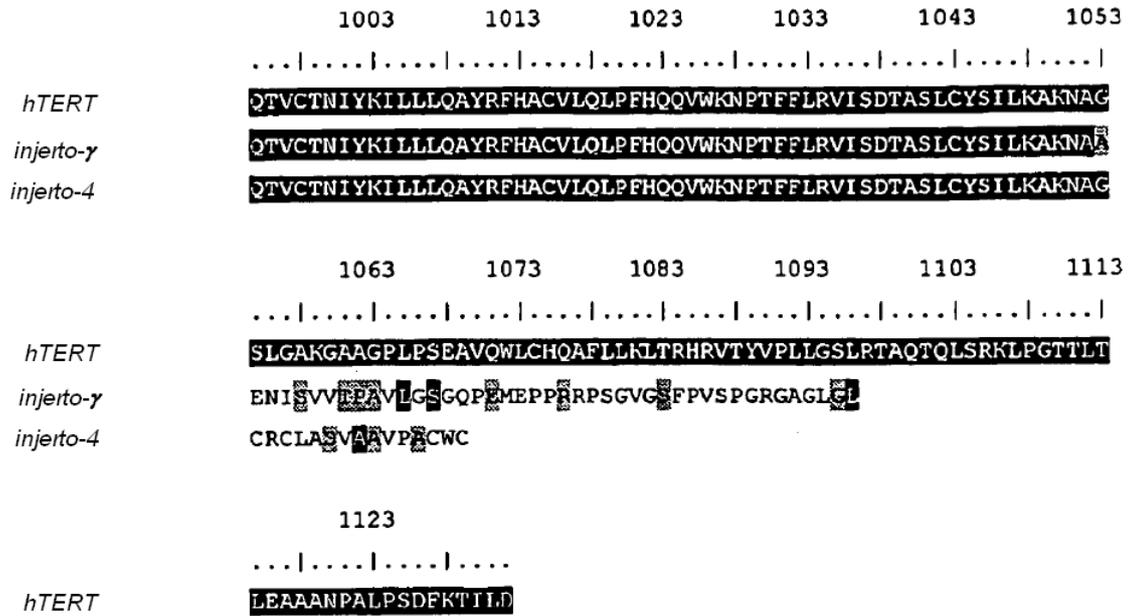
15 **19.**-El polipéptido, ácido nucleico, vector o célula, linfocito T, línea celular o mezcla de linfocitos T de acuerdo con la reivindicación 18; en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma maligno, leucemia, linfoma, cáncer de ovario, cáncer cervical o un carcinoma del tracto biliar.



**FIGURA 1**

ES 2 382 821 T3

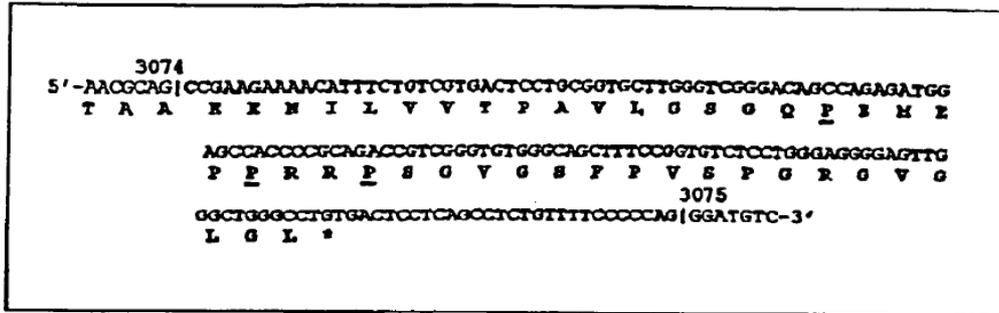
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                  | 643                                                                                                                                                                                                                                            | 653   | 663   | 673   | 683   | 693   |
|                  | .....                                                                                                                                                                                                                                          | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <i>hTERT</i>     | <b>NMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALF SVLN YERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTF</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-γ</i> | <b>NMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALF SVLN YERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTF</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-4</i> | <b>NMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALF SVLN YERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTF</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>elim-β</i>    | <b>NMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALF SVLN YERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTF</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>elim-α</i>    | <b>NMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALF SVLN YERARRPGLLGASVLGLDDI HRAWRTF</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-σ</i> | <b>NMDYVVGARTFRREKPVAVL WFNFLFKQKPSVSP <b>PC</b></b>                                                                                                                                                                                           |       |       |       |       |       |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|                  | 703                                                                                                                                                                                                                                            | 713   | 723   | 733   | 743   | 753   |
|                  | .....                                                                                                                                                                                                                                          | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <i>hTERT</i>     | <b>LRVPAQDPPEPELYFVKVDVTGAYDTI PQDRLTEV IASI I KPQNTYCVRRYAVVQKAAHG</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-γ</i> | <b>LRVPAQDPPEPELYFVKVDVTGAYDTI PQDRLTEV IASI I KPQNTYCVRRYAVVQKAAHG</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-4</i> | <b>LRVPAQDPPEPELYFVKVDVTGAYDTI PQDRLTEV IASI I KPQNTYCVRRYAVVQKAAHG</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
| <i>elim-β</i>    | <b>LRVPAQDPPEPELYFVKVDVTGAYDTI PQDRLTEV IASI I KPQNTYCVRRYAVVQKAAHG</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
| <i>elim-α</i>    | <b>LRVPAQDPPEPELYFVH-----DRLTEV IASI I KPQNTYCVRRYAVVQKAAHG</b>                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|                  | 763                                                                                                                                                                                                                                            | 773   | 783   | 793   | 803   | 813   |
|                  | .....                                                                                                                                                                                                                                          | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <i>hTERT</i>     | <b>VRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETS PLRDAVVI EQSSSLNEASSGLFDVFLRFM</b>                                                                                                                                                                            |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-γ</i> | <b>VRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETS PLRDAVVI EQSSSLNEASSGLFDVFLRFM</b>                                                                                                                                                                            |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-4</i> | <b>VRKAFKSHVSTLTDLPYMRQFVAHLQETS PLRDAVVI EQSSSLNEASSGLFDVFLRFM</b>                                                                                                                                                                            |       |       |       |       |       |
| <i>elim-β</i>    | <b>VRKAFKSHVLRPVPG <b>PC</b> P <b>PC</b> AGL <b>PC</b> HP <b>PC</b> HAAL <b>PC</b> PVL <b>PC</b> R <b>PC</b> P <b>PC</b> GEQAVC <b>PC</b> ED <b>PC</b> S <b>PC</b> AGR <b>PC</b> A <b>PC</b> P <b>PC</b> A <b>PC</b> G <b>PC</b> <b>PC</b></b> |       |       |       |       |       |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|                  | 823                                                                                                                                                                                                                                            | 833   | 843   | 853   | 863   | 873   |
|                  | .....                                                                                                                                                                                                                                          | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <i>hTERT</i>     | <b>HHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI LSTLLCSLCYGD MENKLFAGI RRDG LLLRLVDDFLLV</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-γ</i> | <b>HHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI LSTLLCSLCYGD MENKLFAGI RRDG LLLRLVDDFLLV</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-4</i> | <b>HHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI LSTLLCSLCYGD MENKLFAGI RRDG LLLRLVDDFLLV</b>                                                                                                                                                                        |       |       |       |       |       |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|                  | 883                                                                                                                                                                                                                                            | 893   | 903   | 913   | 923   | 933   |
|                  | .....                                                                                                                                                                                                                                          | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <i>hTERT</i>     | <b>PHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKT VVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGL</b>                                                                                                                                                                            |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-γ</i> | <b>PHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKT VVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGL</b>                                                                                                                                                                            |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-4</i> | <b>PHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKT VVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGL</b>                                                                                                                                                                            |       |       |       |       |       |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                |       |       |       |       |       |
|                  | 943                                                                                                                                                                                                                                            | 953   | 963   | 973   | 983   | 993   |
|                  | .....                                                                                                                                                                                                                                          | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| <i>hTERT</i>     | <b>LDTRTLEVQSDYSS YARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRK LFGVLR LKCHSLFLDLQVNS</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-γ</i> | <b>LDTRTLEVQSDYSS YARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRK LFGVLR LKCHSLFLDLQVNS</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |
| <i>injerto-4</i> | <b>LDTRTLEVQSDYSS YARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRK LFGVLR LKCHSLFLDLQVNS</b>                                                                                                                                                                          |       |       |       |       |       |



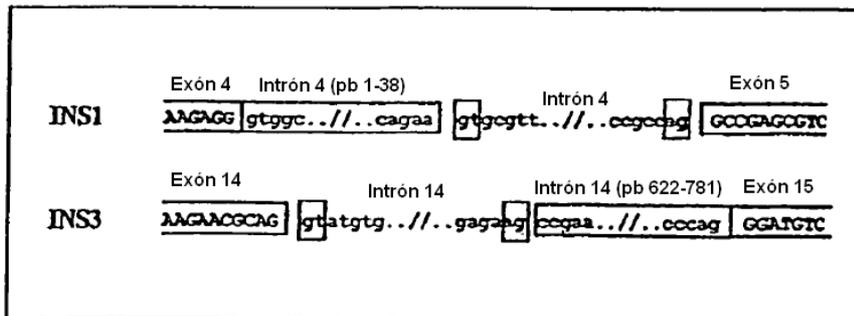
**FIGURA 2**

SEC ID N°: 1                    AEENISVVTPAVLGSGQPEMEPPRRPSGVGSFPVSPGRGAGLGL  
SEC ID N°: 2    YSILKAKNAAEENISVVTPAVLGSGQPEMEPPRRPSGVGSFPVSPGRGAGLGL  
  
SEC ID N°: 3                    VAVLWFNFLFKQKPSVSPRG  
SEC ID N°: 4    ARTFRREKRVAVLWFNFLFKQKPSVSPRG

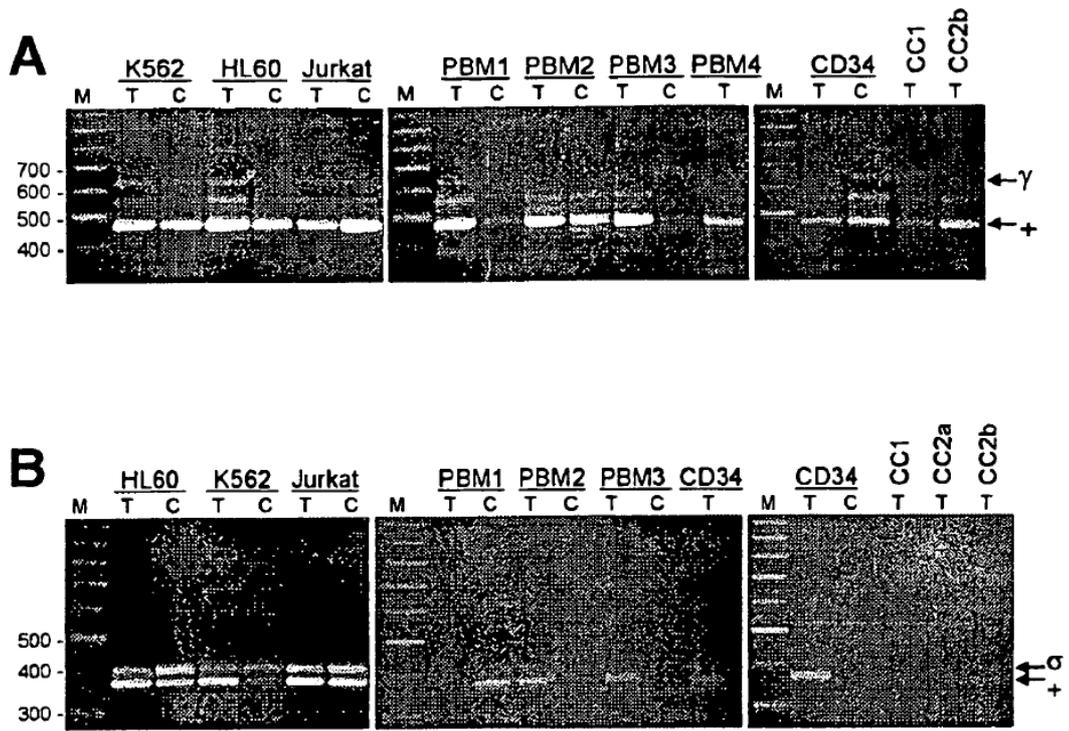
**FIGURA 3**



**FIGURA 4**

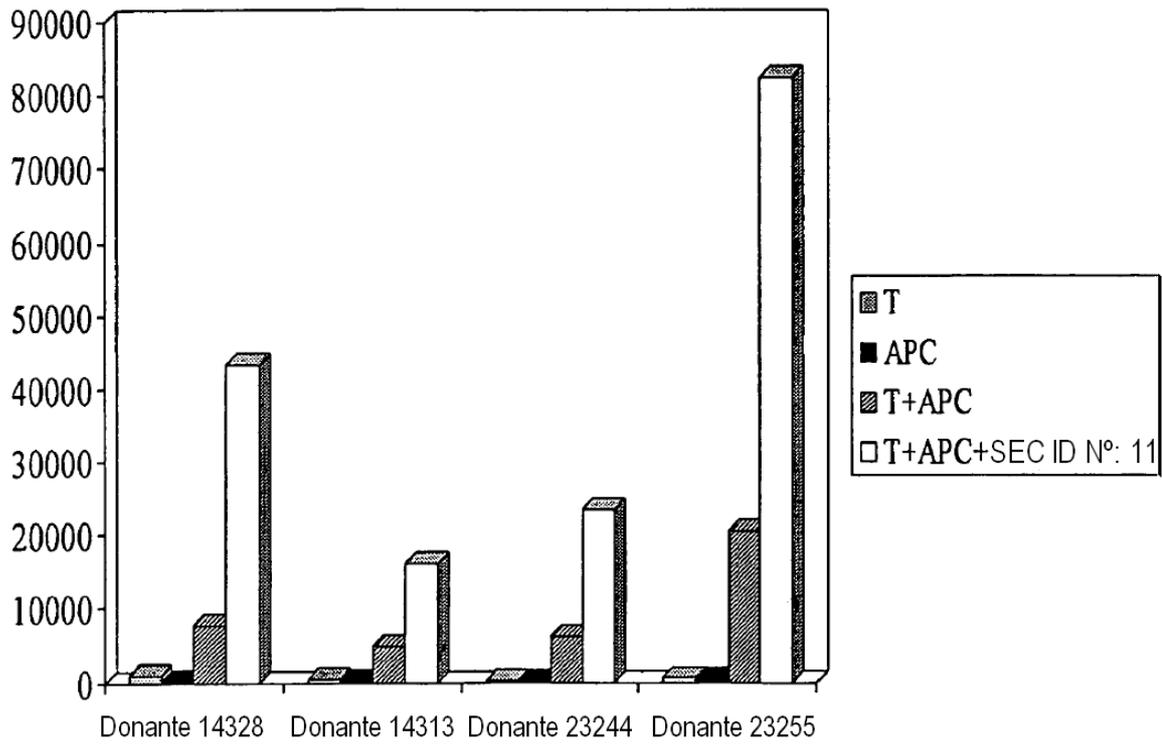


**FIGURA 5**



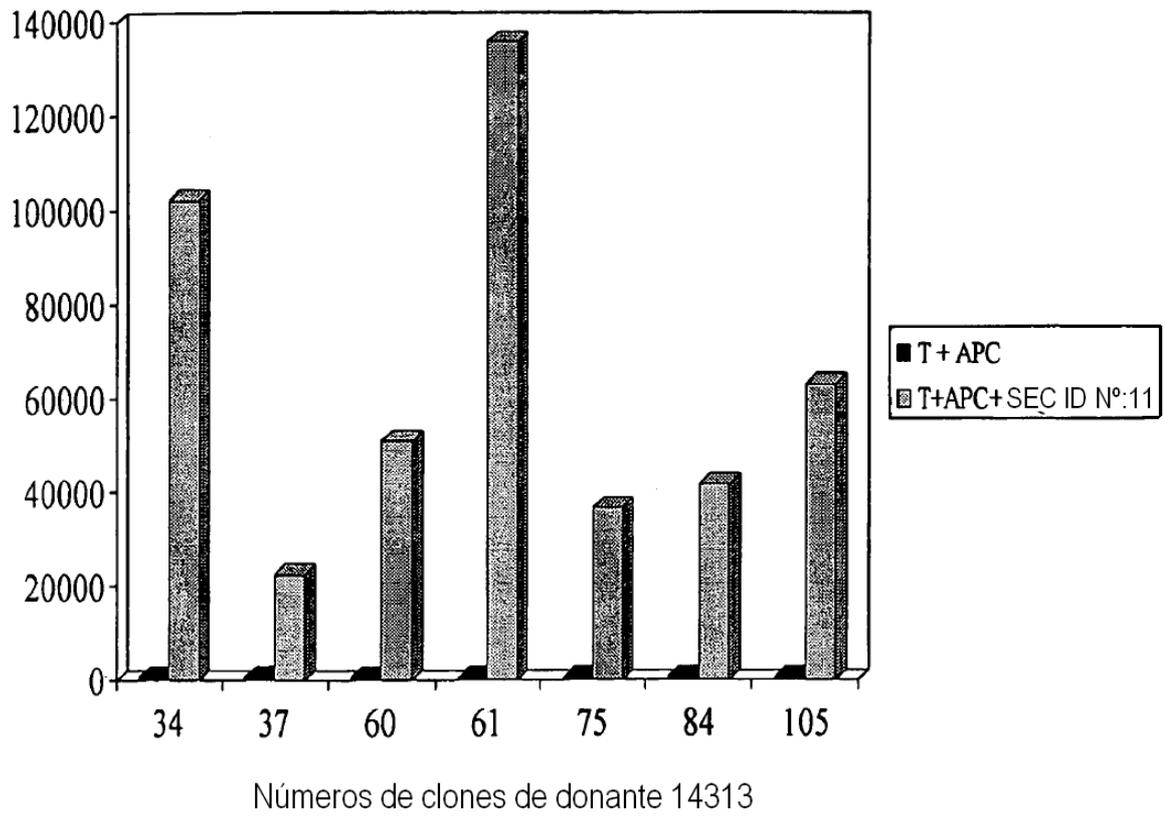
**FIGURA 6**

CPM

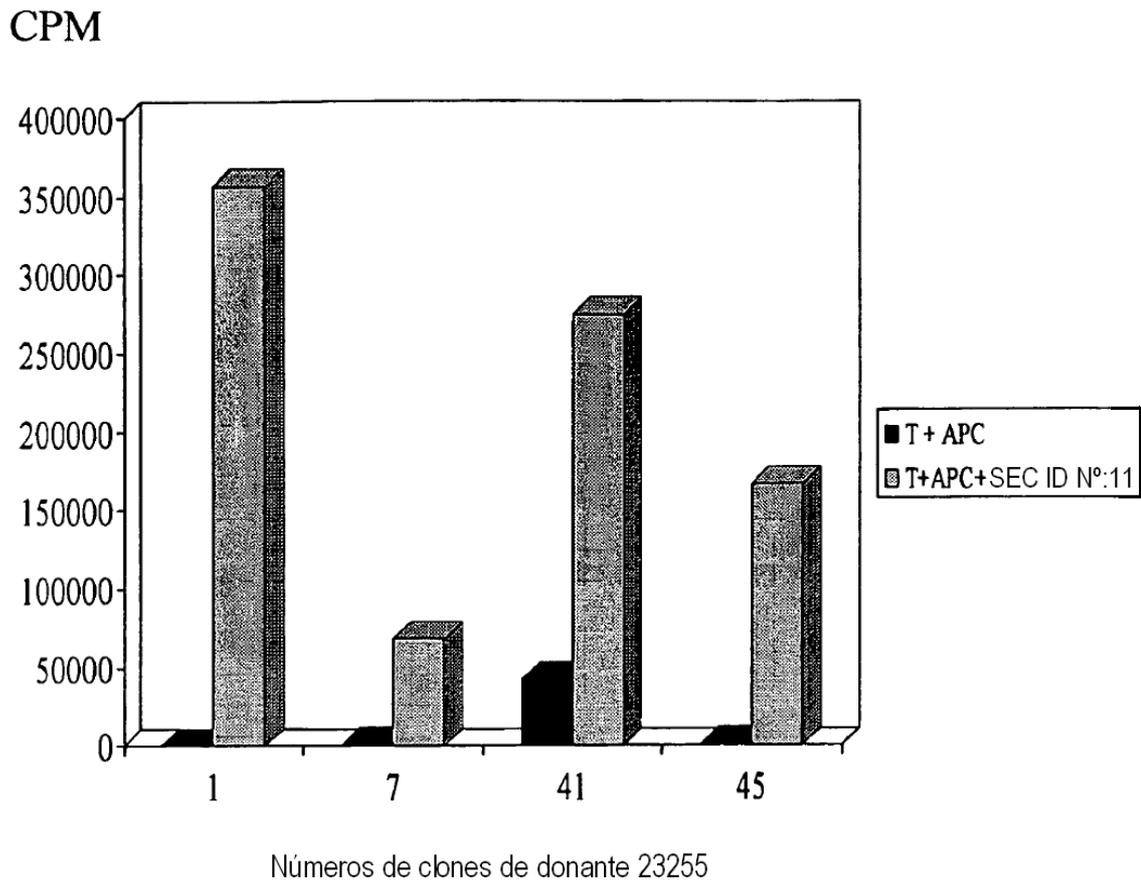


**FIGURA 7**

CPM



**FIGURA 8**



**FIGURA 9**