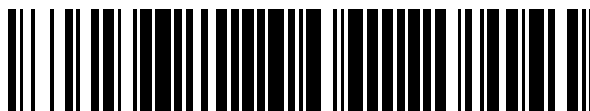


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 967**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/74 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05703824 .2**

96 Fecha de presentación: **19.01.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1715042**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2006**

54 Título: **Epítopo/péptido reconocido por LTC específico para Ep-CAM con restricción por ALH-A2402 y su utilización**

30 Prioridad:
20.01.2004 JP 2004011752

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2012

73 Titular/es:
AICHI PREFECTURE (50.0%)
1-2, 3-CHOME, SANNOMARU, NAKA-KU
NAGOYA-SHI, AICHI460- 850, JP y
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:
KUZUSHIMA, KIYOTAKA

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

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).

ES 2 390 967 T3

DESCRIPCIÓN

Epítipo/péptido reconocido por LTC específico para Ep-CAM con restricción por ALH-A2402 y su utilización

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a péptidos epítomos reconocidos por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402, células presentadoras de antígeno y a complejos de antígeno de histocompatibilidad mayor; a vacunas contra el cáncer o inductores de linfocitos T citotóxicos que comprenden estos como principio activo; a medicamentos de inmunoterapia pasiva para los cánceres epiteliales que comprenden como principio activo un inductor de linfocitos T citotóxicos; a tratamientos del cáncer o a los métodos de mejora que utilizan éstos; y métodos de cuantificación de linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 específicos para cánceres.

15 **Antecedentes de la técnica**

Los linfocitos T citotóxicos (a los que en adelante se hace referencia como "LTC") son considerados un factor importante para contrarrestar los cánceres.

Puede observarse la infiltración de los LTC que presentan citotoxicidad contra las células tumorales en las zonas tumorales de un paciente con cáncer. Un antígeno tumoral, que es una molécula dirigida por dichos LTC específicos de tumor, se divide en una célula en péptidos (péptidos epítomos tumorales) que comprenden 8 a 11 aminoácidos, se une a un antígeno leucocitario humano (en adelante, mencionado como "ALH") que es un antígeno de histocompatibilidad mayor y se presenta a continuación en la superficie de una célula tumoral. Los LTC reconocen complejos que comprenden el ALH y el péptido antigénico tumoral y atacan las células tumorales. Los LTC de este modo reconocen las células tumorales por la restricción de LAH del antígeno tumoral.

Los ALH son antígenos de la membrana celular expresados en casi todas las células y se clasifican en general en antígenos de clase I y antígenos de clase II. Los ALH reconocidos junto con los péptidos epítomos por los LTC se clasifican como antígenos de clase I. Los antígenos de clase I ALH se clasifican en ALH-A, ALH-B, ALH-C, etc. y sus genes tienen subtipos. Por ejemplo, ALH-A es polimorfo y tiene los subtipos A1, A2, A24, A26, etc.. Los ALH de cada ser humano no son por lo tanto siempre idénticos y los LTC pueden incluso reconocer estos subtipos de ALH al reconocer un complejo de un antígeno ALH de clase I y un péptido epítomo tumoral. Además, los péptidos epítomos capaces de unirse a antígenos se sabe que tienen un motivo de secuencia peptídica (secuencia estampada) capaz de unirse a uno de cada tipo de ALH. Por consiguiente, para la inducción y/o activación de los LTC, es esencial seleccionar péptidos que comprenden el motivo capaz de unirse a diferentes tipos de ALH para cada pacientes.

La Ep-CAM es una molécula muy expresada en la superficie de las células de cáncer de origen epitelial y actúa como intermediario para la adhesión célula a célula independiente de calcio. La Ep-CAM también es conocida como EGP-2, 17-1A, GA733-2, o KSA. La Ep-CAM se expresa mucho en muchos tumores derivados de diversos orígenes histológicos tales como el intestino grueso, los pulmones, la cabeza y el cuello, las glándulas mamarias, etc. y su expresión es regional en las células epiteliales normales. Además, puesto que la evolución del tumor y el nivel de expresión de Ep-CAM se correlacionan, la detección de la expresión de Ep-CAM es útil como marcador para el diagnóstico de metástasis tumoral mínimamente presente y en la predicción del pronóstico del paciente.

La Ep-CAM se expresa ampliamente en las células cancerosas que se originan a partir de células epiteliales, pero se expresa localmente en las células normales. Dado esto, Ep-CAM es un objetivo importante en inmunoterapias y terapias génicas con anticuerpos monoclonales.

Por ejemplo, se ha informado de que la administración de un anticuerpo monoclonal murino específico para Ep-CAM (denominado 17-1A) a pacientes cuyos tumores se habían extirpado quirúrgicamente era eficaz en la profilaxis de metástasis a distancia y que 7 años consecutivos de administración fueron eficaces para mejorar los índices de supervivencia. También se ha informado de que anticuerpos monoclonales específicos para Ep-CAM denominados 17-1A son eficaces en la reducción del índice de mortalidad y en la recaída tumoral cuando se utiliza para el tratamiento de pacientes con cánceres del intestino grueso.

Además, algunos informes recientes describen el hecho que presenta la posibilidad de tratamientos contra el cáncer utilizando LTC dirigidos a Ep-CAM con restricción por ALH.

Por ejemplo, en el documento de patente 1 se publica que los LTC específicos para Ep-CAM con restricción por ALH-A0201 destruyen las células epiteliales tumorales, pero no afectan a las células normales. El documento de Patente 1 describe un péptido que consiste en la secuencia YQLDPKFITSI representada por SEC. ID. nº 12 como péptido epítomo 174-184 de Ep-CAM reconocido por los LTC con restricción por ALH-A0201 .

La respuesta de los linfocitos T a Ep-CAM se observa también en pacientes de cáncer colon y de intestino grueso que no reciben inmunoterapia. Además, cuando pacientes con cáncer de intestino grueso se inmunizan con virus de

la viruela del canario recombinante que expresa Ep-CAM, la respuesta de LTC específico anti Ep-CAM se deriva sin producir respuesta autoinmunitaria.

Entre los tipos de ALH-A en antígenos ALH de clase I, ALH -A24 se expresa la mayoría de las veces entre los japoneses. Por consiguiente, los péptidos epítomos Ep-CAM con restricción por ALH-A24 son vacunas contra el cáncer supuestamente deseables. Se han publicado como tales, por ejemplo, los péptidos epítomos siguientes.

El documento de patente 2 da a conocer 5 tipos de péptidos epitópicos, que constan de la secuencia de aminoácidos que contiene 9 restos de aminoácidos, derivados de proteínas de antígeno tumoral SART-2 como péptido epítomo de LTC con restricción por ALH- A2402.

El documento de patente 3 da a conocer 6 tipos de péptidos epitópicos, que constan de la secuencia de aminoácidos que contiene 8 a 11 restos de aminoácidos, derivados de proteínas de antígeno tumoral 4-ART como péptido epítomo de LTC con restricción por ALH-A240.

El documento de patente 4 da a conocer 7 tipos de péptidos epitópicos, que constan de la secuencia de aminoácidos que contiene 8 a 11 restos de aminoácidos, procedentes de proteínas p561uk (proteínas de antígeno tumorales codificadas por el gen luk) anormalmente expresadas en células de cáncer de intestino grueso y células pequeñas de cáncer de pulmón como péptido epítomo de LTC con restricción por ALH-A2402 obtenido de una estirpe celular creada de un paciente de cáncer de esófago.

El documento de Patente 5 da a conocer 4 tipos de péptidos derivados de PI-9, que constan de la secuencia de aminoácidos que contiene 9 a 10 aminoácidos, obtenidos del banco de ADNc derivado de la estirpe de células tumorales KE4 como péptido epítomo de LTC con restricción por ALH-A2402 obtenido de una estirpe celular creada de un paciente de cáncer de esófago.

El documento de patente 6 da a conocer 17 tipos de péptidos epitópicos, que consta de la secuencia de aminoácidos que contiene 9 a 10 aminoácidos, de péptidos derivados de PI-9 obtenidos del banco de 11 a 18 ADNc de la estirpe de células de adenocarcinoma pulmonar como péptido epítomo de LTC con restricción por ALH-A2402 obtenido de una estirpe celular creada de un paciente de cáncer de pulmón.

El documento de patente 7 da a conocer un péptido epítomo que consta de 9 a 10 restos de aminoácidos, tiene un motivo capaz de unirse a ALH-A24.1 (ALH-A2402) y tiene un primer resto conservado de Y, F o W hacia el terminal N y un segundo resto conservado de F, I, W o M hacia el terminal C, en el que los primer y segundo restos conservados están separados por 6 a 7 restos.

Como se ejemplificó anteriormente, se han identificado varios epítomos de LTC con restricción por ALH-A2402 entre los antígenos relacionados con el tumor, sin embargo la expresión de antígenos tumorales varía dependiendo de los orígenes histológicos, de cada paciente de cáncer y de la lesión de cada paciente y por lo tanto es de esperar que se especifiquen nuevos epítomos adicionales.

Además, puesto que la derivación de los LTC por el péptido epítomo Ep-CAM capaz de unirse a una molécula ALH-A2402 aún no se ha confirmado, existe una demanda para el desarrollo de nuevos péptidos epítomos Ep-CAM específicos para células de cáncer capaces de unirse a una molécula de ALH-A2402 y capaces de inducir los LTC.

Documento de patente 1:

Publicación de patente internacional nº WO 97/15597

Documento de patente 2:

Publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar nº 1999-318455

Documento de patente 3:

Publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar nº 2000-116383

Documento de patente 4:

Publicación de patente internacional nº WO 2000-06595

Documento de patente 5:

Publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar nº 2001-245675

Documento de patente 6:

Publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar nº 2003-270

Documento de patente 7:

Publicación de solicitud de patente japonesa sin examinar nº 1996-500103 (reivindicación 11, etc)

Descripción de la invención

Problemas que debe resolver la invención

Los objetivos de la presente invención consisten en proporcionar péptidos epítomos Ep-CAM capaces de inducir linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402, células presentadoras de antígeno y complejos de antígeno de histocompatibilidad mayor; vacunas contra el cáncer o inductores de linfocitos T citotóxicos que comprenden éstos como principio activo; linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402-específicos para Ep-CAM; fármacos para inmunoterapia pasiva que comprende dichos linfocitos, tratamiento de cáncer o métodos de mejora utilizando éstos; y métodos de cuantificación de linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 específicos para cáncer epitelial.

Medios para resolver los problemas

Para conseguir los objetivos anteriores, se predijeron y sintetizaron 7 secuencias peptídicas en proteínas EP-CAM por un método bioinformático para encontrar las secuencias de péptidos epítomos que tienen capacidad para unirse a una molécula ALH-A2402, que es el tipo más corriente en las ALH-A (más de 60%) en la población japonesa y aproximadamente 20% en la población europea.

Al predecir péptidos capaces de unirse a una molécula ALH específica por un método bioinformático, los linfocitos T citotóxicos inducidos por dichos péptidos predichos en realidad a menudo no reconocen los antígenos que comprenden dichos péptidos.

En tales circunstancias, se observó que los clones de LTC específicos para dos de cada siete péptidos epítomos predichos realmente presentan citotoxicidad a células cancerosas que expresan Ep-CAM positivo a ALH-A2402, pero no presentan citotoxicidad a células cancerosas negativas a ALH-A2402.

Además, un ensayo de inhibición del objetivo en frío demostró que estos péptidos epítomos se procesan y se presentan como antígenos en células cancerosas positivas a Ep-CAM positivo a ALH-A2402.

Por lo tanto, estos dos péptidos epítomos se puede utilizar como vacunas contra el cáncer para las personas que tienen ALH-A2402.

La presente descripción se ha conseguido sobre la base de los descubrimientos anteriores y describe los siguientes péptidos epítomos y similares.

Apartado 1. Un péptido de cualquiera de (1) a (4) siguientes:

(1) un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1

(2) un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2

(3) un péptido mutante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1 por adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, siendo el péptido capaz de formar un complejo con una molécula de ALH-A2402 para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos

(4) un péptido mutante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2 por adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, el péptido es capaz de formar un complejo con una molécula de ALH-A2402 para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos.

Apartado 2. Un péptido de cualquiera de (1) o (2):

(1) un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1

(2) un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2.

Apartado 3. Una vacuna contra el cáncer que comprende el péptido del apartado 1 ó 2 como principio activo.

Apartado 4. Una vacuna contra el cáncer de apartado 3, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.

5 Apartado 5. Una vacuna contra el cáncer de apartado 3 ó 4, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cáncer nasofaríngeo, cánceres de útero, cánceres de próstata y cánceres de vesícula biliar.

10 Apartado 6. Una vacuna contra el cáncer de una cualquiera de los apartados 3 y 5, que se utiliza para un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Apartado 7. Un inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende el péptido del apartado 1 ó 2 como principio activo.

15 Apartado 8. Un inductor de linfocitos T citotóxicos del apartado 7 que se utiliza para el ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Apartado 9. Un polinucleótido de cualquiera de los apartados (5) a (8) siguientes:

20 (5) un polinucleótido que consta esencialmente de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 10

(6) un polinucleótido que consta esencialmente de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 11

25 (7) un polinucleótido mutante que se hibrida con un polinucleótido que consta de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 10 en condiciones severas y que codifica un péptido capaz de formar un complejo con una molécula de ALH-A2402 para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos

30 (8) un polinucleótido mutante que se hibrida con un polinucleótido que consta de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 11 en condiciones severas y que es capaz de formar un complejo con una molécula de ALH-A2402 para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos.

35 Apartado 10. Un medicamento de terapia génica para un cáncer epitelial que comprende el polinucleótido de apartado 9 como principio activo.

Apartado 11. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de apartado 9.

Apartado 12. Un transformante en el que se introduce el vector recombinante de apartado 11.

40 Apartado 13. Un procedimiento para producir el péptido del apartado 1 ó 2, que comprende las etapas que consisten en cultivar el transformante de apartado 12 y recoger el péptido del apartado 1 ó 2 del cultivo.

Apartado 14. Una célula presentadora de antígeno que se pulsó con el péptido del apartado 1 ó 2.

45 Apartado 15. Una vacuna contra el cáncer que comprende la célula presentadora de antígeno del apartado 14 como principio activo.

Apartado 16. Una vacuna contra el cáncer de apartado 15, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.

50 Apartado 17. Una vacuna contra el cáncer de apartado 15 ó 16, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cáncer nasofaríngeo, cánceres de útero, cánceres de próstata y cánceres de vesícula biliar.

55 Apartado 18. Una vacuna contra el cáncer de cualquiera de los apartados 15 a 17 que se utiliza para un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

60 Apartado 19. Un inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende la célula presentadora de antígenos del apartado 14 como principio activo.

Apartado 20. Un inductor de linfocitos T citotóxicos de apartado 19 que se utiliza para el tratamiento de un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

65 Apartado 21. Un complejo antigénico de histocompatibilidad mayor que comprende un antígeno de histocompatibilidad mayor y el péptido del apartado 1 ó 2 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de antígeno del apartado 14.

Apartado 22. Un complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 21 que comprende una molécula de ALH-A2402, una microglobulina β_2 y el péptido del apartado 1 ó 2 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de antígeno de apartado 14.

Apartado 23. Una vacuna contra el cáncer que comprende el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 21 ó 22 como principio activo.

Apartado 24. Una vacuna contra el cáncer de apartado 23, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.

Apartado 25. Una vacuna contra el cáncer de apartado 23 ó 24, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cáncer nasofaríngeo, cánceres de útero, cánceres de próstata y cánceres de vesícula biliar.

Apartado 26. Una vacuna contra el cáncer de cualquiera de los apartados 23 a 25, que se utiliza para el tratamiento de un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Apartado 27. Un inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 21 ó 22 como principio activo.

Apartado 28. Un inductor de linfocitos T citotóxicos de apartado 27 que se utiliza para el tratamiento de un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Apartado 29. Un tetrámero de complejo antigénico de histocompatibilidad mayor que comprende un antígeno de histocompatibilidad mayor y el péptido del apartado 1 ó 2 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de antígeno de apartado 14.

Apartado 30. Un linfocito T citotóxico que se obtiene mediante la estimulación de linfocitos de sangre periférica utilizando uno o más de (a) a (d) a continuación:

(a) el péptido del apartado 1 ó 2

(b) la célula presentadora de antígeno del apartado 14

(c) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 21 ó 22

(d) el tetrámero de complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 29.

Apartado 31. Un linfocito T citotóxico del apartado 30 que se obtiene mediante las etapas de formación de un complejo entre un complejo antigénico de histocompatibilidad mayor y/o un tetrámero de los mismos y un linfocito T citotóxico mediante la estimulación de linfocitos de sangre periférica utilizando uno o más de (a) a (d) definidos en el apartado 30 y de aislamiento del linfocito T citotóxico del complejo.

Apartado 32. Un medicamento de inmunoterapia pasiva que comprende el linfocito T citotóxico del apartado 30 ó 31 como principio activo.

Apartado 33. Un medicamento de inmunoterapia pasiva del apartado 32, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.

Apartado 34. Un medicamento de inmunoterapia pasiva del apartado 32 ó 33, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cáncer nasofaríngeo, cánceres de útero, cánceres de próstata y cánceres de vesícula biliar.

Apartado 35. Un medicamento de inmunoterapia pasiva de cualquiera de los apartados 32 a 34 que se utiliza para un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Apartado 36. Un método de cuantificación de linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 en la sangre periférica, que comprende las etapas de

preparar uno o más de los siguientes (a) a (d) para actuar en la sangre periférica:

(a) el péptido del apartado 1 ó 2

(b) la célula presentadora de antígeno de apartado 14

(c) el tetrámero de complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 21 ó 22

(d) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 29 y

5 cuantificación de los linfocitos T citotóxicos en la sangre periférica o de la citocina producida por dichos linfocitos citotóxicos.

Apartado 37. Un tratamiento de cáncer y/o método de mejora que comprende la administración de uno o más de los siguientes (a) a (d) a un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario:

10

(a) el péptido del apartado 1 ó 2

(b) célula presentadora de antígeno del apartado 14

15

(c) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 21 ó 22

(d) el tetrámero de complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 29.

20

Apartado 38. Un tratamiento de cáncer o método de mejora que comprende las etapas de recogida de la fracción de células mononucleares de sangre periférica de un paciente humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario,

cultivo de la fracción de células mononucleares con uno o más de los siguientes (a) a (d):

25

(a) el péptido del apartado 1 ó 2

(b) la célula presentadora de antígeno de apartado 14

30

(c) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 21 ó 22

(d) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 29 y

devolver a la sangre del paciente la fracción de células mononucleares en la que los linfocitos T citotóxicos son inducidos y/o activados.

35

Apartado 39. Un método para inducir linfocitos T citotóxicos que comprende la administración de uno o más de los siguientes (a) a (d) a un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario:

40

(a) el péptido del apartado 1 ó 2

(b) la célula presentadora de antígeno del apartado 14

(c) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor del apartado 21 ó 22

45

(d) el tetrámero de complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 29.

Apartado 40. Un tratamiento o método de mejora del cáncer que comprende administrar el linfocito T citotóxico del apartado 30 ó 31 a un ser humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

50

Apartado 41. Un tetrámero complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 21, en el que el tetrámero es un complejo que comprende la molécula de ALH-A2402, microglobulina $\beta 2$ y el péptido del apartado 1 ó 2 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de antígeno de apartado 14 .

55

Apartado 42. Una vacuna contra el cáncer que comprende el antígeno de histocompatibilidad tetrámero de complejo de apartado 41 como principio activo.

Apartado 43. Una vacuna contra el cáncer de apartado 42, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.

60

Apartado 44. Una vacuna contra el cáncer de apartado 42 ó 43, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cáncer nasofaríngeo, cánceres de útero, cánceres de próstata y los cánceres de vesícula biliar.

65

Apartado 45. Una vacuna contra el cáncer de cualquiera de los apartados 42 a 44, que es útil para el tratamiento humano que tiene ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Apartado 46. Un inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende el tetrámero complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de apartado 41.

Apartado 47. Un inductor de linfocitos T citotóxicos de apartado 46 que es útil para el tratamiento de seres humanos que tienen ALH-A2402 como antígeno leucocitario.

Efecto de la invención

La presente invención proporciona péptidos epítomos que proceden de moléculas Ep-CAM muy expresadas en las células de cáncer epitelial y pueden ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402, que es el tipo más común de antígenos leucocitarios humanos entre la población japonesa. En consecuencia, dichos péptidos epítomos se puede utilizar como vacunas contra el cáncer para el tratamiento generalizado de cánceres epiteliales humanos positivos a ALH-A2402.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de la evaluación por ensayo ELISOT de una estirpe de células LTC activadas por péptido policlonal.

La figura 2 muestra los resultados de la tinción con tetrámero de los LTC (A) policlonales y (B) monoclonales específicos para el péptido Ep-CAM.

La figura 3 muestra las características del clon de LTC específico para Ep173.

La figura 3A muestra el ensayo de liberación de ⁵¹Cr que muestra la citotoxicidad de C27 (clon de LTC específico para Ep173) contra T2-A24 en presencia de péptido Ep173 o péptido de control EBV-LMP419.

La figura 3B muestra el efecto inhibitorio de anticuerpos anti-ALH-A24 monoclonales sobre la citotoxicidad del clon de LTC (C27) específico para Ep173 contra una estirpe celular positiva a ALH-A2402 (PC9).

La figura 3C muestra la citotoxicidad de C27 en presencia de Ep173 basada en el ensayo de inhibición de la diana en frío.

La figura 4 muestra el análisis de Ep-CAM basado en la RCP.

La figura 5 muestra las citotoxicidades del clon de LTC (C27) específico para Ep173 frente a varias estirpes celulares de cáncer.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La presente invención se describe con detalle a continuación.

(I) Epítomo/péptido

Estructura

Los péptidos de la invención se confirmó que eran péptidos epítomos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (denominados en adelante "LTC") como resultado de la detección los péptidos potenciales resultan ser péptidos epítomos con referencia a las HLA Peptide Binding, Predictions, Bioinformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS), (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html), que es un sitio de referencia para la búsqueda de péptidos epítomos constituidos por 9 a 10 aminoácidos que tienen un motivo de unión ALH-A2402 en secuencias de aminoácidos derivadas de la proteína Ep-CAM muy expresada en las células cancerosas que se originan a partir de células epiteliales.

Más específicamente, un péptido dado a conocer es cualquiera de (1) a (4) siguientes:

(1) un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1,

(2) un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2,

(3) un péptido mutante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos procedente de la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1 por adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, siendo el péptido capaz de formar un complejo con una molécula de ALH-A2402 que es reconocida por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos, o

(4) un péptido mutante que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos procedente de la secuencia

de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2 por adición, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, siendo el péptido capaz de formar un complejo con una molécula de ALH-A2402 que es reconocida por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos.

- 5 En la invención, péptido significa una cadena molecular de aminoácidos bioactivos en la que los grupos α -amino y grupos carboxilo de los restos de aminoácidos adyacentes están unidos por enlaces peptídicos.

Además de los péptidos mencionados anteriormente, los péptidos también incluyen sales y derivados de los mismos en la medida en que sus bioactividades no se ven deterioradas. Los ejemplos de dichos derivados incluyen los
10 glucosilados, amidados, fosforilados, carboxilados, fosfonados, formilados, acilados, etc. Las sales preferibles son las sales de adición de ácido. Los ejemplos de dichas sales incluyen las sales de adición de ácido clorhídrico, de ácido fosfórico, de ácido sulfúrico y de ácidos inorgánicos similares; y sales de adición de ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido tartárico y de ácidos orgánicos similares.

15 Los péptidos definidos en (1) a (4) derivan cada uno de Ep-CAM muy expresado en las células cancerosas originarias de células epiteliales y son reconocidos por los LTC con restricción por ALH-A2402 o inducen o activan más dichos LTC. Por lo tanto, estos péptidos pueden utilizarse adecuadamente como inductores de LTC o la activación de antígenos tumorales, es decir, vacunas contra el cáncer, para el tratamiento o la mejora de cánceres humanos que tienen ALH-A2402. Además, estos péptidos se pueden utilizar para la preparación de diversos
20 antígenos tumorales específicos para péptidos epitópicos. Las utilizaciones de los péptidos de la invención se describen a continuación.

El número mínimo de aminoácidos en los péptidos mutantes definidos en (3) y (4) es normalmente de aproximadamente 5 y preferentemente de aproximadamente 7. El número máximo de aminoácidos no está limitado,
25 siempre que el péptido puede ser reconocido por un LTC con restricción por ALH-A2402 y es habitualmente alrededor de 12, siendo preferible péptidos mutantes que comprenden aproximadamente 9 a 11 aminoácidos.

Dichos péptidos mutantes se pueden obtener diseñando las secuencias para motivos de unión a ALH-A2402 con referencia a las predicciones de unión de péptidos a ALH mencionadas anteriormente y la seleccionando de ellas las
30 que en realidad puede ser reconocidas por los LTC con restricción por LTC ALH-A2402 o inducir dichos LTC.

Péptidos epitópicos Ep-CAM positivos a ALH-A2402 pueden identificarse, por ejemplo, por el siguiente método.

Se aíslan linfocitos a partir de adultos positivos a ALH-A2402 y se ponen en suspensión en un medio RPMI1640 que
35 contiene suero humano al 10% a una concentración celular de 2×10^6 /ml. A cada suspensión celular se le añade uno de los péptidos epítomos experimentales a una concentración de 1 μ g/ml. Las suspensiones se incubaron en una incubadora con CO₂ a 37°C durante 7 días y se añade IL-2 el 7º día. Después de eso, el ciclo A de estimulación por el péptido experimental y la estimulación por IL-2 se repite una vez a la semana para inducir LTC específicos para Ep-CAM.

40 Se determina por ensayo ELISPOT (Kuzushima K. *et. al.*, *The Journal of Clinical Investigation*, (1999), Vol. 104, páginas 163-171; etc.) si los péptidos epítomos experimentales estimulan o no los CTL específicos para cáncer epitelial inducidos de este modo.

45 Utilizando los péptidos experimentales anteriores, un banco de péptidos de los péptidos que comprenden aproximadamente 20 aminoácidos se sintetiza que cubre toda la proteína Ep-CAM, el ensayo ELISPOT se lleva a cabo con los péptidos sintetizados y los péptidos a los que responden los LTC se acortan gradualmente para que comprendan finalmente aproximadamente 9 a 10 aminoácidos ácidos para utilizar como péptidos epítomos de la invención.

50 Además, con respecto a la sustitución de aminoácidos, un péptido mutante con una actividad equivalente es probable que se obtenga si un aminoácido con carga eléctrica, solubilidad, hidrofilia/hidrofobia, polaridad y propiedades similares a las del aminoácido presustituido se sustituye a fin de conservar la estructura proteica.

55 Los métodos para introducir eliminaciones, adiciones (incluyendo inserciones) y sustituciones son bien conocidos y los ejemplos incluyen la técnica de Wurmer (Science, 219.666 (1983)).

El péptido de la invención se puede utilizar en forma de complejos con adición de sacáridos, polietilenglicoles, lípidos y similares, derivados de isótopos radiactivos y polímeros, etc.

60 (II) Polinucleótidos

El polinucleótido de la descripción codifica el péptido anterior de la invención y está definido específicamente por uno cualquiera de (5) a (8) a continuación:

65 (5) un polinucleótido que consta esencialmente de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 10,

(6) un polinucleótido que consta esencialmente de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 11,

(7) un polinucleótido mutante que se hibrida con un polinucleótido que consta de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 10 en condiciones severas y que codifica un péptido capaz de formar un complejo con una molécula ALH-A2402 para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos, o

(8) un polinucleótido mutante que se hibrida con un polinucleótido que consta de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 11 en condiciones severas y que es capaz de formar un complejo con una molécula ALH-A2402 para ser reconocido por linfocitos T citotóxicos con restricción por ALH-A2402 o inducir dichos linfocitos.

A menos que se indique lo contrario, los polinucleótidos de la invención comprenden tanto a ADN como ARN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. ARN incluye ARNm, ARNr y ARN sintético. Además de los polinucleótidos que tienen dichas secuencias de bases, también se incluyen los complementarios a dichos polinucleótidos y polinucleótidos bicatenarios.

El polinucleótido de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 10, que es uno de los polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1 y el polinucleótido de la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 11, que es uno de los polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2, son secuencias parciales del gen Ep-CAM obtenido de antígeno GA733-2 asociado al carcinoma humano (Szala, S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1990) 87 (9), 3542-3546).

Los polinucleótidos mutantes definidos en (7) y (8) son cualquiera de los que normalmente comprenden 15 o más, y preferentemente 21 o más, pero generalmente 45 o menos nucleótidos en la región que codifica el péptido epítipo de la invención. De éstos, son preferibles los polinucleótidos que comprenden aproximadamente 27 a 33 nucleótidos.

Tomando las moléculas de ADN como ejemplo representativo de moléculas de polinucleótidos, "moléculas de ADN hibridables con moléculas de ADN en condiciones severas" se pueden obtener por los métodos descritos en, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.* edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989), etc. En la presente invención, "condiciones severas" se refiere a, por ejemplo, las condiciones en las que se observa una hibridación con señal de hibridación positiva cuando se calienta a 42°C en una solución de 6 x SSC, 0,5% SDS y 50% de formamida y se lava en una solución de 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 68°C.

Los polinucleótidos mutantes de (7) y (8) se puede seleccionar al confirmar que los péptidos expresados en las células que tienen ALH-A2402 utilizando sistemas conocidos de expresión de proteínas son reconocidas por los LTC o tienen capacidad para inducir los LTC por los métodos descritos a continuación.

Los polinucleótidos mutantes tienen una estructura 3' poli A y el número de nucleótidos de poli A de los polinucleótidos no está limitado ya que no afectan a las regiones de codificación de aminoácidos que actúan como antígenos tumorales.

El polinucleótido de la invención puede proporcionar información genética útil cuando se prepara el péptido epítipo de la invención utilizando técnicas de recombinación. Dicho polinucleótido puede utilizarse como reactivo de ácido nucleico o polinucleótido patrón.

(III) Vector recombinante

El vector recombinante de la presente invención se obtiene introduciendo el polinucleótido de la invención en un ADN vector adecuado.

El vector ADN se puede seleccionar adecuadamente según el tipo de célula hospedadora e intención de utilización. Los ADN vector puede ser las presentes en la naturaleza, o los presentes en la naturaleza pero con ADN parcialmente desaparecido procedente de regiones no necesarias para la proliferación. Los ejemplos de los ADN vectores incluyen los que se originan en los cromosomas, episomas y virus. Más específicamente, los ADN vectores incluyen los procedentes de plásmidos de bacterias, bacteriófagos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos de cromosoma de levadura, virus (por ejemplo baculovirus, papovavirus, SV40, vacunavirus, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia, retrovirus, etc.), etc. y combinaciones de los mismos y los procedentes de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos (por ejemplo, cósmido, fagómido, etc.).

Además, los vectores de expresión y vectores de clonación se puede utilizar para biosintetizar los péptidos de la invención.

El vector recombinante tiene elementos constituyentes de una secuencia génica de polinucleótido objeto y las

secuencias de genes que codifican la información sobre la replicación y control (p. ej., activador, punto de unión liposómica, terminador, secuencia señal, potenciador, etc.) y se pueden preparar combinando estas secuencias por procedimientos conocidos.

Los polinucleótidos de la invención se puede insertar en los ADN vectores por procedimientos conocidos. Por ejemplo, el ADN y el ADN vector se pueden ligar en un punto específico utilizando una enzima de restricción adecuada y mezclarse por recombinación utilizando la ligasa. El ADN vector puede obtenerse alternativamente ligando un enlazador adecuado al polinucleótido de la invención e insertando el polinucleótido en un punto de clonación múltiple del ADN vector que satisface la intención de utilización.

(IV) Transformante

El transformante de la invención puede obtenerse introduciendo el vector recombinante anterior, que contiene el polinucleótido, a células hospedadoras conocidas tales como, por ejemplo, *Escherichia coli* (p. ej. K12), bacterias pertenecientes al género *Bacillus* (por ejemplo, MI114), levaduras (p. ej., AH22), células de insecto (p. ej., células Sf), células animales (p. ej., células COS-7, células Vero, células CHO, etc.), etc. por procedimientos conocidos.

Debido a la buena estabilidad génica, un procedimiento para la integración de genes en un cromosoma es un procedimiento de transferencia de genes preferible. Un sistema autónomo duplicado que utiliza un gen extranuclear es un método simple empleable. La transferencia del ADN vector a una célula hospedadora se puede realizar mediante procedimientos estándar dados a conocer en, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Ejemplos más específicos incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección con mediación de DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística, e infección, etc.

(V) Proceso para la producción de péptidos epitópicos

El péptido de la invención se pueden sintetizar por procedimientos conocidos de síntesis de péptidos tales como los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida y similares. Tales procedimientos de síntesis de péptidos incluyen los descritos en *Peptide Synthesis* (Maruzen, 1975) y *Peptide Synthesis* (Interscience, New York, 1996). El péptido epitopo de la invención se puede producir alternativamente utilizando equipos conocidos de síntesis química, tal como los sintetizadores de péptidos fabricados por Applied Biosystems.

Además, el péptido de la invención se pueden preparar por un procedimiento que comprende las etapas de cultivar el transformante de la invención descrito anteriormente y recoger el péptido de la invención de este cultivo.

Dicho cultivo se puede realizar por subcultivo o cultivo por lotes utilizando un medio adecuado para la célula hospedadora. El cultivo puede ser continuado hasta que el péptido de la invención se produce en una cantidad deseada, en base a la cantidad de péptidos producida dentro y fuera del transformante y/o a la capacidad de inducción de LTC, que es una de las acciones del péptido de la invención producidas por las exposiciones del transformante.

Es preferible purificar más el péptido de la invención después de la recogida del medio de cultivo. La purificación se puede realizar por métodos conocidos tales como cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y como técnicas cromatográficas; combinaciones de métodos de fraccionamiento basados en diferencias de solubilidad utilizando sulfato de amonio y/o alcoholes, etc. Dicha purificación puede llevarse a cabo basándose en el reconocimiento del péptido por los LTC o en la inducción de LTC por el péptido, más específicamente, por ejemplo, producción de IFN- γ por los LTC.

Alternativamente, el péptido de la invención en el medio de cultivo puede recuperarse específicamente por absorción utilizando antígenos policlonales o monoclonales, los cuales se producen basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido de la invención y son específicos para la secuencia de aminoácidos.

(VI) Células presentadoras de antígenos

La célula presentadora de antígeno de la invención se obtiene pulsando dendrocitos, macrófagos, linfocitos B y células presentadoras de antígeno similares con el péptido de la invención. La célula presentadora de antígenos de la invención es capaz de expresar los ALH que se unen al péptido de la invención en su superficie y tiene capacidad para estimular los LTC.

La "pulsación" no está restringida y se puede realizar, por ejemplo, incubando dichas células presentadoras de antígeno en un medio que contiene el péptido de la invención en aproximadamente de 1 a 10 g/ml a aproximadamente 20 a 30°C durante aproximadamente 30 minutos a 1 hora. Los péptidos antigénicos tumorales reconocidos por LTC con restricción por ALH-A2402 se presentan de este modo en la superficie de células presentadoras de antígeno.

Los antígenos tumorales se refieren a proteínas, polipéptidos o péptidos presentes en las células tumorales que son reconocidos por los LTC específicos del tumor, o inducen más los LTC y/o activan los LTC. Además, los péptidos antigénicos tumorales se refieren a péptidos producidos por la descomposición de los antígenos tumorales en células tumorales, dichos péptidos que son reconocidos por los LTC, inducen los LTC y/o activan los LTC, cuando se presentan en las superficies celulares como resultado de la unión a una molécula de ALH.

La secuencia del epítipo, derivado de una secuencia de aminoácidos en un antígeno tumoral y reconocida por los LTC específicos de tumor o que induce más LTC o que activa los LTC, se denomina epítipo del antígeno tumoral (determinante antigénico tumoral).

En la presente memoria, "reconocer" significa detectar y distinguir la diana de otras sustancias y, por ejemplo, unirse a las dianas que se detectan. En la presente memoria, "los LTC reconocen células tumorales o péptidos epitópicos del antígeno tumoral" significa que los LTC se unen a antígenos leucocitarios humanos (ALH) o péptidos antigénicos tumorales mediante los linfocitos T receptores.

"Activar" significa aumentar más o estimular una sustancia o el estado con una determinada actividad o acción. En particular, "los LTC se activan" significa que los LTC producen un efector tal como, p. ej. INF- γ presentan citotoxicidad contra las células diana que reconocen al reconocer péptidos epítipos presentados por los ALH.

"Inducir" significa producir cierta actividad o acción en una sustancia o estado que no tiene substancialmente dicha actividad o acción. En particular, "inducir los LTC específicos para el antígeno" significa diferenciar y/o multiplicar los LTC que reconocen específicamente a un antígeno determinado *in vitro* o *in vivo*.

La célula presentadora de antígeno con la que se pulsa el péptido epítipo de la invención puede utilizarse como vacuna contra el cáncer. La célula presentadora de antígeno puede utilizarse además para la producción de LTC específicos para cánceres epiteliales, la cuantificación de dichos LTC en la sangre periférica humana, etc.

(VII) Complejo antigénico de histocompatibilidad mayor

El complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de la invención es un complejo entre un antígeno de histocompatibilidad mayor y el péptido de la invención o el péptido epítipo del antígeno tumoral presentados en una superficie de la célula presentadora de antígeno a la se pulsa el péptido de la invención.

En la invención, el antígeno de histocompatibilidad mayor es una molécula que presenta el péptido reconocido por un linfocito T a un receptor antigénico de linfocitos T y es un antígeno leucocitario humano (ALH) reconocido, junto con los péptidos epítipos por los LTC.

Más específicamente, el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor (abreviado en adelante como "CHM") de la invención es un complejo entre CHM de clase I y el antígeno leucocitario humano (ALH) expresado en las superficies de las células diana que son reconocidas junto con el péptido epítipo por los LTC; y siendo reconocido el péptido epítipo por los LTC o capaz de inducir los LTC. Dichos complejos incluyen los unidos por microglobulina β_2 .

Los péptidos epítipos de LTC específicos para Ep-CAM son los péptidos de zonas específicas en proteínas Ep-CAM y son determinantes antigénicos reconocidos por los LTC y que se unen inmunológicamente a receptores antigénicos de los LTC. Además, péptidos epítipos de LTC pueden eliminar las células cancerosas al atacar directamente a las células que expresan moléculas de Ep-CAM.

En particular, los CHM de la invención se refieren a los complejos entre moléculas ALH-A2402 expresadas en las células diana y determinado péptido epítipo en las proteínas EP-CAM reconocidas por los LTC y además pueden referirse a dichos complejos con microglobulina β_2 .

ALH-A2402 en la invención se refiere a un polimorfismo A-24, una subclase de antígenos de Clase I, entre los antígenos leucocitarios humanos y una molécula ALH-A2402 significa un producto de expresión génica ALH-A2402 sobre una superficie de la célula presentadora de antígeno.

Las moléculas ALH-A2402 utilizables son algunas moléculas ALH-A2402 purificadas del cultivo de *E. coli* para la expresión de ALH-A2402, moléculas ALH-A2402 expresadas a la fuerza mediante la transferencia de un gen en una célula diana y moléculas ALH-A2402 presentes de forma natural en las células diana. Además, las moléculas ALH-A2402 de la invención comprenden fragmentos y cadenas pesadas de moléculas ALH-A2402.

Los CHM de la invención se puede producir por varios procedimientos, dependiendo de sus elementos constituyentes y pueden formarse, por ejemplo, poniendo en suspensión los péptidos de la invención, las moléculas ALH-A2402 y microglobulina β_2 en un tampón tal como Tris y similares e incubando la suspensión a aproximadamente 4 a 10°C durante aproximadamente 24 a 72 horas.

El CHM puede ser un tetrámero. El tetrámero CHM es un complejo polimérico de cuatro subcomplejos que comprende cada uno péptidos epítopos Ep-CAM reconocidos por los LTC y una molécula ALH-A2402 (normalmente una molécula ALH-A2402 unida a microglobulina $\beta 2$).

Un tetrámero CHM puede obtenerse por biotilación de CHM y mezcla con estreptavidina y el CHM biotilado en una proporción de 1 a 4. Alternativamente, el tetrámero CHM se puede obtener añadiendo una zona de unión a la biotina a un terminal C de una molécula de ALH, uniendo la biotina a dicha zona después de la formación de CHM y mezclando a continuación la estreptavidina y el CHM biotilado en una proporción 1 : 4.

Más específicamente, el tetrámero CHM se pueden preparar, por ejemplo, de la siguiente manera. Para la preparación de CHM, se producen en grandes cantidades las cadenas pesadas de la molécula ALH-A2402 y microglobulina $\beta 2$ utilizando un sistema de expresión de la proteína recombinante de *E. coli* para la expresión de CHM y se purifican. Una secuencia de aminoácidos que reconoce la biotina ligasa se agrega de antemano a la terminal C de la cadena pesada de ALH-A2402. El ALH-A2402 purificado de cadena pesada y microglobulina $\beta 2$ se disuelven cada uno en urea 8 M. Se añaden a 200 ml de un tampón de replegamiento (pH 8,0; Tris-HCl 100 mM, L-arginina-HCl 400 mM, EDTA 2 mM, glutatión oxidado 0,5 mM, glutatión reducido 5 mM) 12 mg del péptido de la invención que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID n°: 1 (RYQLDPKFI), 18,6 mg de cadenas pesadas de ALH-A2402 y 13,2 mg de microglobulina $\beta 2$, cada una utilizando una jeringuilla con una aguja de calibre 27. La mezcla se agita en un baño a una temperatura mantenida a 10°C durante 48 a 72 horas para favorecer la formación de CHM. El tampón de replegamiento que contiene CHM se dializa posteriormente en un baño a una temperatura mantenida a 4°C durante 24 horas contra 1,8 l de agua destilada y el tampón de replegamiento dializado se concentra hasta 2 ml utilizando un Centriprep 10 (Millipore Corporation, Bedford MA). La elución de CHM con un peso molecular de aproximadamente 45 kD se aísla por cromatografía de filtración en gel utilizando Superdex 200 HR (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), produciendo de este modo el tetrámero de CHM deseado.

Para la preparación posterior de CHM biotilado, la biotina se une a un punto específico de un terminal C de la cadena pesada de ALH-A2402 utilizando biotina ligasa (AVIDITY, LLC, Denver CO). El CHM unido a biotina se purifica por cromatografía de filtración en gel utilizando Superdex 200 HR.

La estreptavidina marcada con péptido (Molecular Probe, Eugene OR) y el CHM biotilado purificado se mezclan a continuación en una proporción molar de 1 a 4 y el tetrámero CHM que contiene la secuencia de aminoácidos representada por la secuencia ID NO: 1 (RYQLDPKFI) que se eluyó con un peso molecular de aproximadamente 480 kD se aísla por cromatografía de filtración en gel utilizando Superdex 200 HR, se concentra hasta aproximadamente 3 mg/ml utilizando un Centricon 10 (Millipore Corporation) y se mantiene a 4°C. Pueden añadirse a esto conservantes tal como azida de sodio, EDTA, leupeptina y pepstatina.

En cada etapa de preparación mencionada anteriormente, es deseable purificar las proteínas y péptidos para utilizarse por métodos conocidos tales como cromatografía de filtración en gel.

El CHM de la invención puede utilizarse como vacuna contra el cáncer. Además, puede utilizarse para producir epiteliales los LTC específicos para el cáncer y para la cuantificación de dichos LTC en sangre periférica humana.

(VIII) Vacuna contra el cáncer, inductor de LTC y terapia génica

Vacuna contra el cáncer e inductor de LTC.

El péptido de la presente invención se puede utilizar ventajosamente como principio activo de una vacuna contra el cáncer para la utilización en una inmunoterapia pasiva con una vacuna. Esta vacuna contra el cáncer es utilizable en seres humanos que tienen ALH-A2402.

Es decir, la administración del péptido de la presente invención a un paciente de cáncer con ALH-A2402 como antígeno leucocitario induce o activa los LTC con restricción por ALH-A2402 que reconocen específicamente a Ep-CAM, permitiendo de este modo tratar o mejorar cánceres epiteliales y enfermedades similares.

Puesto que los LTC en pacientes con cáncer son un grupo de células que reconoce dos o más antígenos tumorales, la utilización de múltiples tipos de péptidos epítopos como vacuna contra el cáncer a veces tiene un mayor efecto que la utilización de un único tipo de péptido epítópico. Por lo tanto, los péptidos de la invención se pueden utilizar solos o en combinación de varios tipos (dos o más).

El ARNm de Ep-CAM que contiene el péptido de la invención se expresa en estirpes celulares de cáncer de pulmón (QG56, LU99, LC99A, LC1-sq, LC65A y PC-9), estirpes celulares de cáncer de intestino grueso, estirpes celulares de cáncer gástrico (MKN28, MKN45), estirpes celulares de cáncer bucal (HSC-2), estirpes celulares de cáncer de mama, estirpes celulares de leucemia (K562), etc. La expresión de Ep-CAM se observa también en tejidos procedentes de pacientes con cánceres de pulmón, cánceres de intestino grueso, cánceres gástricos, cánceres de

mama o de cánceres bucales. Por lo tanto, el péptido de la presente invención es útil para tratar o mejorar dichos cánceres.

El péptido de la invención, solo o en combinación con vehículos diferentes, se puede elaborar en un preparado. El preparado puede estar en forma oral o parenteral. En general, es preferible una forma parenteral. Los ejemplos de preparados parenterales incluyen inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares, inyecciones intravenosas, supositorios, etc.

Los preparados orales se pueden obtener utilizando excipientes farmacológicamente aceptables que no inhiben la actividad del péptido epítipo de la invención. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen almidón, manitol, lactosa, estearato de magnesio, celulosa, aminoácidos polimerizados, albúmina, etc.

Los preparados parenterales se pueden obtener utilizando vehículos farmacológicamente aceptables que no inhiben la actividad del péptido epítipo de la presente invención. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen agua, cloruro de sodio, dextrosa, etanol, glicerol, DMSO, etc. Los preparados parenterales pueden contener además albúmina, agentes humectantes, emulsionantes, etc. según sea necesario. Para estimular la inmunidad mediada por células, el péptido epítipo se utiliza preferentemente en combinación con un adyuvante adecuado. El péptido de la invención puede utilizarse en forma neutra o salina. Los ejemplos de sales farmacológicamente aceptables incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, etc. y sales de ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido tartárico, etc.

La actividad del péptido de la invención puede ajustarse formulando el péptido junto con compuestos que, por sí mismos o por interacción con ALH-A2402, mejoran el reconocimiento del péptido por los LTC, anticuerpos que reconocen inmunológicamente el péptido y/o similares.

Las células presentadoras de antígeno y los complejos de antígenos de histocompatibilidad mayor pulsados con el péptido de la presente invención también pueden utilizarse provechosamente como vacunas contra el cáncer. La forma de preparación, los pacientes destinatarios, los cánceres destinatarios, los efectos y similares, de dichas vacunas son los mismos que para vacunas contra el cáncer que comprenden el péptido de la presente invención.

Procedimiento de tratamiento

El péptido, la célula presentadora de antígeno y el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de la presente invención, cuando se administran a seres humanos con ALH-A2402 como antígeno leucocitario, inducen o activar los LTC con restricción por ALH-A2402 específicos para Ep-CAM para tratar de este modo o mejorar cánceres epiteliales.

La posología del péptido de la presente invención varía dependiendo del grado de reconocimiento del péptido por LTC y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg y preferentemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg, referida al péptido epítipo activo por día para un adulto humano. Los intervalos de dosis se puede seleccionar adecuadamente para cada paciente dependiendo de la intención de la administración.

Alternativamente, la vacunación eficaz contra el cáncer se puede conseguir introduciendo, en la circulación de la sangre del paciente, una fracción de células mononucleares que se ha separado de la sangre periférica del paciente y se cultiva junto con el péptido de la presente invención para inducir y/o activar los LTC. Pueden seleccionarse las condiciones de cultivo, tales como las concentraciones de células mononucleares y el péptido de la invención, a fin de permitir la administración de 10^8 a 10^{10} LTC/día para un adulto humano. Dichas condiciones pueden determinarse fácilmente mediante pruebas sencillas. Pueden añadirse durante el cultivo sustancias con capacidad de multiplicación de linfocitos, tales como interleucina-2.

La dosis de células presentadoras de antígeno es, por ejemplo, de aproximadamente 10^6 a 10^9 células/día y preferentemente de 10^7 a 10^8 células/día, para una persona adulta. La vacunación eficaz contra el cáncer también se puede conseguir mediante la introducción, en la circulación de la sangre del paciente, de un cultivo conjunto de una fracción de células mononucleares extraídas de la sangre periférica del paciente con las células presentadoras de antígeno de la presente invención.

La posología del complejo antigénico de histocompatibilidad es, por ejemplo, de 1 a 100 mg/día y preferentemente de 5 a 50 mg/día, para una persona adulta. Además, la vacunación eficaz contra el cáncer se puede conseguir mediante la introducción, en la circulación de la sangre del paciente, de un cultivo conjunto de una fracción de células mononucleares extraídas de la sangre periférica del paciente con el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de la invención.

Medicamento de terapia génica para cánceres

El polinucleótido de la presente invención (que comprende la cadena complementaria) es útil como medicamento de

terapia génica para, por ejemplo, cánceres de pulmón, cánceres de intestino grueso, cánceres gástricos, cánceres de mama, cánceres bucales, etc.

Para la terapia del cáncer, un vector que contiene el polinucleótido de la invención se puede introducir directamente en el cuerpo, o se puede introducir en las células recolectadas de un ser humano, devolviéndose a continuación las células al cuerpo. El vector no está restringido y puede seleccionarse de los conocidos por ser utilizables para la terapia génica, tales como retrovirus, adenovirus, virus de la vacuna, etc., entre los que son preferidos los retrovirus. Dichos virus son de replicación defectuosa.

El polinucleótido de la presente invención se pueden introducir en las células por técnicas de microinyección en las que se encapsula el polinucleótido en un liposoma y se transfiere.

Por lo tanto, el medicamento de terapia génica contra el cáncer de la invención puede estar en cualquier forma: el polinucleótido de la invención solo, un vector recombinante que contiene el polinucleótido de la invención, un liposoma que encapsula el polinucleótido de la invención, etc.

La dosis del polinucleótido de la invención varía dependiendo del grado de reconocimiento, por los LTC, del péptido codificado por el polinucleótido. Por ejemplo, una dosis adecuada para una persona adulta es, referida a la cantidad de la porción de polinucleótido que codifica el péptido epítipo de la invención, de aproximadamente 0,1 g a 100 mg/día y preferentemente de aproximadamente 1 g a 50 mg/día. Dicha dosis puede administrarse una vez cada pocos días a una vez cada varios meses.

El polinucleótido de la invención se puede utilizar en combinación con una citocina, tal como IL-2, o una sustancia que interactúa con el polinucleótido de la invención para mejorar así la expresión del polinucleótido.

(IX) Linfocitos T citotóxico

El linfocito T citotóxico de la presente invención se obtiene mediante la estimulación de linfocitos de sangre periférica utilizando al menos uno de entre (a) a (d) siguientes:

(a) péptido de la invención,

(b) célula presentadora de antígeno de la invención,

(c) complejo antigénico de histocompatibilidad mayor de la invención y

(d) complejo antigénico tetramero de histocompatibilidad mayor de la invención.

Los LTC de la invención se inducen al cultivar linfocitos de sangre periférica junto con por lo menos uno de entre (a) a (d) en medio RPMI1640 que contiene suero humano preferentemente, a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 7 a 14 días. Cuando los linfocitos de sangre periférica son estimulados con el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor (en adelante, "CHM") o uno de sus tetrameros, el LTC se induce y se combina con el CHM o tetramero. Así, el LTC se separa del CHM o tetramero por un procedimiento adecuado.

Específicamente, el LTC se pueden obtener, por ejemplo, por el procedimiento de preparación siguiente.

Al estimular con el péptido epítipo o células presentadoras de antígeno

Los linfocitos extraídos de la sangre periférica se cultivan junto con el péptido de la invención o las células presentadoras de antígeno pulsadas con el péptido, en una incubadora con dióxido de carbono a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 7 a 10 días. A continuación, preferentemente después de la adición de IL-2, PHA, anticuerpo anti-CD3 o similares, la incubación se realiza durante aproximadamente 7 a 14 días para estimular con ello y multiplicar los LTC.

La estimulación con el péptido o las células presentadoras de antígeno, opcionalmente seguida de la estimulación con IL-2 o similar, se lleva a cabo unas tres veces para obtener de ese modo el número requerido de LTC.

Los LTC específicos para el cáncer epitelial obtenidos de este modo se pueden utilizar, por ejemplo, en forma de suspensión en PBS que contiene albúmina humana o similar, como medicamento de inmunoterapia pasiva para el cáncer epitelial o similar. La forma del medicamento de inmunoterapia pasiva suele ser una inyección, tal como una inyección intramuscular, una inyección subcutánea, una inyección intravenosa o similares.

Cuando se estimula con CHM o tetramero del mismo

<Aislamiento por tinción>

Los linfocitos se separan de la sangre periférica o similar y se hacen reaccionar con una concentración adecuada de CHM o tetrámero CHM a aproximadamente 4 a 25°C durante aproximadamente 30 a 60 minutos, en PBS, por ejemplo. Un colorante de marcaje, tal como FITC o PE, se añade a la mezcla de reacción para teñir los LTC unidos al CHM o al tetrámero CHM. Posteriormente, los LTC teñidos se aíslan utilizando un citómetro de flujo o un microscopio.

< Aislamiento por inmovilización de CHM>

Utilizando una placa estéril con CHM o tetrámero de CHM inmovilizado en su superficie, linfocitos extraídos de la sangre periférica se hacen reaccionar con el CHM inmovilizado o tetrámero de CHM en la placa a aproximadamente 4 a 25°C durante aproximadamente 30 a 60 minutos. Tras eliminar por lavado otras células, que no está unidas y flotando, los LTC epiteliales específicos del cáncer que permanecen en la placa se ponen en suspensión en un medio nuevo. Los LTC epiteliales específicos del cáncer aislados de este modo pueden estimularse con un estimulante de linfocitos T, tal como anticuerpo anti-CD3, PHA, IL-2 o similares, para multiplicar los LTC en un número necesario para su utilización como medicamento de inmunoterapia pasiva.

<Utilización de perlas magnéticas>

El CHM biotinilado preparado como se ha descrito anteriormente se une a perlas magnéticas marcadas con estreptavidina para preparar un conjugado (denominado en adelante "CHM-perlas magnéticas"). Posteriormente, se separan los linfocitos de la sangre periférica o similar y los CHM-perlas magnéticas se añaden a una concentración adecuada para que la proporción linfocito:perla resulte 1:5-20, seguido de reacción.

Cuando el tubo de ensayo que contiene los LTC epiteliales específicos del cáncer unidos a los CHM-perlas magnéticas, se coloca en un campo magnético, los LTC unidos a las perlas son atraídos a la pared interna del tubo de ensayo en el lado del imán.

Con los LTC unidos a las perlas que se adhieren a la pared interna del tubo de ensayo, otras células se retiran por lavado. A continuación, el tubo de ensayo se retira del campo magnético y los LTC específicos de antígeno que permanecen en el tubo de ensayo se ponen en suspensión en un nuevo medio.

Los LTC epiteliales específicos del cáncer aislados de este modo pueden estimularse con un estimulante de linfocitos T, tal como un anticuerpo anti-CD3, PHA, IL-2 o similares, para de ese modo la multiplicar los LTC en un número necesario para su utilización como medicamento de inmunoterapia pasiva.

<Método para tratar o mejorar cánceres>

Los LTC de la invención, cuando se administran a un paciente con cáncer epitelial como medicamento de inmunoterapia pasiva, pueden tratar o mejorar el cáncer.

La dosis varía entre los pacientes en función de la finalidad de la administración. Por ejemplo, una dosis adecuada para una persona adulta es de aproximadamente 10^7 a 10^{11} células/día y preferentemente de aproximadamente 10^8 a 10^{10} células/día. Dicha dosis puede administrarse desde una vez cada pocos días a una vez cada varios meses.

(X) Procedimiento para la cuantificación de LTC

En la gestión de la terapia del cáncer, incluyendo la utilización apropiada de medicamentos contra el cáncer y medicamentos de quimioterapia, es importante saber si los LTC específicos para el cáncer epitelial están presentes en la sangre periférica de pacientes con cáncer de alto riesgo (pacientes con inmunidad disminuida causada por las células o tejidos cancerosos de cáncer, pacientes con complicaciones, pacientes ancianos, pacientes infantiles, pacientes embarazadas). Los LTC con restricción por ALH-A2402 específicos del cáncer epitelial pueden cuantificarse por el siguiente procedimiento.

Un procedimiento que comprende las etapas que consisten en producir una cualquiera de (a) a (d) siguientes para actuar en una muestra de sangre periférica y cuantificar los LTC o la(s) citocina(s) producida(s) de este modo en la muestra:

(a) péptido de la invención,

(b) célula presentadora de antígeno de la invención,

(c) del CHM de la invención y

(d) tetrámero CHM de la invención.

El valor obtenido se compara con un valor cuantificado por el mismo procedimiento, excepto para la utilización de

una solución que contiene LTC con restricción por ALH-A2402 a una concentración conocida, calculando de este modo la concentración de LTC con restricción por ALH-A2402 de la muestra de sangre periférica.

5 Los LTC con restricción por ALH-A2402 inducidos por uno o más de (a) a (d) o la(s) citocina(s) producidas por los LTC pueden cuantificarse, por ejemplo de la forma siguiente.

Cuando se utiliza péptido epitópico

10 Los linfocitos aislados de la sangre periférica se estimulan con el péptido de la invención y se mide el número de LTC inducidos o la cantidad de citocina(s) (que comprende quimiocinas), tales como el interferón- γ (IFN- γ), interleucina o similares, producidos por los LTC. Un método específico se describe a continuación, tomando el caso de IFN- γ como ejemplo.

15 <Cuantificación de células productoras de IFN- γ intracelular>

20 Linfocitos aislados de la sangre periférica se ponen en suspensión en medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero humano a una concentración celular de 2×10^6 /ml y el péptido epítipo de LTC de la invención se añade a una concentración de 1 mg/ml. Además, se añade un inhibidor de la proteína de transporte intracelular, tal como Brefeldin A, seguido de cultivo en una incubadora con dióxido de carbono a 37°C durante 5 a 6 horas. Después del cultivo, las células se inmovilizan, se someten a tratamiento de permeabilización de membrana y se hacen reaccionar con un anticuerpo anti-IFN- γ marcado fluorescente. Las células positivas a IFN- γ en linfocitos positivos a CD8 se cuantifican utilizando un citómetro de flujo o similar.

25 <Cuantificación de células positivas a CD8>

Las células positivas a CD8 marcadas se puede cuantificar siguiendo el procedimiento anterior de cuantificación de células productoras de IFN- γ intracelular excepto para la utilización de un anticuerpo anti-CD8 en lugar del anticuerpo anti-IFN- γ marcado fluorescente.

30 < Cuantificación de citocina(s) (ensayo ELISPOT)>

35 Una placa MultiScreen-HA (Millipore) de 96 pocillos se recubre durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-IFN monoclonal. Después de lavar los pocillos con PBS, linfocitos aislados de la sangre periférica se inoculan en los pocillos. El péptido epítipo se coloca en los pocillos y se cultiva en una incubadora con CO₂ al 5% a 37°C durante 20 horas. Al día siguiente, la placa se lava con PBS que contiene Tween-20 al 0,05% y se hace reaccionar a temperatura ambiente con suero de conejo anti-IFN- γ durante 90 minutos y a continuación con suero de cabra con IgG anti-conejo marcado con peroxidasa durante 90 minutos. Además, tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) que contiene 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma) y solución al 0,015% de peróxido de hidrógeno se coloca en los pocillos y se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se observan las manchas de IFN- γ y se hace el recuento con un microscopio estereoscópico.

<Método de cuantificación de citocina(s) segregada(s) en sobrenadante de cultivo>

45 Los linfocitos aislados de sangre periférica se ponen en suspensión en medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero humano, a una concentración celular de 2×10^6 células/ml y el péptido epítipo de LTC de la invención se añade a una concentración de 1 μ g/ml. El cultivo se realiza en una incubadora con dióxido de carbono a 37°C durante 24 a 48 horas. Después del cultivo, se recoge el sobrenadante y se mide la concentración de IFN- γ en el sobrenadante utilizando un kit ELISA disponible en el mercado (por ejemplo, HUMAN IFN gamma ELISA de Endogen).

50 Cuando se utiliza tetrámero CHM

55 Se separan linfocitos de la sangre periférica o similar y se hace reaccionar con tetrámero CHM (marcado con fluorescencia con estreptavidina) a una concentración de 1 a 100 μ g/m, a 37°C durante 15 minutos. Los LTC unidos a CHM se tiñen añadiendo un anticuerpo que se une al LTC unido a CHM, estando el anticuerpo marcado con otro colorante fluorescente. Los LTC teñidos pueden contarse utilizando un citómetro de flujo o un microscopio.

Ejemplos

60 En adelante, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos, pero sin limitarse a los mismos.

Ejemplo 1

65 1) Donantes y estirpes celulares

Todos los donantes fueron informados completamente del programa de investigación y su propósito aprobado por el Ethics Committee del Aichi Cancer Center. Las muestras de sangre periférica para las pruebas se extrajeron de cinco donantes sanos positivos a ALH-A2402 después de consentimiento informado. De las muestras de sangre periférica extraídas de cada donante, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación con gradiente de densidad Ficoll.

Una estirpe celular LU 99 de carcinoma de células grandes (JCRB0080) como estirpe celular de cáncer de pulmón humano; una estirpe celular HSC-2 de carcinoma epidermoide humano (JCRB0622), estirpes celulares MKN28 de carcinoma epidermoide (JCRB0253) y MKN45 (JCRB0254) como estirpe celular de cáncer gástrico humano y una estirpe celular de carcinoma epidermoide COL0320DM (JCRB0225 o ATCC: CCL -220) como estirpe celular de cáncer colorrectal humano se adquirieron en el banco de células JCRB (Ministry of Health, Labour and Welfare: <http://Cellbank.nih.go.jp>). Una estirpe celular de carcinoma epidermoide LC-1/sq (RCB0455) como estirpe celular de cáncer de pulmón humano se adquirió en el banco de células Riken.

Las células LC/sq se mantuvieron en un medio de cultivo RPMI 1640 al 45% y un medio de cultivo F12 de Ham al 45% (producto de Sigma), que se preparó añadiendo un complemento nutritivo líquido, que comprende FCS al 10%, L-glutamina, penicilina, estreptomycin y kanamicina. Las células COL0320DM y MKN28 se mantuvieron en un medio de cultivo DMEM (producto de Sigma). Las células K562 se mantuvieron en un medio de cultivo IMDM (producto de Sigma), que se preparó añadiendo un complemento nutritivo líquido, que comprende FCS al 10% (suero de ternera fetal, producto de Life Technology), L-glutamina, penicilina, estreptomycin y kanamicina.

Se cultivaron otras estirpes celulares de cáncer en un medio de cultivo RPMI 1640, que se preparó añadiendo un complemento nutritivo líquido, que comprende FCS al 10%, L-glutamina 2×10^{-3} M, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml de kanamicina y β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M (como medio completo).

El gen ALH-A2402 se introdujo en 174CEM.T2 (en lo sucesivo denominada "célula T2"), proporcionando células que presentan un péptido ALH-A2402 de unión (denominada en adelante "célula T2-24") como células presentadoras de péptido. Se cultivaron linfocitos T2-24 en un medio de cultivo IMDM (medio de Dulbecco modificado por Iscove: producto de Gibco) que contiene de suero de ternera fetal al 10%, L-glutamina, penicilina, estreptomycin y G418 (producto de GIBCO).

Según el procedimiento descrito en Tissue Antigens, 59:502-511, (2002), una estirpe celular QG56 negativa a ALH-A2402 y una estirpe celular A549 negativa a ALH-A2402 (JCRB0076) se infectaron con retrovirus que codifican a ALH-A2402. A fin de detectar las células infectadas, las células QG56 infectadas se mantuvieron en un medio completo que contenía puromicina con una concentración final de 0,6 µg/ml y se denominaron QG56-A24. De manera similar, las células A549 infectadas se mantuvieron en un medio completo que contenía puromicina con una concentración final de 0,9 g/ml y se denominaron A549-A24.

2) Síntesis de péptidos

Los potenciales péptidos de unión a ALH-A2402 dentro de Ep-CAM (número de registro: M33011) fueron identificados por predicción informática según el HLA Peptide Binding Prediction Program basado en la disociación estimada en la mitad del tiempo de los complejos del péptido ALH disponible en la página de Internet Bioinformatics & Molecule Analysis Section (BIMAS: Bioinformatics and molecular analysis section) (http://bimas.dcr.gov/molbio/hla_bind).

Siete péptidos seleccionados basándose en los resultados de predicción del péptido epítipo Ep-CAM fueron sintetizados por PepSet (producto de Mimotope). A medida que era necesario, los resultantes se disolvieron en 100 µl de sulfóxido de dimetilo y se diluyeron además a 0,1 M (pH 7,4) en acetonitrilo al 40%.

La cantidad de producción de cada péptido se estimó que era 1 µmol.

Los siete péptidos sintéticos se denominaron Ep31, Ep173, Ep185, Ep250, Ep225, Ep296 y Ep304, respectivamente. La Tabla 1 muestra las secuencias de péptidos sintetizados de los levas EP-CAM.

Tabla 1

Denominación del péptido	Secuencia de aminoácidos	Posiciones de los aminoácidos	Longitud de los aminoácidos	Puntuación ^a	% aumento de IFM ^b
Ep ₃₁	NYKLAVNCF	31-39	9	120	85
Ep ₁₇₃	RYQLDPKR	173-181	9	150	102
Ep ₁₈₅	LYENNVITI	185-193	9	75	79
Ep ₂₂₅	LFHSKKMDL	225-233	9	20	29
Ep ₂₅₀	YYVDEKAPEF	250-259	10	198	57
Ep ₂₉₆	KYEKAEIKEM	296-305	10	83	24
Ep ₃₀₄	EMGEMHREL	304-312	9	5	16

Notas:

^a: Medio tiempo de disociación estimado de las moléculas ALH-A24 (minutos), obtenido accediendo a la página de Internet Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) HLA Peptide Binding Predictions

^b: Se evaluaron los péptidos sintéticos por su actividad de unión a moléculas ALH-A24 basándose en un ensayo de estabilización de CHM. % IFM significa intensidad de fluorescencia media.

Por otra parte, el péptido RYL RDQQLL (denominado ENV584, *J. Immunol.*, 159:6242-6252, 1997: restos 584-592) de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) y el péptido 2 de la proteína de la membrana latente EBV (membrana latente EBV) (denominado EBV-LMP419, *J. Immunol.*, 158:3325-3334, 1997: restos 419-427) se sintetizaron como referencias (Toray Industries research center company).

3) Tinción celular y un análisis de citometría de flujo

El análisis se realizó utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal contra ALH-A2402 expresado en la superficie celular (producto de One Lambda, Inc.) y fragmentos de anti-IgG(ab')₂ de ratón marcados con FITC (producto de Immunotech). Se preparó tetrámero de CHM/péptido según el procedimiento descrito en "*Blood*, 98:1872 - 1881, 2001, *Science*, 274:94 - 96, 1996".

La estirpe de linfocitos T positivos a CD8 o su clon se tiñeron con (ficoeritrina: péptido) péptido Ep-CAM que contiene tetrámero ALH-A2402 marcado con ficoeritrina y Ep173 (denominado tetrámero ALH-A2402/Ep173), o que contiene el péptido del VIH-1 y ENV584 (denominado tetrámero ALH-A2402/ENV584).

El análisis de citometría de flujo de la célula teñida se llevó a cabo utilizando FACSCalibur (producto de Becton, Dickinson and Company) y los datos se analizaron utilizando el programa informático CellQuest (producto de Becton, Dickinson and Company).

Ensayo de estabilización de CHM

Para la evaluación de la eficacia de unión de ALH-A2402 de los péptidos sintéticos, se llevó a cabo un ensayo de estabilización de CHM utilizando linfocitos T2-A24 (estirpe celular en la que el plásmido que expresa moléculas ALH-A2402 se transfeció a T2 [174xCEM.T2: número de registro en ATCC: CRL-1992]) según el procedimiento de Kuzushima *et al.* (*Blood*, 98:1872 - 1881, 2001).

Para ser específico, cada péptido con una concentración de 10 µM se incubó a 26°C durante 16 horas en un medio de cultivo RPMI1640 200µl que contenía linfocitos T2-A24 (2x10⁵ células), FCS al 0,1% y β-mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M, seguido de otra incubación a 37°C durante 3 horas. Después de la incubación, las moléculas ALH-A2402 de la superficie celular se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-ALH-A2402 y el anticuerpo marcado con FITC de (3) anterior. El nivel de expresión se determinó por FACSCalibur y se registró la intensidad de fluorescencia media (IFM).

El aumento de % de IFM se calculó por la fórmula siguiente:

aumento de % de IFM = 100 x (IFM del grupo administrado con péptido - IFM del grupo no administrado con péptido) / (IFM del grupo no administrado con péptido).

La Tabla 1 muestra los resultados relativos a los incrementos de nivel en % de IFM. Como se muestra en la Tabla 1, el nivel de expresión de ALH-A2402 en la superficie celular se incrementó en la mayoría de los péptidos, lo que demuestra que estos péptidos se unen a la superficie de la célula y por lo tanto CHM está estabilizado.

En particular, entre los péptidos anteriores, Ep173 (RYQLDPKFI) presentó la mayor afinidad por la molécula ALH-A2402. Ep304 (EMGEMHREL), que presentó la menor afinidad, no se sometió a experimentos posteriores.

5) Producción del péptido Ep-CAM específico para LTC y clones del mismo

Se produjeron dendrocitos (DC) derivados de monocitos de la sangre periférica según la procedimiento de Dauer *et al.* (*J. Immunol.*, 170:4069-4076).

Más específicamente, las células adherentes al plástico se aislaron de las células mononucleares de la sangre periférica de voluntarios sanos positivos a ALH-A2402 y se cultivaron en un medio RPMI1640 que contenía un 5% de suero sanguíneo humano inactivado por calor, 10 µg/ml de interleucina-4 humana recombinante (hIL-4, producto de R & D systems company) y 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos/humano recombinante (hGM-CSF, producto de R & D systems company). Después de un día de incubación, 50 ng/ml de IL-1β (producto de PeproTech, Inc.), se añadieron 50 ng/ml de factor α de necrosis tumoral/recombinante humano (hFNT-α: producto de PeproTech, Inc.) y prostaglandina E2 1 M (producto de Cayman Chemical Company) para el crecimiento celular. Transcurridos 2 ó 3 días, se recogieron las células para su utilización en unos dendrocitos procedentes de monocitos para la presentación de antígenos.

Las células producidas expresaban aparentemente antígenos mediados por dendrocitos tales como CD1a, CD80, CD83, CD86 y moléculas ALH de clase II.

Por otra parte, utilizando microperlas CD8 (producto de Milteny Biotec), se aislaron linfocitos T positivos a CD8 de los mismos donantes.

Posteriormente, los dendrocitos autoderivados se pulsaron a temperatura ambiente durante 2 a 4 horas con cada uno de los péptidos de síntesis Ep-CAM con una concentración de 10 µM en un medio de cultivo AIM-V (producto de Gibco) que contenía β-mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M, seguido de irradiación (33 Gy).

Los dendrocitos (1x10⁵ células) se cultivaron a continuación en un tubo de cultivo junto con linfocitos T positivos a CD8 (1x10⁶ linfocitos) en un medio de cultivo RPMI 1640 que contenía suero de sangre humana al 10%, 25 ng/ml de IL-7 humana recombinante (producto de R & D systems company) y 5 ng/ml de IL-12 recombinante humana (producto de R & D systems company).

Después de siete días de cultivo, las células se estimularon añadiendo 1x10⁵ dendrocitos auto-derivados pulsados con péptidos preparados como anteriormente. Después de otros siete días de cultivo, las células se estimularon 3 veces por el mismo procedimiento. Después de cada reestimulación, se añadía IL-2 recombinante humana (producto de Takeda Pharmaceutical Company, Ltd.) para proporcionar una concentración final de 20 unidades/ml. Las células que proliferan activamente se dividieron en 2 ó 3 tubos según era necesario y se cultivaron en un medio de cultivo reciente que contenía 20 unidades/ml de IL-2.

La especificidad de los linfocitos T se examinó por el ensayo ELISPOT.

Con el fin de crear clones de linfocitos T, se realizó una dilución restringida de LTC policlonal según el procedimiento descrito en *Blood*, 98:1872-1881 y 2001. Más específicamente, linfocitos T positivos a CD8 policlonales se sembraron en una placa circular de 96 pocillos (1, 3 y 10 células/pocillo) que contenía un medio de cultivo (0,2 ml), junto con anticuerpos monoclonales anti-CD3 (30 ng/ml), producto de Orth Diagnostic Inc., IL-2 (50 U/ml), 1x10⁵ células de PBMC irradiadas con γ (33 Gy) y 2x10⁴ células de linfoblastos B irradiadas con γ (55 Gy) transformadas por EBV (células obtenidas transformando linfocitos B de sangre periférica de voluntarios con un sobrenadante de células 95.8 (JCRB9123)).

Después de dos semanas de incubación, se determinó la especificidad de las células multiplicadas por un ensayo destructivo LTC-LTC de la misma manera que en el procedimiento de Lee *et al.* (*J. Immunol.*, 158:3325-3334, 1997).

Los clones de LTC se incubaron durante la noche sólo en 100 µl de un medio de cultivo completo o en una placa circular de 96 pocillos (300 células/pocillo) que contenía péptido del mismo origen procedente de Ep-CAM o péptido ENV584 de referencia a una concentración final de 2 µM.

La capacidad de destrucción celular de las células LTC se determinó al día siguiente utilizando un microscopio invertido. Estos clones que presentan capacidades para la muerte celular sólo cuando se pulsaban con Ep-CAM se trasladaron a un matraz y se multiplicaron como se describió anteriormente.

6) Ensayo ELISPOT de IFN-γ

Una placa de fondo plano de 96 pocillos MultiScreen-HA (producto de Millipore Corp.) con una película de nitrato de celulosa se revistió con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ (producto de R & D Systems Company) y se incubó a 4°C durante la noche. Después de lavar con PBS (solución salina tamponada con fosfato), la placa se bloqueó con medio de cultivo a 37°C durante 1 hora. En cada pocillo de la placa, linfocitos T2-A24 (5x10⁴ células) se

pulsaron con cada péptido epítipo sintético experimental en 100 µl de medio RPMI1640 que contenía FCS al 0,1% con y β-mercaptoetanol 5×10^{-5} M a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se sembraron en cada pocillo 1×10^5 linfocitos T positivos a CD8 en suspensión en el medio que contenía FCS al 20%.

- 5 Se utilizaron como células que responden al tratamiento 1×10^4 linfocitos T positivos a CD8 cuando debían contarse demasiadas manchas. El proceso de medición se realizó por duplicado.

La placa se incubó a 37°C durante 20 horas en una incubadora con CO₂ al 5% y se lavó a fondo con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%. Posteriormente, un anticuerpo policlonal de conejo anti-IFN (producto de Genzyme) se
10 añadió a cada pocillo, se dejó a temperatura ambiente durante 90 minutos y a continuación se expuso a anti-inmunoglobulina G anti-conejo en oveja conjugado con peroxidasa (producto de Genzyme) durante 90 minutos más. Para la observación de manchas específicas para IFN se añadió a cada pocillo, tampón acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0) que contenía 3-amino-9-etilcarbazol (producto de Sigma) y solución al 0,015% de peróxido de hidrógeno. Después de 40 minutos, se interrumpió la reacción mediante lavado con agua y se secó la placa. El
15 número de manchas difusas grandes se contó al microscopio.

Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2.

La figura 1 muestra los resultados de la evaluación del ensayo ELISOT de las estirpes de linfocitos citotóxicos activados con péptidos policlonales cuando los linfocitos T positivos a CD8 de cinco donantes sanos positivos a ALH-A2402 se estimularon con dendrocitos autoderivados pulsados con uno de cada uno de los seis péptidos.

Como se puede observar en la figura 1, cuando los linfocitos T positivos a CD8 de cinco donantes sanos positivos a ALH-A2402 se estimularon con los dendrocitos autoderivados pulsados por cada uno de los seis péptidos, las
25 estirpes de linfocitos T obtenidas de los cuatro donantes presentaban una producción predominante de manchas de IFN-γ por incubación con linfocitos T2-A24 pulsados por Ep173.

La estirpe de LTC sometida a estimulación por Ep250 obtenida del donante nº 3 produjo específicamente manchas de IFN-γ y por incubación con Ep250.

La figura 2 muestra los resultados de la tinción con tetrámero del péptido Ep-CAM específico para LTC policlonales y monoclonales.

La figura 2A muestra que los linfocitos T policlonales positivos a CD8 estimulados 4 veces con Ep173 se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 marcado con FITC, tetrámero ALH-A24 que contiene Ep173 marcado con PE, o un péptido ENV584 de referencia y se analizaron por citometría de flujo. La proporción de células de tetrámero positivas entre los linfocitos T totales positivos a CD8 se muestra en porcentaje en la parte superior derecha.

Como se muestra en la figura 2A, la formación de la mancha de IFN-γ no se observó en la mayoría de los péptidos de referencia, ENV584. Después de cuatro estimulaciones, las estirpes de LTC creadas a partir del donante nº 4 se tiñeron específicamente con el tetrámero ALH-A24/Ep173 pero no con el tetrámero ALH-A24/ENV584 (37,2%:0,06% con respecto a los linfocitos T totales positivos a CD8, Fig. 2A).

La figura 2B muestra que los clones de LTC (C27) específicos para Ep173, se tiñeron de la misma manera que anteriormente. La proporción de células positivas al tetrámero entre los linfocitos T positivos a CD8 se muestra en porcentaje en la parte superior derecha.

Como se muestra en la figura 2B, la intensidad de las células de tetrámero positivo era equivalente o superior a la de las células negativas al tetrámero 2 a 3 veces en una escala logarítmica. Se creó un clon de linfocitos T, C27 a partir del medio de cultivo de dilución restringida de la estirpe de LTC policlonal específica para Ep173 del donante nº 4.

Esta investigación que utiliza tetrámeros demuestra que tanto linfocitos T positivos a CD8 policlonales como monoclonales específicos para Ep173 tienen receptores celulares de gran afinidad específicos para complejos ALH-A2402/Ep173.

Por consiguiente, se crearon clones de LTC específicos para Ep173 a partir de esta estirpe de LTC.

Ejemplo 2

Propiedades de los clones de LTC específicos para el péptido Ep173, (parte 1 7) ENSAYO LTC

Se examinó además si C27 reconoce espontáneamente el péptido presentado en la superficie de las células tumorales en el contexto de ALH-A24.

Se incubaron células marcadas con cromo con anticuerpos monoclonales específicos para cualquiera de ALH

completo de clase I, ALH-A24, o ALH-A2 antes de la adición de C27 y el ensayo de LTC se realizó a una proporción de efector a diana de 10.

Las células diana (células PC9) se marcaron con cromo (^{51}Cr) en 100 μl de medio de cultivo a 37°C durante 1 hora. En algunos experimentos, para especificar la restricción de ALH, una cantidad predeterminada de anticuerpo W6/32 de bloqueo (anti-ALH de clase I), MA2.1 (anti-ALH-A2) y A11.1 (anti-ALH-A24) se añadió a cada pocillo 30 minutos antes de la adición de las células efectoras.

La placa se incubó a 37°C durante 4 horas y el sobrenadante se contó utilizando un contador- γ .

El porcentaje de liberación específica de ^{51}Cr se calculó según la fórmula: $100 \times (\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$.

Los resultados se muestran en las Figs. 3 y 5.

La Fig. 3A muestra la citotoxicidad de C27 (clones de LTC específicos para Ep173) contra T2-A24 en cada concentración indicada de péptido Ep173 y el péptido EBV-LMP419 de referencia determinado por ensayo de liberación de ^{51}Cr en una proporción de efector a diana de 1.

Por consiguiente, los clones de LTC (C27) específicos para Ep173 demostraron una citotoxicidad contra las linfocitos T2-A24 pulsados con Ep173 a una baja concentración de péptido de 100 pM, mientras que dicha citotoxicidad no se observó con EBV-LMP419 (péptido de referencia).

La Fig. 5 y la Tabla 2 muestran los resultados de la evaluación de la citotoxicidad de C27 frente a varias estirpes celulares de cáncer.

Tabla 2

	Origen	Ep-CAM RT-RCP	ALH-A24 (IFM ^b)
Cánceres de pulmón			+ (87,16)
Lu99	carcinoma de células grandes	+	+ (43,53)
PC9	adenocarcinoma	++	+ (73,67)
11-18	adenocarcinoma	-	+ (96,71)
LC99A	carcinoma de células grandes	+	- (3,67)
LC65A	carcinoma de células pequeñas	+	+ (70,56)
LC-1/sq	cáncer de células escamosas	+	- (3,21)
A549	adenocarcinoma	-	+ (109,73)
A549-A24	adenocarcinoma	N.D. ^b	- (2,65)
QG56	cáncer de células escamosas	+	+ (84,12)
QG56-A24	cáncer de células escamosas	N.D.	
Cánceres gástricos			
MKN28	adenocarcinoma	+	- (7,67)
MKN45	adenocarcinoma	+	+ (47,99)
Cánceres de colon			
COLO320 DM	adenocarcinoma	-	+ (35,35)
Otros tipos de cáncer			
HSC-2	cáncer oral de células escamosas	±	+ (34,40)
K562	leucemia	±	- (5,23)
T2-A24	célula híbrida BxT	-	+ (197,75)

Notas:

^a: La intensidad de fluorescencia media se evaluó por inmunofluorescencia utilizando fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos anti-IgG de ratón marcados con ALH-A24mAb y FITC.

^b: No realizado

La figura 2 muestra el resultado de la evaluación de la citotoxicidad de C27 (clon de LTC específico para Ep173) para ocho tipos de estirpes celulares de cáncer positivas a ALH-A24 y una estirpe celular negativa a ALH-A24 como células diana.

Todas las estirpes celulares expresaron Ep-CAM, excepto las estirpes celulares 11-18 de adenocarcinoma pulmonar, Colo320DM y A549. Los genes ALH-A2402 se transformaron como un retrovirus en A549 y QG56 y los transformantes denominados A549-A24 y A24-QG56 se utilizaron también como células diana. La citotoxicidad fue especificada por el ensayo de liberación de ^{51}Cr en cada relación efector:diana (40:1, 20:1, 10, 1, 5:1). La K562 es una estirpe celular típica sensible a las células destructoras naturales.

Como se muestra en la figura 5 y en la Tabla 2, C27 ejerce eficazmente toxicidad a las estirpes celulares de cáncer de pulmón PC9, LU99, LC-1/sq y LC99A; estirpe celular HSC-2 de carcinoma oral escamoso y estirpes celulares MKN45 de cáncer gástrico que expresan tanto ALH-A24 como Ep CAM. Sin embargo, C27 no demostró toxicidad contra estirpes de células positivas a ALH-A24 y negativas a Ep-CAM (A549-A24 y Colo320DM) o estirpes celulares negativas a ALH-A24 y positivas a Ep-CAM o estirpes celulares negativas a Ep-CAM (QG56, A549, MNK28). Cuando el gen ALH-A2402 se introdujo en la estirpe celular QG56 negativa a ALH-A24 (QG56-A24), C27 destruyó las células diana. La citotoxicidad para K562 fue baja.

Estos datos demostraron que el LTC específico para Ep173 destruye las células tumorales que expresan tanto ALH-A24 como Ep-CAM.

La Fig. 3B muestra el efecto inhibitorio de anticuerpos anti-ALH-A24 monoclonales sobre la citotoxicidad de clones de LTC (C27) específicos para Ep173 contra la estirpe celular positiva a ALH-A2402 (PC9).

La citotoxicidad de C27 contra PC9 como estirpe celular de cáncer de pulmón (estirpe celular de cáncer de pulmón positiva a ALH-A24 y positiva a Ep-CAM) fue bloqueada por anticuerpos monoclonales específicos para ALH-A24 o moléculas de clase I (W6/32) pero no fue bloqueada por anticuerpos anti-ALH-A2 monoclonales.

8) Ensayo de inhibición de la diana en frío

El ensayo de inhibición de la diana en frío se llevó a cabo según el método de Arai *et al.* (*Blood*, 97:2903-2907, 2001).

Se incubaron células T2-A24 con péptidos epítomos Ep173 o EBV LMP419 a una concentración final de 1×10^5 M durante 1 hora.

Después de varios lavados, las células resultantes se incubaron con 2×10^4 células efectoras durante 1 hora para producir una relación de células T2-A24 pulsadas con péptido a células diana de 40:1, 20:1, 10:1 y 5:1. Se añadieron a cada pocillo 2×10^3 estirpes celulares PC9 marcadas con ^{51}Cr .

La citotoxicidad se determinó como se describe en el apartado 7) con respecto a los ensayos de LTC.

La figura 3C muestra los resultados del ensayo de inhibición de la diana en frío.

En la figura 3C, la abscisa representa la relación en número de linfocitos T2-A24 (en frío) pulsados con Ep173 (●) o con péptido EBV-LMP419 de referencia (■) a células PC9 marcadas con cromo (en caliente). La ordenada representa la citotoxicidad de C27 contra PC9 en porcentaje. El círculo blanco muestra la citotoxicidad sin una diana en frío.

Como resultado, la citotoxicidad mediada por C27 contra PC9 fue inhibida específicamente por la presencia de linfocitos T2-A24 pulsados con Ep173, pero no fue inhibida por péptidos no relacionados.

Por lo tanto, la citotoxicidad mediada por C27 contra PC9 fue bloqueada por el anticuerpo anti-ALH-A24 monoclonal o por células diana pulsadas con Ep173 en frío. En consecuencia, se demuestra que los clones de LTC tienen una excelente especificidad para Ep173 presentadas espontáneamente en la superficie de las células tumorales.

Ejemplo 3

Propiedades de los clones de LTC específicos para el péptido Ep173, parte 2

9) RT-RCP

Todos los ARN se extrajeron de una estirpe celular cultivada utilizando el kit GenElute mRNA Miniprep (producto de Sigma). Se sintetizó cebador oligonucleotídico específico para el gen por Proligo (producto de Proligo Japan) para su utilización en la evaluación de la expresión en ARNm de Ep-CAM. Los cebadores para su utilización en RT-RCP fueron los siguientes:

Cebador directo: ATGGCGCCCCCGCAGGTCCT (SEC. ID. nº 8)

Cebador inverso: TTATGCATTGAGTTCCTATGCATCTCACC (SEC. ID. nº 9).

Se llevó a cabo RT-RCP utilizando un ciclador térmico (producto de Perkin-Elmer) y los productos de RCP se analizaron por electroforesis en gel al 1,5% y observación con bromuro de etidio.

Se llevó a cabo RCP por 1 ciclo de 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante un minuto y 1 ciclo de 72°C durante 7 minutos.

10) Análisis de transferencia Western

Se llevó a cabo el análisis de transferencia Western modificando ligeramente el procedimiento de Schwartz *et al.* (*J. Immunol.*, 165:768-778, 2000). Más específicamente, las células se disolvieron en una disolución tampón (Tris 50 mM/ácido clorhídrico, pH 7,5, cloruro de magnesio 5 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,5%, leupeptina 10 µM, pepstaína 2,8 µM y fluoruro de fenilmetanosulfonilo 0,85 mM) a 4°C durante 30 minutos. A fin de determinar la concentración de proteína, el sobrenadante de las células disuelto se cuantificó a una longitud de onda de 280/260 nm. Se añadió además 130 g de proteína a 12% SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon-P (producto de Millipore) y se bloquearon a 4°C durante la noche con PBS que contenía de leche en polvo baja en grasa seca al 100% y Tween 20 al 0,1%.

La búsqueda se llevó a cabo con un anticuerpo monoclonal específico para Ep-CAM (producto de LabVision) y la detección se llevó a cabo con anti-IgG de ratón en oveja conjugada con peroxidasa (producto de Zymed).

Las proteínas se observaron utilizando un sistema de detección ECL de transferencia Western (producto de Amersham Bio-sciences Company).

La figura 4 muestra los resultados del examen para la expresión de Ep-CAM de estirpes celulares de cáncer por RT-RCP y análisis de transferencia Western.

Doce estirpes (80%) de 15 tipos de estirpes celulares de cáncer expresaban aparentemente Ep-CAM. La expresión de ALH-A24 se examinó por análisis de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos anti-ALH-A24 monoclonales. Diez estirpes celulares entre las 15 estirpes celulares de cáncer examinadas presentaron expresión positivo de ALH-A24.

Como se demuestra por los ejemplos anteriores, se han obtenido nuevos epítomos con restricción por ALH-A2402 derivados de Ep-CAM. Al menos el péptido epitópico, Ep173, (RYQLDPKFI; SEC. ID. nº 1) es capaz de inducir LTC incluyendo un receptor de linfocitos T de alta afinidad específico para el complejo ALH-A2402/péptido y por lo tanto puede esperarse la inmunoterapia que utiliza este péptido.

Aplicabilidad industrial

Los péptidos de la invención pueden utilizarse adecuadamente como vacuna contra el cáncer para una amplia gama de carcinomas humanos que contienen ALH-A2402.

Listado de secuencias

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> péptido epítomo que es reconocido por LTC específico para Ep-CAM y con restricción por ALH-A2402

<130> 8132003JP

<150> JP 2004-11752

<151> 2004-01-20

<160> 11

<170> Patente en versión 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido epítomo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

<400> 1
Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
 1 5

5
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

10
 <400> 2
Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe
 1 5 10

15
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

20
 <400> 3
Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe
 1 5

25
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

30
 <400> 4
Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile
 1 5

35
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

40
 <400> 5
Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu
 1 5

45
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

50
 <400> 6
Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu Met
 1 5 10

55
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A2402

<400> 7
Glu Met Gly Glu Met His Arg Glu Leu
1 5

5 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido utilizado como cebador de RCP

10 <400> 8
 atggcgcccc cgcaggctct 20

15 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido utilizado como cebador de RCP

20 <400> 9
 ttatgcattg agttccctat gcattctacc 30

25 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido utilizado como cebador de RCP

30 <400> 10
 cgttatcaac tggatccaaa atttatc 27

35 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido utilizado como cebador de RCP

40 <400> 11
 tattatgttg atgaaaaagc acctgaattc 30

45 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido epítipo Ep-CAM experimental que puede inducir LTC con restricción por ALH-A0201

50 <400> 12
Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Péptido de cualquiera de (1) o (2):

- 5 (1) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 1,
 (2) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEC. ID. nº 2.

2. Vacuna contra el cáncer que comprende el péptido según la reivindicación 1 como principio activo.

3. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 2, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.

4. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 2 o 3, en la que el cáncer se selecciona de entre el grupo
 constituido por cánceres del intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos,
 cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cánceres nasofaríngeos, cánceres de útero,
 cánceres de próstata y los cánceres de vesícula biliar.

5. Inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende el péptido según la reivindicación 1 como principio activo.

6. Inductor de linfocitos T citotóxicos según la reivindicación 5, para su utilización en el tratamiento del cáncer en un
 ser humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario.

7. Polinucleótido de cualquiera de (5) a (6) a continuación:

(5) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 10

(6) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 11.

8. Medicamento para terapia génica destinado a su utilización en el tratamiento de un cáncer epitelial que
 comprende el polinucleótido según la reivindicación 7 como principio activo.

9. Vector recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7.

10. Transformante en el que se introduce el vector recombinante según la reivindicación 9.

11. Procedimiento para producir el péptido según la reivindicación 1, que comprende las etapas que consisten en
 cultivar el transformante según la reivindicación 10 y recoger el péptido según la reivindicación 1 del cultivo.

12. Célula presentadora de antígeno obtenida *in vitro* pulsando con el péptido según la reivindicación 1.

13. Vacuna contra el cáncer que comprende la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12 como
 principio activo.

14. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 13, en la que el cáncer es un cáncer epitelial.

15. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 13 o 14, en la que el cáncer se selecciona de entre el grupo
 constituido por cánceres del intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres
 bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cánceres nasofaríngeos, cánceres de útero, cánceres de
 próstata y los cánceres de vesícula biliar.

16. Inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12
 como principio activo.

17. Inductor de linfocitos T citotóxicos según la reivindicación 16 para su utilización en el tratamiento de cáncer en un
 ser humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario.

18. Complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor que comprende un antígeno de histocompatibilidad mayor y
 el péptido según la reivindicación 1 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de
 antígeno según la reivindicación 12.

19. Complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 que comprende una molécula de
 HLA-A2402, una microglobulina $\beta 2$ y el péptido según la reivindicación 1 o el péptido epítipo del antígeno tumoral
 presente en la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12.

20. Vacuna contra el cáncer que comprende el complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la
 reivindicación 18 o 19 como principio activo.

21. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 20, en la que el cáncer es un cáncer epitelial.
- 5 22. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 20 o 21, en la que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres del intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cánceres nasofaríngeos, cánceres de útero, cánceres de próstata y los cánceres de vesícula biliar.
- 10 23. Inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende el complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 o 19 como principio activo.
24. Inductor de linfocitos T citotóxicos según la reivindicación 23 para su utilización en el tratamiento del cáncer en un ser humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario.
- 15 25. Tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor que comprende un antígeno de histocompatibilidad mayor y el péptido según la reivindicación 1 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12.
- 20 26. Linfocito T citotóxico que se obtiene *in vitro* por estimulación de linfocitos de la sangre periférica utilizando uno o más de (a) a (d) siguientes:
- (a) el péptido según la reivindicación 1
- (b) la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12
- 25 (c) el complejo antigénico de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 o 19
- (d) el tetrámero de complejo del antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 25.
- 30 27. Linfocito T citotóxico según la reivindicación 26 que se obtiene mediante las etapas de formación de un complejo entre un complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor y/o un tetrámero del mismo y un linfocito T citotóxico mediante la estimulación de linfocitos de la sangre periférica utilizando uno o más de (a) a (d) definidos en la reivindicación 26 y aislamiento del linfocito T citotóxico del complejo.
- 35 28. Medicamento de inmunoterapia pasiva que comprende el linfocito T citotóxico según la reivindicación 26 o 27 como principio activo.
29. Medicamento de inmunoterapia pasiva según la reivindicación 28, en el que el cáncer es un cáncer epitelial.
- 40 30. Medicamento de inmunoterapia pasiva según la reivindicación 28 o 29, en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cáncer nasofaríngeo, cánceres de útero, cánceres de próstata y los cánceres de vesícula biliar.
- 45 31. Medicamento de inmunoterapia pasiva según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, para su utilización en el tratamiento del cáncer en un ser humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario.
- 50 32. Método *in vitro* de cuantificación de linfocitos T citotóxicos con restricción por HLA-A2402 en la sangre periférica, que comprende las etapas que consisten en preparar uno o más de los siguientes (a) a (d) actuando sobre la sangre periférica:
- (a) el péptido según la reivindicación 1
- (b) la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12
- 55 (c) el complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 o 19
- (d) el tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 25, y
- 60 cuantificar los linfocitos T citotóxicos en la sangre periférica o la citocina producida por dichos linfocitos citotóxicos.
33. Utilización de uno o más de los siguientes (a) a (d):
- (a) el péptido según la reivindicación 1
- 65 (b) la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12

(c) el complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 o 19

(d) el tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 25

para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la mejora del cáncer.

34. Utilización de una fracción de célula mononuclear de la sangre periférica de un paciente humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario, en la que las células se han cultivado con uno o más de los siguientes (a) a (d)

(a) el péptido según la reivindicación 1

(b) la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12

(c) el complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 o 19

(d) el tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 25,

para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la mejora del cáncer.

35. Utilización de uno o más de los (a) a (d) siguientes

(a) el péptido según la reivindicación 1 o

(b) la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12

(c) el complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18 o 19

(d) el tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 25,

para la preparación de un medicamento para inducir linfocitos T citotóxicos.

36. Utilización de un linfocito T citotóxico según la reivindicación 26 o 27 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o a la mejora del cáncer en un ser humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario.

37. Tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 18, en el que el tetrámero es un complejo que comprende una molécula de HLA-A2402, una microglobulina $\beta 2$ y el péptido según la reivindicación 1 o el péptido epítipo del antígeno tumoral presente en la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 12.

38. Vacuna contra el cáncer que comprende el tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad según la reivindicación 37 como principio activo.

39. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 38, en la que el cáncer es un cáncer epitelial.

40. Vacuna contra el cáncer según la reivindicación 38 o 39, en la que el cáncer se selecciona de entre el grupo constituido por cánceres de intestino grueso, cánceres de pulmón, cánceres de mama, cánceres gástricos, cánceres bucales, cánceres pancreáticos, cánceres de esófago, cánceres nasofaríngeos, cánceres de útero, cánceres de próstata y cánceres de vesícula biliar.

41. Inductor de linfocitos T citotóxicos que comprende el tetrámero de complejo de antígeno de histocompatibilidad mayor según la reivindicación 37.

42. Inductor de linfocitos T citotóxicos según la reivindicación 41 para su utilización en el tratamiento de un ser humano que presenta HLA-A2402 como antígeno leucocitario.

Fig. 1

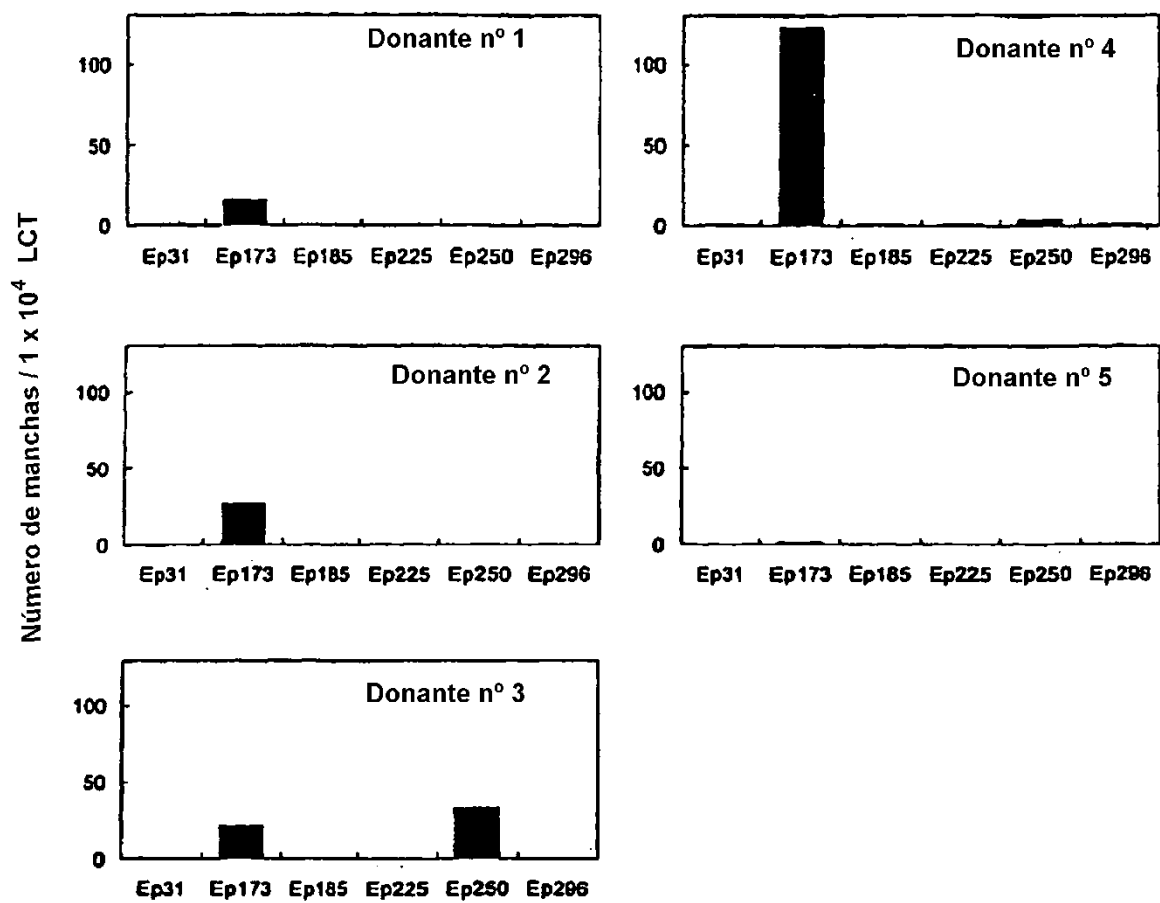
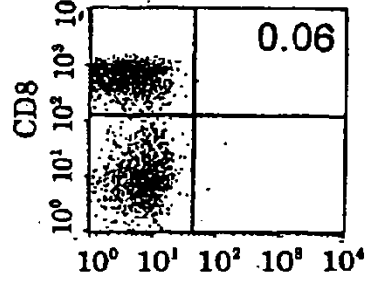


Fig. 2

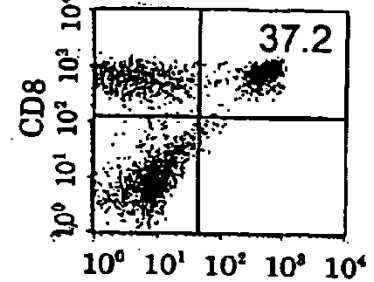
A

Mayor parte de LTC #27(ENV).003



Tetrámero HLA-A24 / ENV584

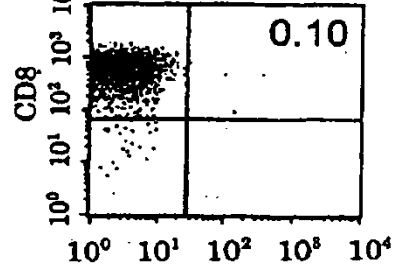
Mayor parte de LTC #27(#27).004



Tetrámero HLA-A24 / EP173

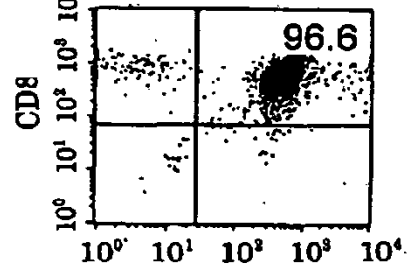
B

Clon #27-2(ENV tet).001



Tetrámero HLA-A24 / ENV584

Clon #27-2(#27 tet).002



Tetrámero HLA-A24 / EP173

Fig. 3

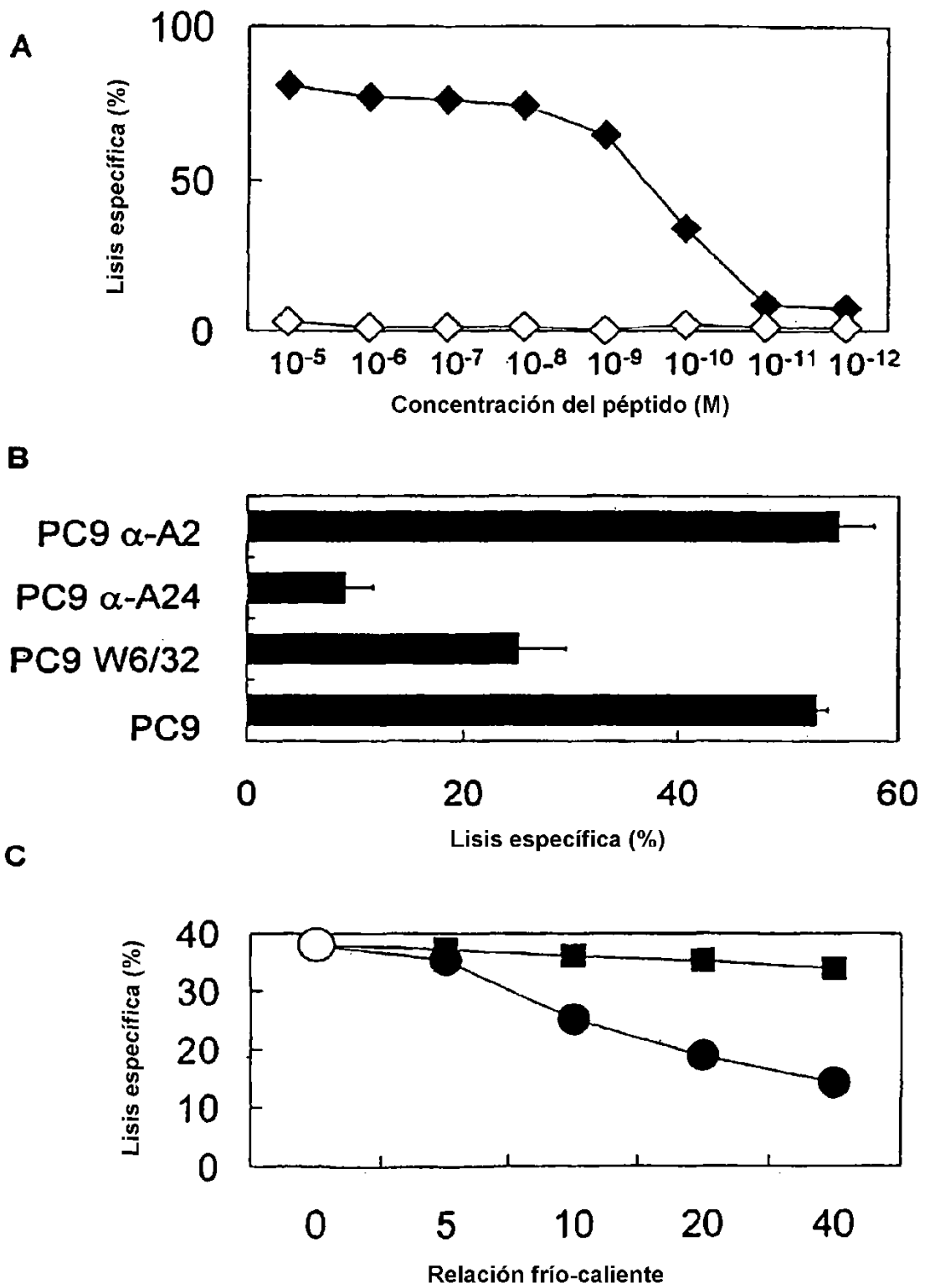


Fig. 4

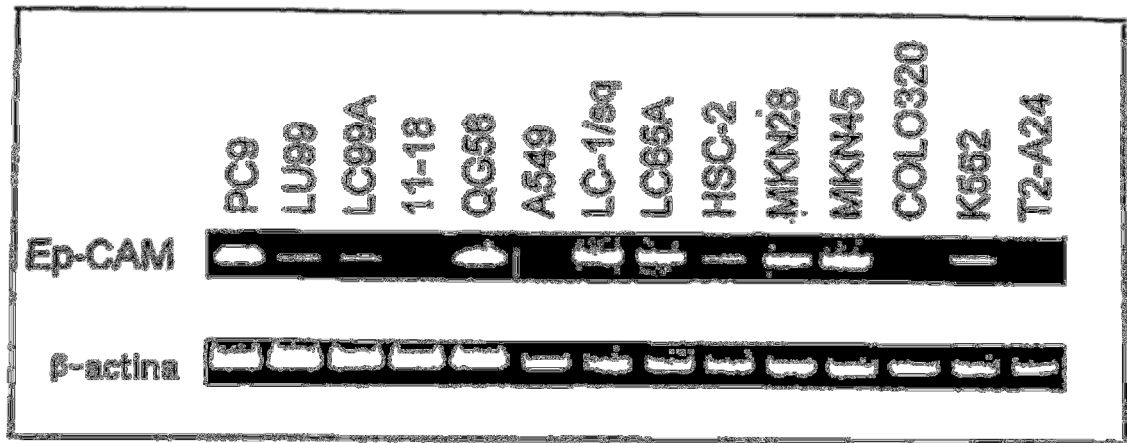


Fig. 5

