

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 969**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2005** **E 05823557 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **26.09.2007** **EP 1836217**

54 Título: **Péptidos inmunógenos antitumorales y vacuna que los contiene**

30 Prioridad:

30.12.2004 GB 0428525
18.03.2005 IT RM20050128

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.02.2013

73 Titular/es:

FAZIO, VITO MICHELE (25.0%)
Via Groenlandia, 19
00144 Roma, IT;
GARACI, ENRICO (25.0%);
RINALDI, MONICA (25.0%) y
SINIBALDI, PAOLA (25.0%)

72 Inventor/es:

FAZIO, VITO MICHELE;
GARACI, ENRICO;
RASI, GUIDO;
RINALDI, MONICA y
SINIBALDI, PAOLA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 394 969 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos inmunógenos antitumorales y vacuna que los contiene

La presente invención se refiere a nuevas secuencias de péptidos inmunógenos en conexión con tumores, particularmente el carcinoma de colon rectal y usos de los mismos para la preparación de vacunas.

- 5 Es sabido que la proteína Corina es una serina-proteasa transmembranal tipo II que actúa como convertasa del factor natriurético proatrial (proANP) en el corazón (Yan et al. 1999). Por consiguiente, el patrón de expresión de Corina se considera muy similar al de los péptidos natriuréticos.

Además del corazón, se ha detectado la expresión de Corina (AF133845) en otros tejidos, como el riñón durante el desarrollo, los huesos y el útero. Aún más sorprendentemente, se ha detectado también la expresión de Corina en
10 diversos sarcomas y carcinomas, como el carcinoma de pulmón, el cáncer de pulmón microcítico (SCLC) (Wu et al. 2003), osteosarcomas, leiomiomas, carcinomas endometriales, pero no se han descrito todavía resultados del análisis de la expresión en colon o carcinoma de colon (como resulta de la investigación de referencia en PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

La proteína Corina es una proteasa que, además del dominio de serina-proteasa, presenta en la región extracelular
15 dos dominios ricos en cisteína (semejantes a Frizzled) que son comunes al factor interactivo Wnt pero no proteínas proteasa semejantes a tripsina (serina-proteasa). Las secuencias de aminoácidos de Corina de rata, ratón y humana junto con otras proteínas "Frizzled" (Fz, receptor soluble o transmembranal) están representadas también alineadas en la Figura 1 para mostrar el alto grado de conservación de dominios ricos en cisteína (CRD). Estos dominios incluyen aproximadamente 120 aminoácidos con patrón inalterado de 10 residuos cisteína (numerados en la parte
20 inferior de la figura) que forman 5 puentes bisulfuro que dan como resultado estructuras de hélice alfa. La región entre los residuos cisteína segundo y tercero se representa con mayor detalle en la Figura 2. Si bien la correlación de la activación inadecuada del sistema de transducción de factores Wnt/Fz con la carcinogénesis es conocida (Holcombe et al., 2002; Vincan et al. 2003), no ocurre lo mismo para la relación del último y serina-proteasa con dominios semejantes a Frizzled, por ejemplo Corina.

- 25 Hasta ahora, persiste la necesidad de proporcionar nuevas vacunas contra tumores adecuadas para generar una respuesta inmune apropiada para refrenar el crecimiento de los tumores, para utilización en combinación con quimioterapia o radioterapia.

En este contexto, WO 01/62786 describe un péptido de sistema proteínico TLP (SEQ ID NO: 2) o fragmentos del mismo para ser utilizados como antígenos en una vacuna anti-tumoral, particularmente tumor de pulmón.
30 Específicamente, WO 98/15282 describe varios péptidos TLP con secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 descritas ya en WO-A-9401458, para ser utilizadas como inmunógenos para la preparación de vacunas anti-tumor, particularmente para tumores de pulmón y urogenitales y para el carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC).

35 Sin embargo, los péptidos indicados anteriormente adolecen de la desventaja de ser escasamente inmunógenos como se consigna en WO 03/045997, en donde se describen proteínas de fusión de estos péptidos e IL-2 y el uso de las mismas como antígenos anti-tumorales para la prevención y el tratamiento de diversos tumores.

WO9964608 describe una proteína de fusión obtenida a partir de una combinación de péptidos TLP e interleuquina-2 y su uso en la inmunoterapia del cáncer.

40 El carcinoma de colon es una de las patologías más frecuentes en los países desarrollados. En Europa, tanto en varones como en mujeres, el tumor de colon rectal es la segunda neoplasia más difundida (Ferlay et al., 1999). La incidencia del mismo es mayor en las poblaciones caucásicas europeas que en las asiáticas y africanas (Parkin et al., 2002).

Los autores de la presente invención han descubierto ahora varias secuencias peptídicas con una de dominios de Corina ricos en cisteína (NCBI NC_00004; gi: 37625049), capaces de actuar como inmunógenos para proporcionar
45 una vacuna anti-tumoral diseñada específicamente para la población caucásica (alelos HLA A0210, HLA A03, HLA B0702, HLA B2705, HLA B5101).

Las células T y B reconocen antígenos proteínicos de acuerdo con patrones sustancialmente diferentes. Si bien los receptores y anticuerpos de las células B reconocen el antígeno en solución y fijan epítopes lineales o ensamblados de 15-22 aminoácidos, los receptores de las células T reconocen el antígeno después de la degradación proteolítica
50 dando como resultado epítopes segmentales de 8-11 y 12-25 aminoácidos unidos respectivamente a moléculas de clase I y II codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La diferente longitud de los péptidos presentados por el MHC es función de la especie y el alelo MHC I-II particular del individuo. En los humanos, particularmente, la longitud media de los epítopes proteínicos de HLA tipo I es 9-10 aminoácidos. Por consiguiente, con objeto de poder ser utilizados como antígeno presentado efectivamente por diferentes HLA de la población
55 caucásica, los péptidos de acuerdo con la invención tienen que ser como mínimo noámeros, dado que, como es

sabido, la bolsa del MHC humano prefiere péptidos de 9-10 aminoácidos, mientras que con péptidos de 8 ó 12 aminoácidos la presentación de antígeno es menos efectiva.

Los autores, por medio de ensayos ELISPOT (véase Ejemplo 1, Figura 3) han demostrado que estos péptidos son más inmunógenos debido a que generan mayor respuesta específica de antígeno en linfocitos de ratas inoculadas con tumor de colon DHD-K12 que el péptido descrito en WO 98/15282 y WO-A-9401458 que tiene SEQ ID NO: 1 RTNKEASI, cuya escasa inmunogenicidad ha sido ya consignada en WO 03/045997. Adicionalmente, el epítipo RTNKEASI no existe naturalmente, ni se detecta en la secuencia de Corina de mamífero. El efecto de la respuesta inmune es principalmente purificar las células epítipo-positivas o suprimir la expresión del epítipo y generar una diferenciación de las células implicadas. Dado que el epítipo RTNKEASI no es la secuencia existente naturalmente, era imposible detectar epítipos inmunógenos que no den resultados autoinmunes o positivos falsos en la respuesta inmune por la vía de reconocimiento de epítipos no existentes naturalmente.

Por consiguiente, péptidos inmunógenos que comprenden la secuencia QKEASI (SEQ ID NO: 1) perteneciente a la región de cisteína 2 a cisteína 3 del dominio Frizzled2 de la proteína Corina de mamífero, **teniendo dichos péptidos una longitud de 8 a 12 aminoácidos**, representan un objeto de la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida, los péptidos de acuerdo con la invención comprenden el epítipo RTQKEASI (SEQ ID NO: 2), localizado entre los residuos cisteína 2 y 3 del dominio Frizzled2 de Corina (dominio Frizzled 2, posiciones de Corina 531-570).

De acuerdo con un aspecto particularmente preferido de la presente invención (adaptabilidad a la bolsa del MHC humano que da como resultado una presentación de antígeno efectiva) los péptidos pueden ser nonámeros o decámeros. Preferiblemente, los péptidos de acuerdo con la invención comprenden la secuencia HRTQKEASI (SEQ ID NO: 3) (posiciones de Corina 548-555) o RTQKEASIC (SEQ ID NO: 4).

De acuerdo con una realización adicional, los péptidos de la invención como se han definido arriba pueden ser tales que el residuo de aminoácido R esté reemplazado con M o P y/o el residuo de aminoácido T esté reemplazado con E, para optimizar adicionalmente la interacción del péptido con diversos haplotipos HLA-1.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, los péptidos pueden caracterizarse porque tienen un residuo cisteína en el extremo del término C.

Más particularmente, los péptidos de acuerdo con la invención pueden seleccionarse del grupo constituido por: HRTQKEASI (SEQ ID No:3), HMTQKEASI (SEQ ID No:5), HREQKEASI (SEQ ID No:6), REQKEASI (SEQ ID No:7), MTQKEASI (SEQ ID No:8), RTQKEASI (SEQ ID No:2), HRTQKEASIC (SEQ ID No:9), RTQKEASIC (SEQ ID No:4), MTQKEASIC (SEQ ID No:10), REQKEASIC (SEQ ID No:11), HMTQKEASIC (SEQ ID No:12), y HREQKEASIC (SEQ ID No:13).

Alternativamente, péptidos como los anteriores pueden estar protegidos en el término N o el término C para evitar la digestión antes que ocurra la estimulación inmune. O bien, los aminoácidos de la secuencia pueden reemplazarse con residuos menos susceptibles a la hidrólisis.

Las secuencias de DNA que codifican péptidos como los arriba definidos representan un objeto adicional de la invención, considerando también la adaptación del uso de codones en diversas especies (células procariotas, células de insecto, etc.).

Un objeto adicional de la presente invención está representado por un vector de expresión que comprende al menos una secuencia de DNA como se ha definido arriba. De acuerdo con una realización preferida, el vector de expresión puede comprender adicionalmente la secuencia codificante de un compuesto inmunomodulador seleccionado del grupo constituido por quimioquinas y citoquinas inmunomoduladoras, como por ejemplo IL-12, IL-2, GM-CSF, INF-gamma o proteínas de fusión con adyuvante de vacunación (fragmento C de la toxina tetánica).

Es un objeto de la presente invención el uso de los péptidos o vectores de expresión arriba definidos para la preparación de una vacuna para el tratamiento preventivo de tumores, preferiblemente el carcinoma de colon rectal en individuos de población caucasiana (alelos HLA A0201, HLA A03, HAL B0702, HLA B2705, HLA B5101). Particularmente, los péptidos de acuerdo con la invención pueden utilizarse en asociación con al menos un agente quimioterapéutico (por ejemplo ciclofosfamida) y/o anticuerpos de acuerdo con la invención.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden administrarse por cualquier ruta adecuada para estimular una respuesta inmune y como dosis simples o múltiples. Adicionalmente, los péptidos pueden expresarse *in vivo* por transformación con un vector viral o bacteriano, plásmido, y el producto de expresión puede ser también una proteína de fusión. Finalmente, los péptidos pueden suministrarse utilizando moléculas portadoras, con tal que el epítipo se exponga efectivamente o *in vivo* para permitir la generación de respuesta inmune.

Es un objeto adicional de la presente invención una vacuna anti-tumoral, preferiblemente anti-carcinoma de colon rectal, que comprende al menos uno de los péptidos o el vector de expresión como se ha definido arriba, junto con adyuvantes y excipientes farmacológicamente aceptables.

La presente invención se refiere adicionalmente a anticuerpos monoclonales u oligoclonales específicos para uno de los péptidos de inventiva. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden utilizarse también para la preparación de un medicamento para el tratamiento de los tumores, preferiblemente el carcinoma de colon rectal, para ser administrados directamente en la lesión cancerosa, y pueden utilizarse en asociación con agentes quimioterapéuticos.

Es un objeto adicional de la presente invención un método para la determinación *in vitro* de la existencia de un tumor o el seguimiento del paciente que padece el tumor, preferiblemente carcinoma de colon rectal, en una muestra biológica que comprende el uso de los anticuerpos monoclonales o policlonales que se han definido arriba.

Finalmente, un objeto de la presente invención es un kit de diagnóstico que comprende los anticuerpos monoclonales u oligoclonales que se han definido arriba para la determinación de la existencia de un tumor o el seguimiento del paciente que padece el tumor, preferiblemente carcinoma de colon rectal.

La presente invención se describirá a continuación por vía de ilustración pero sin carácter limitante, de acuerdo con realizaciones preferidas de la misma y con referencia particular a los dibujos adjuntos, en los cuales:

la Figura 1 muestra la alineación del dominio Frizzled2 de Corina humano, de ratón y de rata, con respecto a otras secuencias Frizzled2 membranales o secretadas; diez residuos cisteína se indican con numerales en la parte inferior;

la Figura 2 muestra con mayor detalle la región de aminoácidos de los residuos cisteína 2 a 3 de Corina (Frizzled2);

la Figura 3 muestra el ensayo comparativo ELISPOT de péptidos nonámeros de la presente invención y un péptido conocido en la técnica;

la Figura 4, en los paneles A-H, muestra análisis inmunohistoquímicos de diversas muestras de control, mucosa normal de colon, y adenocarcinoma de colon;

la Figura 5 muestra una inmunotransferencia del anticuerpo policlonal anti-RTNKEASI y la reacción del mismo con RTNKEASI (pista 1) y con RTQEASI (flecha de pista 3);

la Figura 6 muestra el análisis citofluorimétrico de células DHD-K12 utilizando anticuerpos monoclonales anti-RTQ de membrana (panel izquierdo) y citoplásmicos (panel derecho);

la Figura 7 muestra el análisis de inmunofluorescencia de células DHD-K12 utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RTQ para determinar la distribución intracelular (vesicular, citoplásmica, perinuclear, nuclear);

la Figura 8 muestra el análisis inmunohistoquímico utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RTQ nuclear y citoplásmico de tejidos de colon de rata BDIX normal y tratado con DMH; DMH6: muestreo en la semana 11^a después de la última dosis de DMH; DMH20: muestro en la semana 26^a después de la última dosis de DMH;

la Figura 9 muestra el efecto de la inmunización terapéutica con RTQEASI que contiene una vacuna de DNA (DNA vax) sobre la reducción del volumen del tumor en ratas consanguíneas BDIX después de 9 semanas de crecimiento de células singénicas DHD-K12 de carcinoma de colon (DHD-K12/BDIX) en comparación con un control (adyuvante de Freund).

Ejemplo 1: *Identificación y optimización de los alelos caucasicos HLA-I más frecuentes del los epítopes de la región Frizzled2 de Corina.*

Por el uso del programa y el banco de datos SYFPEITHI, se determinó la secuencia de aminoácidos de la región Frizzled2 desde cisteína 2 a cisteína 3 de la proteína Corina humana y de ratón a fin de detectar dentro de esta secuencia proteínica diversos epítopes candidatos para la presentación por el MHC-1.

El análisis por computadora utilizando el programa SYFPEITHI de las secuencias de aminoácidos humanas y de ratón (MHC-I: H2-K^b) evidenció particularmente dos epítopes, HRTQEASI y RTQEASI, respectivamente.

La selección resultó principalmente de dos consideraciones:

- ambos epítopes presentan un registro de afinidad dentro del intervalo definido como "medio", es decir $10 < x < 20$, 12 para el epítope HRTQEASI humano y 10 para RTQEASI de ratón, respectivamente;

adicionalmente, en cuanto al caso del epítope humano HRTQEASI, el mismo representa un candidato antigénico satisfactorio para todos los alelos de HLA I más frecuentes en la población caucasiana (aproximadamente 90% de la población): HLA – A0201, - B2705, - B0702, - A 03, - B510. De hecho, el mismo se selecciona por el programa SYFPEITHI como candidato para optimización del MHC I en todos estos alelos de acuerdo con los valores de registro siguientes para cualquier alelo considerado:

- HLA-A0201 = Registro 12

- HLA-A03 = Registro 10
- HLA-B2705 = Registro 20
- HLA-B0702 = Registro 7
- HLA-B5101 = Registro 11

5 Por lo que respecta a los resultados del registro de la predicción de epítopes, se ha evaluado ulteriormente el papel de la secuencia de aminoácidos HRTQKEASI contenida en la proteína Frizzled2 (FRI.2) humana con respecto a variantes alélicas más frecuentes en la población caucasiana (HLA -A0201, -B27, -B0702, -A03 y -B5101).

10 A partir del análisis de predicción de epítopes realizado para el alelo MHC I más frecuente en la población caucasiana, a saber HLA-0201, considerando la secuencia de aminoácidos FRI.2 desde la posición 454 a la 575, se ha seleccionado el epítopo no número Registro 12 HRTQKEASI, que contiene la secuencia de aminoácidos desde la posición 479 a la 487. Este epítopo constituye el candidato óptimo para los diversos alelos HLA-I arriba citados.

Optimización del epítopo HRTQKEASI

- HLA -A0201 (alelo que representa aproximadamente el 75% de la población caucasiana)

	Posición									Registro
15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	H	R	T	Q	K	E	A	S	I	12
		↓								↓
		M								22

- HLA-B27:

	Posición									Registro
20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	H	R	T	Q	K	E	A	S	I	20

- HLA-B0702:

	Posición									Registro
25	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	H	R	T	Q	K	E	A	S	I	7
		↓								↓
		P								17

- HLA-B5101:

	Posición									Registro
30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	H	R	T	Q	K	E	A	S	I	11
		↓								↓
		P								21

35 Los aminoácidos segundo y noveno son críticos de epítopes óptimos para los alelos de HLA I más frecuentes en la población caucasiana (-A0201, -B27, -B0702, -A03 y -B5101). De acuerdo con lo anterior, la optimización de los aminoácidos en estas posiciones de epítopo con respecto a bolsas específicas de cualquier alelo HLA-I permite aumentar el registro de asociación dando como resultado mayor eficiencia de presentación de antígeno.

40 Como resultado de esta consideración, el octámero RTNKEASI (SEQ ID NO: 1; WO-A-9401458), seleccionado como término de comparación que representa la técnica anterior más reciente, no puede presentarse eficientemente

debido a que tiene sólo 8 aminoácidos. Si estima la predicción del epítipo RTNKEASI para los alelos HLA-I más frecuentes se, el resultado es nulo, es decir que el mismo no se presenta eficientemente.

Ejemplo 2: *Desarrollo e inmunohistoquímica de los anticuerpos anti-Corina*

- 5 Basándose en las consideraciones anteriores, se utilizó el péptido RTQKEASI para inmunizar ratones (variedad CD2F1) para la producción de suero destinado a ser utilizado inicialmente para experimentos inmunohistoquímicos a fin de verificar la expresión de antígeno en tejidos.

El péptido fue sintetizado por INBIOS S.r.l. con pureza > 70% por HPLC, solubilidad en agua de 5 mg (0,1% TFA).

El patrón de inmunización fue como sigue:

- 10
- se inmunizaron 4 ratones CD2F1 subcutáneamente con 100 mg/ml de péptido conjugado con el adyuvante ovoalbúmina;
 - la primera inmunización se realizó con adyuvante completo de Freund;
 - desde la segunda inmunización en adelante, se utilizó adyuvante incompleto de Freund para 5 inmunizaciones en total;
 - el muestreo se realizó el quinto día después de la última inmunización.

- 15 Con objeto de verificar la presencia de anticuerpos específicos anti-RTQKEASI, se dispuso un ensayo ELISA con péptido adsorbido en pocillos (10 mg/ml).

Los resultados del ensayo ELISA se muestran en la Tabla 3 y se expresan como valores OD

Tabla 3

	Dilución	OD (nm)
Control negativo		0,141
Animal 1	1:1000	0,251
	1:2500	0,216
Animal 2	1:1000	0,210
	1:2500	0,177
Animal 3	1:1000	0,156
	1:2500	0,121
Animal 4	1:1000	0,276
	1:2500	0,190

- 20 Basándose en estos resultados, 3 de los 4 animales desarrollaban anticuerpos contra RTQKEASI.

Considerando que el epítipo más pequeño que puede ser presentado por los ratones tiene una longitud de 8 aminoácidos, los anticuerpos generados pueden considerarse hipotéticamente análogos a anticuerpos monoclonales.

Expresión de antígeno e inmunohistoquímica

- 25 Los datos preliminares están disponibles en los sitios siguientes:

OMIM

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&itool=toolbar>);

GEO Perfiles

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=geo>;

SAGE

<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/>;

SOURCE

<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/>

5 sourceResult);

GeneNote

http://genecards.weizmann.ac.il/cgi-bin/genenote/GN_results.pl?keyword_type=2_gc_id&keyword=GC04M047436&data_type=norm2&results=yes

GeneCard

10 <http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/genecards/carddisp?CORIN>

En cuanto a Corina (AF133845) los datos actualizados hasta el momento de la presentación demuestran altos niveles de expresión de la proteína en el corazón (cardiomiocitos), el riñón durante el desarrollo, y el tejido óseo. El patrón de expresión de Corina se considera muy similar al de los péptidos natriuréticos. La expresión se demuestra también de modo no unívoco en otros tejidos (timo, pulmón, próstata, etc.) y en osteosarcomas, leiomiomas, y carcinomas endometriales, pero no se han descrito hasta ahora resultados de análisis de expresión en colon o carcinoma de colon (análisis extendido también a la investigación hasta la misma fecha en PubMed "corin and colon" - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

La expresión de Corina se evaluó por ensayos inmunohistoquímicos en colon y carcinoma de colon.

20 Los tejidos analizados eran respectivamente adenocarcinomas de colon humano y fragmentos de mucosa normal de colon correspondientes.

Muestras de adenocarcinoma y tejido sano alejado de neoplasia se recogieron nuevamente con anterioridad y se congelaron directamente a -80°C.

Las lesiones se caracterizaron, se organizaron en fases y se graduaron de acuerdo con estándares de anatomía patológica, y los resultados se muestran en la Tabla 1.

25 Tabla 1

Paciente	Grado	TNM	Histotipo	Tejido normal correspondiente
A:	G3	T3, N0, Mx	Histotipo clásico	Mucosa normal de colon
B:	G3	T3, N0, Mx	Histotipo clásico	Mucosa normal de colon
C:	G3	T4, N1, Mx	Histotipo clásico	Mucosa normal de colon
D:	G2	T3, N0, M1	Histotipo con aspectos de secreción de moco	Mucosa normal de colon
E:	G2	T3, N0, Mx	Histotipo con aspectos de secreción de moco	Mucosa normal de colon

El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo utilizando preparaciones de secciones criostáticas. Las secciones histológicas se fijaron luego en acetona.

30 Las secciones histológicas se trataron con sueros anti-RTKQESI de ratón inmunes o pre-inmunes a dilución 1/100. La reacción se detectó utilizando el sistema avidina-biotina y diaminobencidina.

Se utilizaron los controles siguientes:

- controles negativos sin anticuerpo para detectar reactividad cruzada eventual o precipitaciones inespecíficas de diaminobencidina;

- suero preinmune de control negativo;
- suero inmune

Los resultados se consignan en la Tabla 2; la localización citoplásmica para los resultados inmunohistoquímicos es la más razonable; sin embargo, no es posible excluir la localización en la membrana citoplásmica.

5

Tabla 2

Paciente		Positividad	Localización	G-TNM
A	Adenocarcinoma	+++	citoplasma	G3, T3, N0, Mx
	Mucosa normal	+/-	citoplasma	
B	Adenocarcinoma	+++	citoplasma	G3, T3, N0, Mx
	Mucosa normal	-		
C	Adenocarcinoma	++	citoplasma	G3, T4, N1, Mx
	Mucosa normal	-		
D	Adenocarcinoma	-		G2, T3, N0, M 1 secretor de moco
	Mucosa normal	-		
E	Adenocarcinoma	++	citoplasma	G2, T3, N0, M x secretor de moco
	Mucosa normal	-		

Más específicamente en la Figura 4, paneles A y B, se muestran respectivamente controles negativos de procedimiento inmunohistoquímico sin anticuerpo y el uso de suero preinmune (1/100) para controlar el procedimiento inmunohistoquímico y el suero preinmune. En el panel C de la Figura 4 se muestra un experimento inmunohistoquímico con el uso de suero inmune (17000). Con respecto al control de suero preinmune (panel B), es evidente la positividad citoplásmica de células neoplásticas epiteliales.

La Figura 4, panel D, muestra un análisis inmunohistoquímico de un control negativo realizado sobre una muestra de mucosa normal de colon utilizando suero preinmune (1/100); el panel E representa el experimento inmunohistoquímico realizado utilizando suero inmune (1/100). No se observa variación de tinción significativa alguna en comparación con el control de suero preinmune. La Figura 4, panel E, muestra un control negativo sin anticuerpo y permite el control del procedimiento inmunohistoquímico; el panel F muestra el análisis inmunohistoquímico de control negativo utilizando suero preinmune (1/100) y permite el control del suero inmune; el panel H muestra un experimento inmunohistoquímico utilizando suero inmune (1/100). Con respecto a suero preinmune, es evidente la positividad citoplásmica de células neoplásticas epiteliales.

Basándose en datos inmunohistoquímicos, es evidente la expresión específica de Corina en carcinoma de colon en comparación con la expresión no detectable significativamente en la mucosa normal de colon correspondiente (los mismos pacientes).

Este resultado es significativamente notable a fin de desarrollar métodos diagnósticos o terapéuticos utilizando esta proteína o anticuerpos desarrollados como portadores o agentes terapéuticos para el carcinoma de colon.

Ejemplo 3: Estudio acerca de la inmunogenicidad de RTQKEASIC por el ensayo ELISPOT

Se adquirieron los péptidos sintéticos siguientes con secuencias nonámeras a comparar: RTQKEASIC (péptido nuevo) y RTNKEASIC (péptido conocido en la técnica)

Se caracterizó la expresión de RTQKEASIC con un modelo animal experimental de rata.

Células de la línea autóloga DHD-K12 de carcinoma de colon se inocularon intra-esplénicamente en ratas BDIX. Estas células producen metástasis a nivel pulmonar y hepático, y expresan naturalmente el epítipo común también al carcinoma de colon rectal humano (RTQKEASIC). Para evaluar la relevancia del antígeno RTQKEASIC en la respuesta citotóxica específica de antígeno, se inmunizaron ratas BDIX con DHD-K12.

La actividad citotóxica de PBMC (test de citotoxicidad basado en la liberación de ^{51}Cr o LDH) de las ratas BDIX contra las células DHD-K12 se evaluó después de inmunización e inoculación del tumor. Las ratas BDIX no exhiben actividad citotóxica espontánea contra las células DHD-K12, en tanto que ésta es inducida 15-30 días después de la inoculación. La inmunización con el nonúmero RTQKEASIC induce actividad citotóxica alta contra DHD-K12.

- 5 Adicionalmente, esta actividad se incrementa significativamente después de inoculación del tumor en ratas pre-inmunizadas en comparación con las no inmunizadas.

En el presente estudio, se ha evaluado la capacidad de los linfocitos de ratas BDIX inmunizadas con DHD-K12 para recoger directamente in vitro el antígeno específico por medio del péptido sintético.

- 10 Se proporcionaron linfocitos de rata por muestreo de sangre intra-cardiaca en ratas de diferentes grupos (de control e inmunizadas). El muestreo se realizó a los 12-20 días después de la inoculación del tumor. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por separación en gradiente Ficoll. Se utilizaron linfocitos recientes o congelados.

Se utilizó un ensayo ELISPOT que permite la respuesta específica del antígeno expresada en linfocitos de rata inmunizados en una célula individual por detección de la producción de INF- γ a evaluar.

- 15 ELISPOT es un método simple y muy sensible para análisis en una célula individual de la activación celular: el mismo se utiliza particularmente para el análisis de respuestas específicas inmunes generadas por antígenos enteros o péptidos simples. Adicionalmente, basándose en las citoquinas analizadas, el mismo permite que las respuestas obtenidas de diferentes sub-poblaciones celulares se detecten y diferencien.

- 20 Un anticuerpo monoclonal específico de una citoquina de afinidad alta (actualmente INF- γ) se aplica como recubrimiento sobre una placa PVDF de 96 pocillos. Se añaden las células efectoras ($200-250 \times 10^3$) y se incuban durante 24-48 horas en presencia de antígenos (4-10 μg de péptidos).

- 25 En este periodo, las células específicas del antígeno responderán liberando INF- γ . Durante esta incubación, dado que el anticuerpo está inmovilizado junto a las células, la citoquina secretada se inmovilizará sobre la placa. Después de lavado para eliminar las células y el material inútil, se añade un anticuerpo biotinilado dirigido contra un segundo epítipo de citoquina.

- 30 Se añadió luego estreptavidina conjugada a enzima (por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP)). Después de las incubaciones y lavados apropiados, se añade un sustrato adecuado para revelar manchas teñidas en los sitios de respuesta de las células que responden al tratamiento. Las últimas se examinarán y se contarán por medio de un analizador de imágenes (AELVIS). Por comparación de los números de células teñidas y sembradas se obtendrá la frecuencia de células reconocedoras del antígeno.

- 35 En todos los experimentos, las muestras a ensayar se utilizaron por triplicado o cuadruplicado y los resultados se expresan como valor medio de los pocillos analizados (Figura 3). La Figura 3 muestra un diagrama de comparación de los tests ELISPOT realizados por estimulación de linfocitos de rata inoculados por vía intraperitoneal con 10×10^6 células DHD con los dos péptidos. El protocolo ELISPOT en el caso presente incluye 2×10^6 células/ml y 200000 células/pocillo. Dentro del recuadro se muestran los resultados para ratas de control. Del análisis del histograma se deduce que, de hecho, el nonúmero RTQKEASIC es más inmunógeno que el nonúmero RTNKEASIC.

Ejemplo 4: Estudio acerca de la especificidad del anticuerpo anti-RTQKEASI frente a anti-RTNKEASI

MATERIALES Y MÉTODOS

Transferencia Western

- 40 Con objeto de verificar la reacción del anticuerpo policlonal anti-RTN (dirigido contra la secuencia peptídica RTNKEASI) contra la secuencia del péptido RTQKEASI por inmunotransferencia, se cargaron 5 μg de cualquier péptido en gel de SDS-poliacrilamida al 18% y se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se saturó luego con leche en polvo con 5% de PBS que contenía 0,05% de Tween (PBST), incubada con anti-RTN diluido 1:100 en tampón de saturación para identificar los péptidos, y la reacción se detectó con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Después de lavado con PBST se reveló la transferencia utilizando el sistema Super Signal (Pierce). Para el estudio de la expresión de antígeno en las células DHD/K12 utilizando a la vez anticuerpos policlonales anti-RTN y anticuerpos monoclonales anti-RTQ, las células se lisaron en tampón de fosfato, de pH 6,8, que contenía 1% de Triton-X 100, 100 UI/ml de aprotinina y PMSF 1 mM. Las proteínas solubilizadas (42 μg) se cargaron en gel de SDS-poliacrilamida al 8% y se transfirieron a una membrana de PVDF. El antígeno se identificó con anticuerpos específicos (anti-RTN diluido 1:100, anti-RTQ diluido 1:20) y se detectó con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa.

Microscopía de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

La detección con el microscopio confocal de la expresión de antígeno en células DHD/K12 se llevó a cabo sobre muestras fijadas con paraformaldehído al 4%, permeabilizadas con Triton-X 100 e inmunomarcadas con anticuerpo

policlonal anti-RTN (diluido 1:70) y anticuerpo monoclonal anti-RTQ (diluido 1:20). La reacción se detectó utilizando anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488. Los núcleos celulares se sometieron a contratinción con yoduro de propidio. La observación se llevó a cabo con microscopio confocal LEICA TCS 4D, equipado con láser argón/criptón.

- 5 Para el análisis de la expresión de antígeno tisular, muestras de mucosa de colon distal de ratas BDIX tratadas y sin tratar con DMH se fijaron con formalina tamponada y se incrustaron en parafina. Las secciones histológicas se inmunomarcaron utilizando anticuerpo monoclonal anti-RTQ (diluido 1:10) y la reacción se detectó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa utilizando el kit DAKO Cytomation LSAB 2® HRP (DABN Liquid).

Modelos preclínicos utilizados

- 10 Para el modelo preclínico *in vivo*, se utilizaron ratas macho de la variedad BDIX, anestesiadas con alotano, a las que se habían administrado por vía intramuscular 5 veces a intervalos de 7 días 20 mg/kg de hidrocloreto de 1,2-dimetilhidrazina (DMH). Cuando apareció el tumor, se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de la mucosa de colon distal para análisis inmunohistoquímico de la expresión de antígeno.

- 15 Como modelo preclínico *in vitro* se utilizaron células de la línea DHD/K12, obtenidas originalmente de ratas de la variedad BDIX por tratamiento con hidrocloreto de dimetilhidrazina.

Citometría de flujo

Para verificar la expresión del antígeno en las células DHD-K12 por análisis citofluorimétrico, las células se desprendieron con tripsina/EDTA, se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-RTQ (diluido 1:20) y se analizaron citofluorométricamente (FACScan Becton-Dickinson).

- 20 La inmunomarcación se realizó utilizando tanto células sin fijar, para detectar la expresión del antígeno únicamente en la membrana celular, como células permeabilizadas con Triton-X 100 fijadas en paraformaldehído a fin de detectar la expresión citoplásmica de las mismas.

RESULTADOS

- 25 La inmunotransferencia se llevó a cabo utilizando anticuerpo monoclonal anti-RTNKEASI (anti-RTN) con las secuencias RTNKEASI y RTQKEASI. El resultado consignado en la Figura 5 muestra la reacción del anticuerpo policlonal anti-RTN con los péptidos RTNKEASI (pista 1) y también con RTQKEASI (pista 3).

- Los análisis por microscopía de inmunofluorescencia y fluorescencia permitieron detectar la inmunopositividad de las células DHD-K12 para el anticuerpo anti-RTQ. Los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo monoclonal anti-RTQKEASI muestran la positividad exclusivamente citoplásmica, pero no la membranal, de las células DHD-K12; el anticuerpo policlonal anti-RTN proporcionó también positividad membranal (Figura 6).

- Adicionalmente, por análisis de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal anti-RTQ se detectó que las células DHD-K12 muestran una distribución intracelular de antígeno superponible a la obtenida previamente con el uso del anticuerpo policlonal anti-RTN, pero más específica con respecto al último como se muestra en la Figura 7. La Figura 7 muestra la positividad prevalentemente citoplásmica de las células DHD-K12 contra el anticuerpo monoclonal anti-RTQ con un patrón de distribución vesicular, acumulación en un pequeño número de células en el área perinuclear (Golgi y lisosomas) y muchas células en el área nuclear.

- Finalmente, el análisis inmunohistoquímico realizado para tejido de colon de ratas BDIX normales y tratadas con DMH permitió verificar la inmunopositividad para el anticuerpo monoclonal anti-RTQ (muestreo realizado en las semanas undécima (DMH6) y vigesimosexta (DMH20) después de la última dosis de DMH). Si bien el resultado para el tejido de mucosa normal de colon era negativo, el tejido de las ratas tratadas con DMH exhibía una inmunopositividad específica cuya intensidad y distribución aumentaban con la progresión del tumor (Figura 8). Particularmente, la Figura 8 muestra que mientras que el antígeno RTQ no se expresa en la mucosa normal de colon, el mismo se expresa ya en la semana undécima después de la última dosis de DMH en las células de la mucosa epitelial hacia el lumen intestinal y las células tumorales e intersticiales en las criptas mucosales. Esta positividad aumenta en la semana vigesimosexta después de la última dosis de DMH. La distribución intracelular es principalmente citoplásmica, pero también nuclear en varias células. Las distribuciones tisulares de anti-RTN y anti-RTQ son similares, pero la última es mucho más específica.

Ejemplo 5: Vacunación terapéutica por inmunización con un DNA en ratas endogámicas BDIX

MATERIALES Y MÉTODOS

- 50 Se inyectaron células tumorales DHD/K12 (2×10^6 en 0,5 ml/animal) por vía subcutánea (s.c.) en la región cervical de ratas BDIX al comienzo del experimento (T0).

Al día siguiente, el grupo experimental (DNA vax, n = 8) se vacunó con 200 µg/animal de una vacuna de DNA pRC11Fz, administrada por inyección intramuscular en el músculo tibial anterior utilizando una jeringuilla de insulina y aguja de calibre 29 ½ (Becton Dickinson, Ref. No. 324804 microfino). Después de 3 semanas, el grupo "DNA vax" se sometió a una dosis de inmunización de refuerzo por electroporación (BTX ECM 830, 100 voltios/cm, 20 ms, electroporador 1 Hz) en los músculos cuádriceps con 200 µg/extremidad de una vacuna de DNA pRC11Fz. La electroporación se llevó a cabo bajo anestesia general con zoletil y xilor. El grupo de control (n = 8) se sometió al comienzo del experimento (T0) a inoculación subcutánea (s.c.) de células tumorales DHD/K12 (2x10⁶ en 0,5 ml/animal) en la región cervical retrorrenal de las ratas BDIX. Después de una semana, se administró adyuvante FCA (600 µl de Adyuvante Completo de Freund) y un volumen igual de BSA al 1% en PBS (1,2 ml/animal) intradérmicamente a los animales en 6 loci (0,2 ml/locus). El tratamiento se repitió semanalmente 7 veces.

La vacunación de las ratas BDIX después de un crecimiento de 9 semanas de células singénicas DHD-K12 de carcinoma de colon se efectuó a la vez con una vacuna de DNA que contenía RTQKEASI (DNA vax) (dos tratamientos en las semanas primera y cuarta) de acuerdo con la invención y control (adyuvante de Freund; 7 tratamientos cada semana).

Resultados

La Figura 9 muestra los resultados de la inmunización terapéutica con una vacuna de DNA de ratas BDIX consanguíneas después de un crecimiento durante 9 semanas de células singénicas DHD-K12 de carcinoma de colon, indicando el efecto sobre el crecimiento del tumor (volumen de tumor). La Tabla 3 indica los valores obtenidos después del tratamiento con una vacuna de DNA (DNA vax) y control con referencia al volumen de tumor y porcentaje de supervivencia.

Tabla 3

	Control	Vacuna de DNA
Volumen medio de tumor ± DS	3,33 ± 1,88	1,15 ± 0,91
Intervalo de volumen	1,5-6,5	0,15 - 2,5
Supervivencia/total (%)	6/8 (75)	8/8 (100)

Valor p = 0,00556

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fazio, Vito Michele Garaci, Enrico Rasi, Guido Rinaldi, Monica Sinibaldi, Paola

5 <120> Péptidos inmunógenos antitumorales y vacuna que los contiene

<130> PCT26276

<150> GB0428525

10 <151> 30-12-2004

<150> RM2005A000128

<151> 18-03-2005

15 <160> 13

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 6

20 <212> PRT

<213> mamífero

<400> 1

Gln Lys Glu Ala Ser Ile

1 5

25 <210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> mamífero

30 <400> 2

Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile

1 5

<210> 3

35 <211> 9

<212> PRT

<213> mamífero

<400> 3

His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile

1 5

40 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> mamífero

45 <400> 4

Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Cys

1 5

<210> 5

50 <211> 9

<212> PRT

<213> mamífero

<400> 5

His Met Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile

1 5

55 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

60 <213> mamífero

<400> 6
 His Arg Glu Gln Lys Glu Ala Ser Ile
 1 5

5 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mamífero

10 <400> 7
 Arg Glu Gln Lys Glu Ala Ser Ile
 1 5

15 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> mamífero

20 <400> 8
 Met Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile
 1 5

25 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mamífero

30 <400> 9
 His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Cys
 1 5 10

35 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mamífero

40 <400> 10
 Met Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Cys
 1 5

45 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mamífero

50 <400> 11
 Arg Glu Gln Lys Glu Ala Ser Ile Cys
 1 5

55 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mamífero

<400> 12
 His Met Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Cys
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> mamífero

<400> 13
 His Arg Glu Gln Lys Glu Ala Ser Ile Cys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

- 1.- Péptidos inmunógenos que comprenden la secuencia QKEASI (SEQ ID NO: 1) perteneciente a la región de cisteína 2 a cisteína 3 del dominio Frizzled2 de la proteína Corina de mamífero, teniendo dichos péptidos una longitud de 8 a 12 aminoácidos.
- 5 2.- Péptidos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprenden el epítipo RTQKEASI (SEQ ID NO: 2).
- 3.- Péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que son nonámeros o decámeros.
- 4.- Péptidos de acuerdo con la reivindicación 3, que comprenden la secuencia HRTQKEASI (SEQ ID NO: 3) o RTQKEASIC (SEQ ID NO: 4).
- 10 5.- Péptidos de acuerdo con la reivindicación 2 ó 4 en los cuales el residuo de aminoácido R está reemplazado con M o P y/o el residuo de aminoácido T está reemplazado con E.
- 6.- Péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizados porque tienen un residuo cisteína en el extremo del término C.
- 15 7.- Péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, que tienen una secuencia seleccionada del grupo constituido por HRTQKEASI (SEQ ID No:3), HMTQKEASI (SEQ ID No:5), HREQKEASI (SEQ ID No:6), REQKEASI (SEQ ID No:7), MTQKEASI (SEQ ID No:8), RTQKEASI (SEQ ID No:2).
- 8.- Péptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6 que tienen una secuencia seleccionada del grupo constituido por HRTQKEASIC (SEQ ID No:9), RTQKEASIC (SEQ ID No:4), MTQKEASIC (SEQ ID No:10), REQKEASIC (SEQ ID No:11), HMTQKEASIC (SEQ ID No:12), HREQKEASIC (SEQ ID No:13).**
- 9.- Péptidos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, protegidos en el término N o en el término C.
- 20 10.- Secuencia de DNA que codifica al menos uno de los péptidos definidos en las reivindicaciones de 1 a 8.
- 11.- Vector de expresión que comprende al menos una secuencia de DNA como se define en la reivindicación 10.
- 12.- Vector de acuerdo con la reivindicación 11 que comprende adicionalmente la secuencia que codifica un compuesto inmunomodulador seleccionado del grupo constituido por quimioquinas y citoquinas inmunomoduladoras.
- 25 13.- Vector de acuerdo con la reivindicación 12 en el cual dichas quimioquinas y citoquinas se seleccionan del grupo constituido por IL-12, IL-2, INF-gamma y GM-CSF.
- 14.- Uso de péptidos como se definen en las reivindicaciones 1 a 9 o vector de expresión como se define en las reivindicaciones 11-13 para la preparación de una vacuna para el tratamiento preventivo de tumores en individuos pertenecientes a población caucasiana.
- 15.- Uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el cual el tumor es carcinoma de colon rectal.
- 30 16.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15 en asociación con al menos un agente quimioterapéutico.
- 17.- Vacuna antitumoral que comprende al menos uno de los péptidos que se definen en las reivindicaciones 1 a 9 o el vector de expresión como se define en las reivindicaciones 11-13, junto con adyuvantes y excipientes farmacológicamente aceptables.
- 18.- Vacuna de acuerdo con la reivindicación 17, estando dirigida dicha vacuna contra el carcinoma de colon rectal.
- 35 19.- Anticuerpos monoclonales u oligoclonales específicos para uno de los péptidos que se definen en las reivindicaciones de 1 a 8.
- 20.- Uso de los anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 19 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores.
- 21.- Uso de acuerdo con la reivindicación 20 en el cual el tumor es carcinoma de colon rectal.
- 40 22.- Método para la determinación *in vitro* de la existencia de un tumor o seguimiento del paciente que padece el tumor en una muestra biológica, que comprende el uso de los anticuerpos monoclonales o policlonales que se definen en la reivindicación 19.
- 23.- Kit de diagnóstico que comprende los anticuerpos monoclonales u oligoclonales que se definen en la reivindicación 19 para determinación de la presencia de un tumor en una muestra biológica.
- 45 24.- Kit de acuerdo con la reivindicación 23 en el cual el tumor es carcinoma de colon rectal.

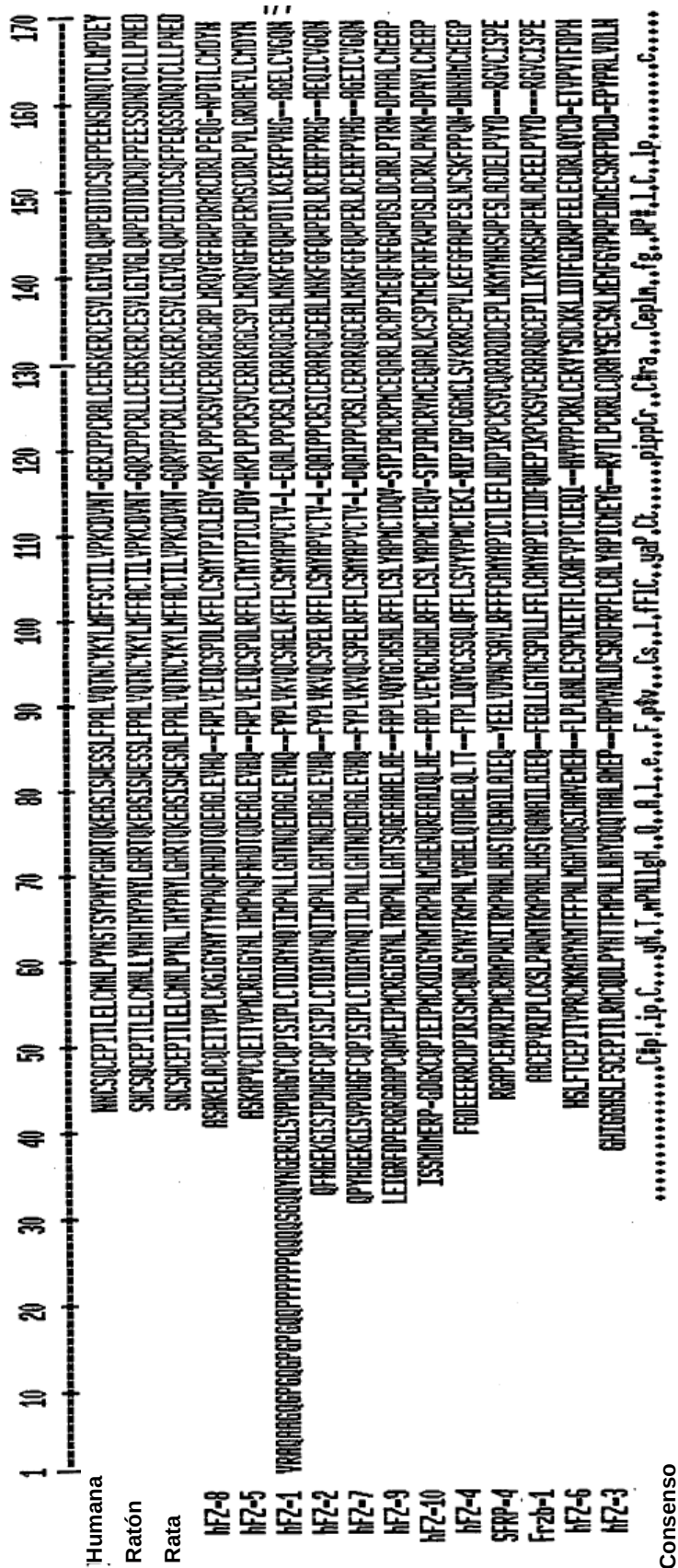


Fig. 1

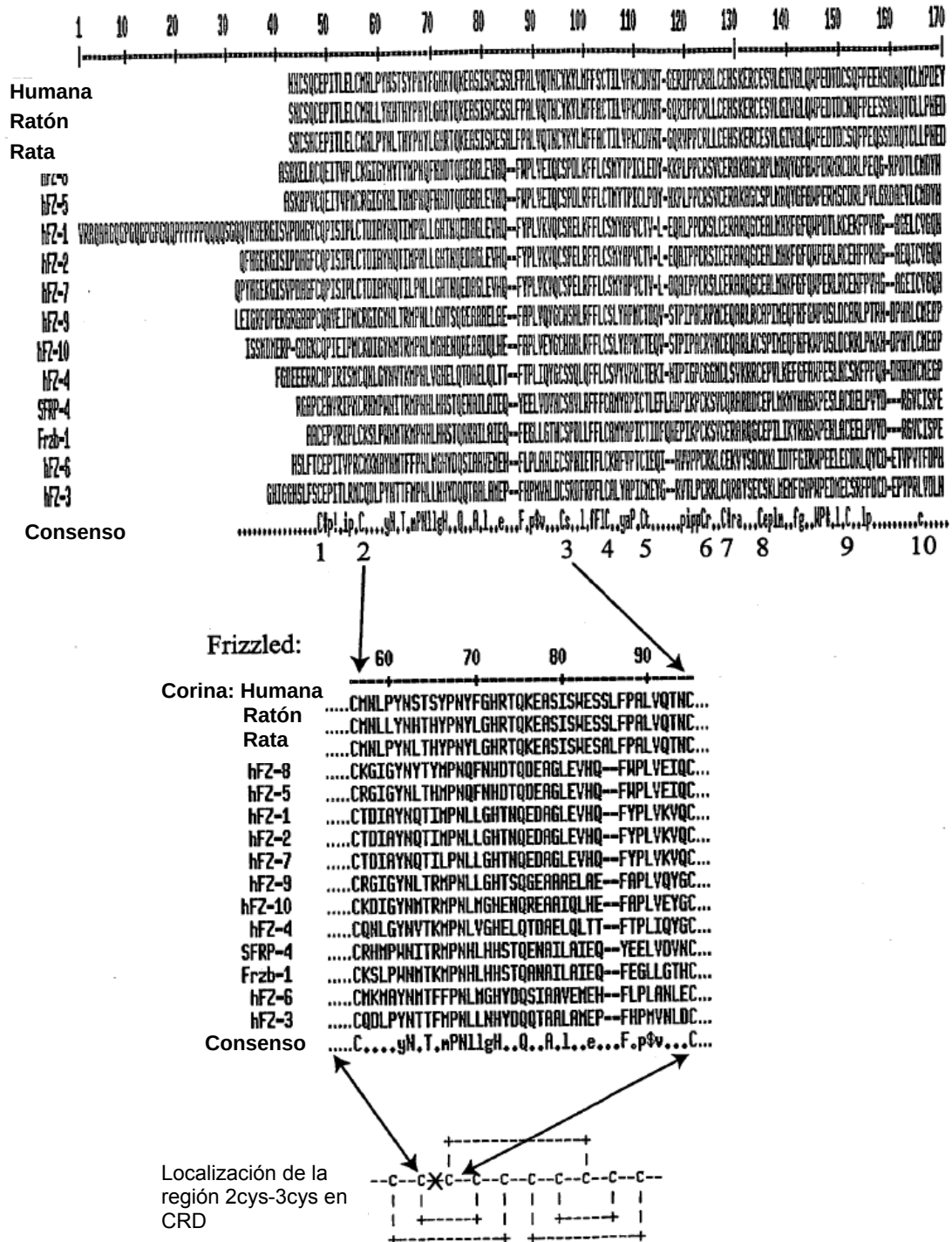


Fig. 2

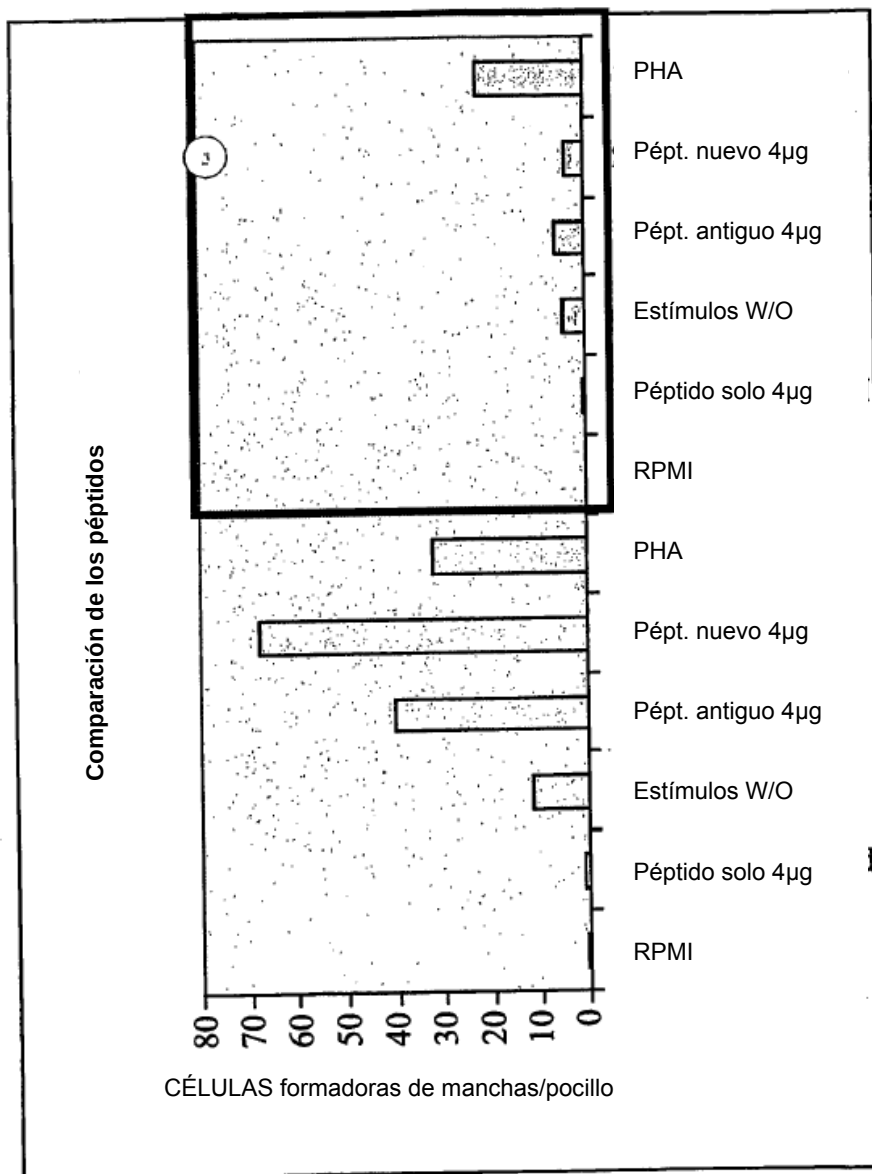


Fig. 3

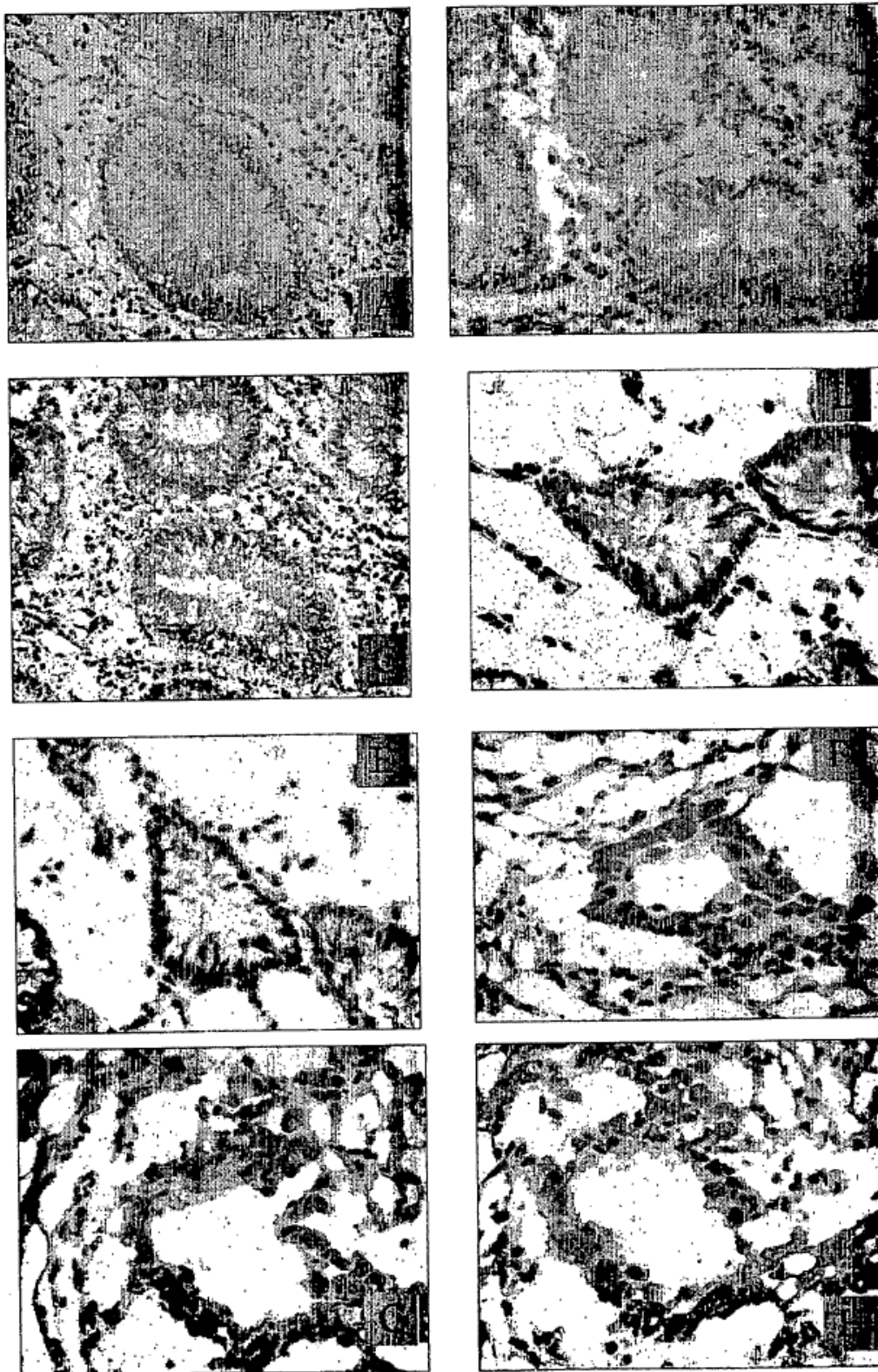


Fig. 4

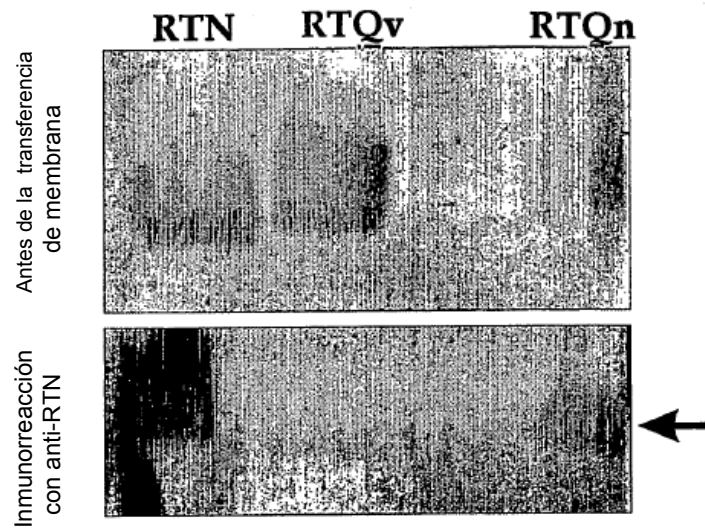


Fig. 5

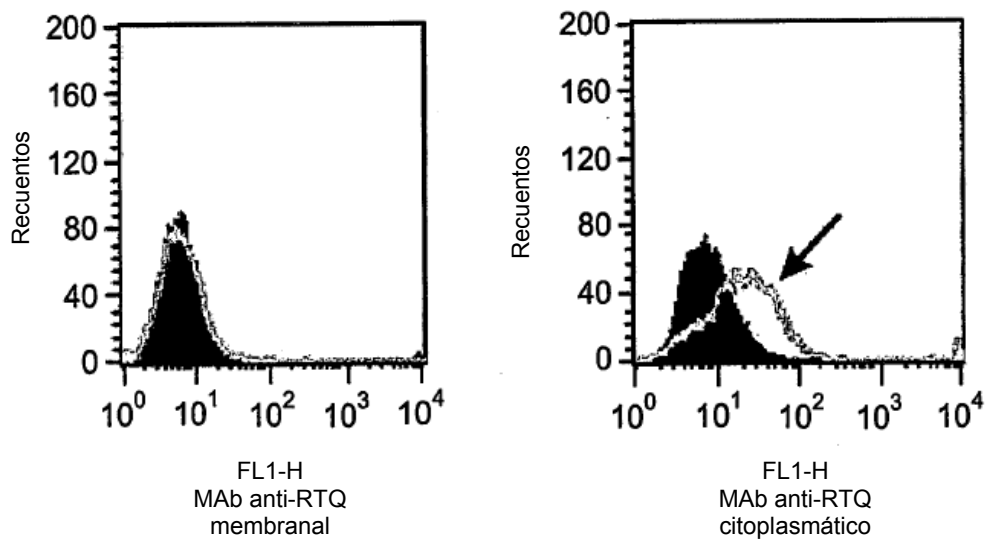


Fig. 6

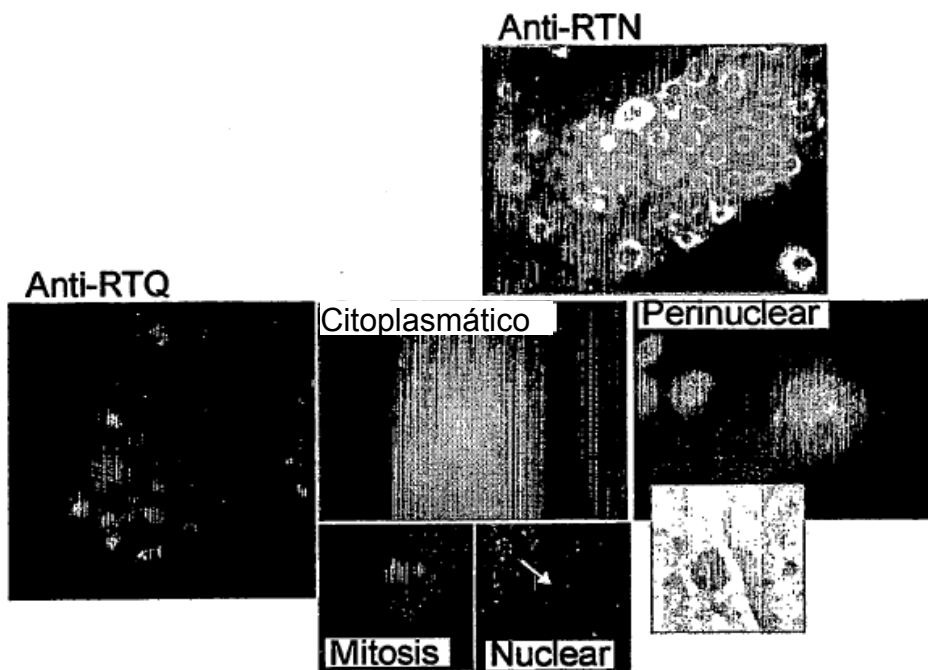


Fig. 7

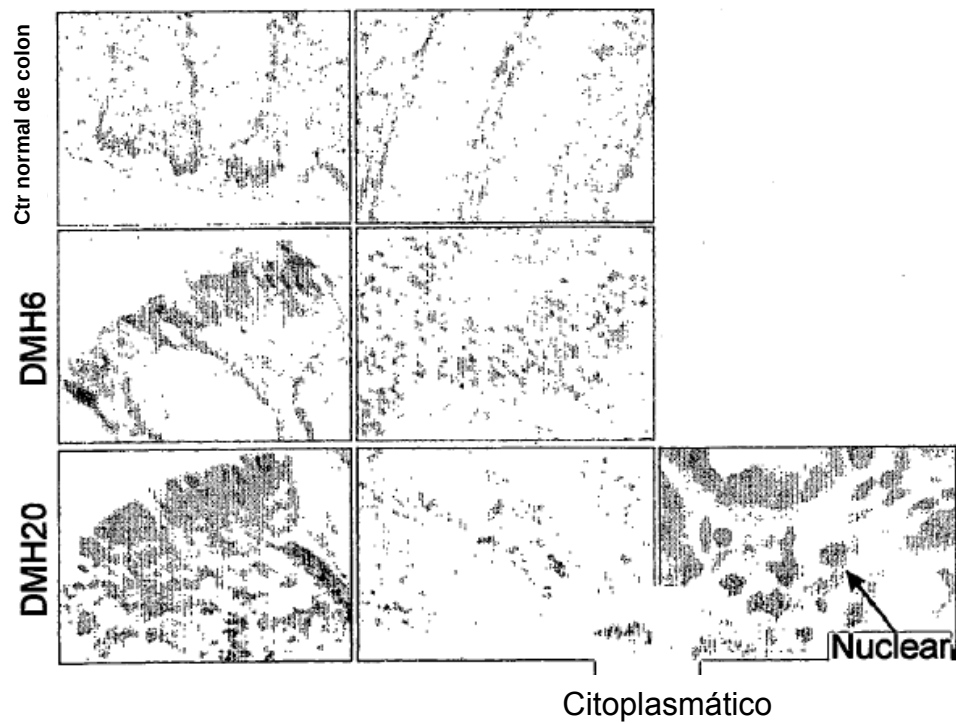


Fig. 8

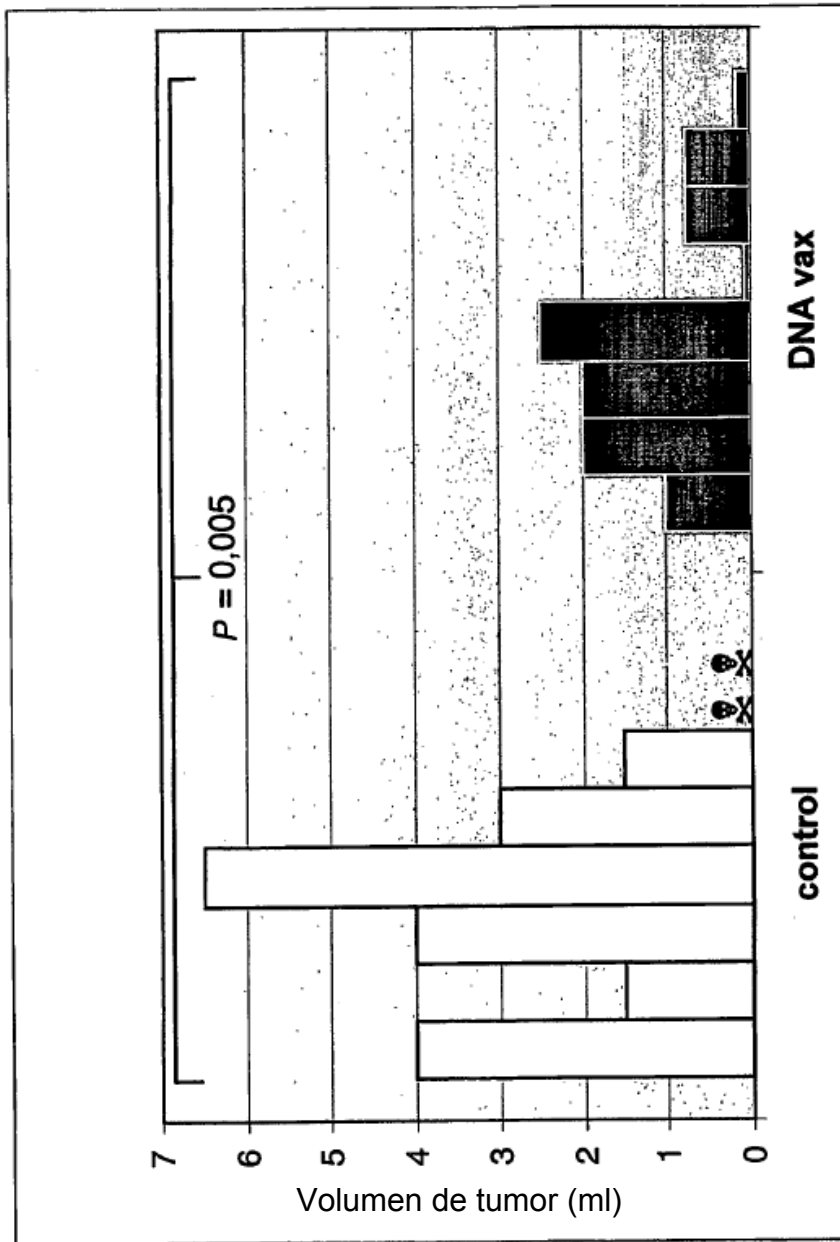


Fig. 9