

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 336**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2004 E 04726095 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1618130**

54 Título: **Vacuna terapéutica contra el cáncer**

30 Prioridad:

11.04.2003 DK 200300572

11.04.2003 US 461803 P

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

25.07.2013

73 Titular/es:

**SURVAC APS (100.0%)
ESTHERSVEJ 27, ST. TV.
2900 HELLERUP, DK**

72 Inventor/es:

**STRATEN, PER , THOR y
ANDERSEN, MADS, HALD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 415 336 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

Vacuna terapéutica contra el cáncer.

Campo de la invención

5 La presente solicitud describe fragmentos de ML-IAP (livina) y una vacuna terapéutica que comprende uno o más fragmentos de polipéptido de ML-IAP. La vacuna puede usarse para el tratamiento profiláctico, de mejora y/o curativo de, por ejemplo, cánceres y enfermedades autoinmunitarias.

Antecedentes de la invención

10 Está bien establecido que pueden reconocerse epítomos peptídicos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) humanos por linfocitos T citotóxicos (CTL) en el contexto de moléculas de CMH¹ y que la mayoría (si no la totalidad) de los tumores expresan tales antígenos. Por consiguiente, están realizándose apasionantes esfuerzos clínicos para seleccionar como diana estos TAA en estrategias tales como vacunación y terapia con células T adoptiva con el fin de generar respuestas de CTL antitumorales eficaces en pacientes²⁻⁵.

15 Para el melanoma, el tumor para el que se ha caracterizado el mayor número de TAA definidos por CTL, se han inducido potentes respuestas de CTL contra antígenos mediante vacunación y algunos pacientes han experimentado una remisión completa de su enfermedad^{6,7}.

20 Sin embargo, la inmunoselección de variantes con pérdida de antígeno puede ser un obstáculo grave para el potencial curativo de la mayoría de los epítomos de CTL conocidos en la oncología clínica, y la selección de tumores mutantes deficientes en antígenos es una limitación bien reconocida en las estrategias terapéuticas cuando se seleccionan como diana antígenos que no tienen un papel en el crecimiento del cáncer^{5,27,28}. El motivo es que la mayoría de los péptidos caracterizados se derivan de polipéptidos que no son esenciales para la supervivencia de la célula tumoral. Por tanto, si se inducen potentes respuestas de CTL contra estos antígenos peptídicos mediante medidas terapéuticas tales como vacunaciones, es muy probable que las células tumorales que carecen de la expresión del antígeno seleccionado como diana escapen de las respuestas inmunitarias provocadas^{8,9}.

25 Existe una necesidad de vacunas terapéuticas más eficaces y métodos mejorados de tratamiento de cáncer y enfermedades autoinmunitarias.

Sumario de la invención

30 La aplicación terapéutica de antígenos tumorales cuya expresión es esencial para la supervivencia de células tumorales representa una estrategia para el tratamiento del cáncer evitando que surjan variantes con pérdida de antígeno debido a inmunoselección, particularmente durante la terapia inmunitaria. Sin embargo, la identificación de fragmentos específicos que comprenden buenas propiedades antigénicas es difícil.

35 La familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP)¹² representa un ejemplo de antígenos tumorales cuya expresión es esencial para la supervivencia de células tumorales. La inhibición de la apoptosis tanto potencia la supervivencia de células cancerosas como previene que las células cancerosas escapen de terapias citotóxicas y la vigilancia inmunitaria.

Se han descrito varias IAP diferentes. Sus patrones de expresión diferentes sugieren un papel específico del órgano en promover la supervivencia celular durante el desarrollo y la homeostasis tisular. Mientras que X-IAP, C-IAP1 y C-IAP2 se expresan de manera relativamente ubicua, la survivina sólo se expresa en tejidos fetales y tumorales.

40 El polipéptido inhibidor de la apoptosis ML-IAP tiene un patrón de expresión bastante selectivo, ya que se detecta predominantemente en melanomas y algunos otros tejidos^{13,14}. La única otra IAP con expresión bien documentada en melanoma es survivina.

45 Puede detectarse ML-IAP en la mayoría de las líneas celulares de melanoma sometidas a prueba pero no en melanocitos normales¹⁴. Las líneas celulares de melanoma con altos niveles de ML-IAP son más resistentes a apoptosis inducida por fármacos de lo que lo son los melanocitos primarios normales. Por tanto, ML-IAP podría ser un factor celular crítico y niveles de expresión aumentados de ML-IAP conferir resistencia frente a estímulos apoptóticos, contribuyendo así a la patogénesis y la progresión de melanomas malignos.

El polipéptido de ML-IAP inhibe la apoptosis y la muerte celular inducidas mediante receptores de muerte y por tanto puede esperarse que agentes quimioterápicos se vean impedidos por la expresión de ML-IAP.

50 Por consiguiente, una expresión elevada de ML-IAP hace que las células de melanoma sean resistentes a estímulos apoptóticos y por tanto contribuye posiblemente a la patogénesis de este tumor maligno.

La presente solicitud demuestra que células T que se infiltran en el entorno tumoral o que circulan en la sangre periférica de pacientes con melanoma reconocen específicamente péptidos derivados de ML-IAP. Por tanto, por una

parte, ML-IAP es importante para la supervivencia de la célula cancerosa y por otra parte es una diana para células efectoras inmunológicas.

La presente invención se refiere en un aspecto a fragmentos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1) que consisten en al menos 9 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP y se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 301, consistiendo dicho fragmento de polipéptido como máximo en 15 aminoácidos consecutivos.

En otro aspecto preferido, la presente solicitud se refiere a una vacuna terapéutica que comprende ML-IAP (SEQ ID NO: 1), y/o uno o más fragmentos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1) que pueden provocar una respuesta de células T específica, incluyendo una respuesta que implica la activación de células T citotóxicas y/o células T cooperadoras (Th). La composición de vacuna comprende además preferiblemente un adyuvante y/o un portador.

En aún otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende ML-IAP (SEQ ID NO: 1), y/o uno o más fragmentos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1) que pueden provocar una respuesta de células T específica, incluyendo una respuesta que implica la activación de células T citotóxicas y/o células T cooperadoras (Th), y un compuesto bioactivo seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico o un agente inmunoterápico. La composición farmacéutica puede comprender además un adyuvante y/o un portador.

En todavía un aspecto adicional de la solicitud, se proporciona un kit de partes que comprende ML-IAP (SEQ ID NO: 1), y/o uno o más fragmentos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1) que pueden provocar una respuesta de células T específica, incluyendo una respuesta que implica la activación de células T citotóxicas y/o células T cooperadoras (Th), y un compuesto bioactivo seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico o un agente inmunoterápico, en el que el uno o más fragmentos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1) que pueden provocar una respuesta de células T específica y el compuesto bioactivo seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico o un agente inmunoterápico, pueden administrarse simultáneamente, o secuencialmente en cualquier orden. El kit de partes puede comprender opcionalmente un manual que comprende información sobre el régimen de dosificación o la administración del fragmento de ML-IAP y el compuesto bioactivo.

En todavía un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un fragmento de ML-IAP en la fabricación de una composición de vacuna que puede provocar una respuesta de células T específica en un individuo al que se le ha administrado la composición de vacuna.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un fragmento de ML-IAP en combinación con un agente bioactivo en la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad autoinmunitaria en un individuo que necesita dicho tratamiento.

En todavía un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para activar y expandir células T específicas para ML-IAP o fragmentos del mismo, comprendiendo dicho método las etapas de cultivar conjuntamente células T y ML-IAP, y/o al menos un fragmento del mismo, activando así las células T, y aislar células T específicas para ML-IAP activadas y/o células T específicas para fragmento de ML-IAP.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar a un individuo al que se le ha diagnosticado un cáncer, o con riesgo de desarrollar un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de administrar a dicho individuo al menos una célula T específica para ML-IAP aislada y activada, y/o al menos una célula T específica para fragmento de ML-IAP aislada y activada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Respuesta de células T contra el péptido ML-IAP₂₈₀ (QLCPICRAPV) medida en un ELISPOT en PBL del paciente con melanoma FM3 (figura 1A) o FM72 (figura 1B) y en TIL del paciente con melanoma PM9 (figura 1C) o FM72 (figura 1D). Se estimularon linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa a 3×10^5 células por pocillo por duplicado o bien sin o bien con péptido. Se calculó el número promedio de puntos específicos para péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando un dispositivo de barrido CCD y un sistema informático (figura 1E).

Figura 2

Respuesta de células T medida en ELISPOT contra los péptidos ML-IAP₂₈₀ (QLCPICRAPV), MLIAP₂₄₅ (RLQEERTCKV), MLIAP₂₃₀ (VLEPPGARDV) y MLIAP₉₀ (RLASFYDWPL) en muestras de TIL de nueve pacientes y en PBL de dos pacientes. Se estimularon linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa a 3×10^5 células por pocillo por duplicado o bien sin o bien con péptido. Se calculó el número promedio de puntos específicos para péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente usando un dispositivo de barrido CCD y un sistema informático.

Figura 3

5 Respuesta de células T contra el péptido ML-IAP₂₄₅₋₂₅₃ (RLQEERTCK) medida en un ELISPOT en PBL de 14 pacientes con melanoma. Se estimularon linfocitos T una vez con péptido antes de sembrarse en placa por triplicado o bien sin o bien con péptido. Se calculó el número promedio de células específicas para péptido (tras restar los puntos sin péptido añadido) para cada paciente como el número de células formadoras de puntos por 10⁵ células positivas para CD8 tras restar el número de puntos de referencia formados sin adición de péptido usando el analizador ImmunoSpot® Series 2.0 (CTL Analyzers, LLC, Cleveland, EE.UU.).

Figura 4

10 Detección *in situ* de CTL reactivo para ML-IAP. Se usó microscopía de barrido láser confocal para detectar CTL que reaccionaban con un anticuerpo anti-CD8 conjugado con Cy3 (canal rojo) y un constructo de HLA-A2/ML-IAP₂₈₀ multimérico conjugado con isotiocianato de fluoresceína (canal verde) (columnas primera y segunda) o con un constructo de HLA-A2/ML-IAP₂₄₅ multimérico conjugado con isotiocianato de fluoresceína (última columna) en tumores primarios de dos pacientes con melanoma positivo para HLA-A2.

Figura 5

15 Capacidad citolítica de CTL específicos para ML-IAP. Se aislaron CTL reactivos para ML-IAP₂₄₅ de PBL de los pacientes con melanoma CmeIE22 usando perlas magnéticas recubiertas con péptido antes de sembrarse en placa a 2x10³ células por pocillo por duplicado con células T2 o bien sin pulsar o bien pulsadas con ML-IAP₂₄₅ (RLQEERTCKV) (figura 5A). Se aislaron CTL reactivos para ML-IAP₂₈₀ de un ganglio linfático con infiltración de melanoma del paciente Cme172 usando perlas magnéticas recubiertas con péptido. Se analizaron estas células para determinar la lisis específica para células T2 con (cuadrado) o sin (triángulo) péptido ML-IAP₂₈₀ (QLCPICRAPV) (figura 5B). Lisis mediante células T aisladas mediante ML-IAP₂₈₀ de la línea celular de melanoma autóloga FM93 (triángulo), la línea celular negativa para HLA-A2, FM56 (círculo negro) y la línea celular diana de linfocitos citolíticos naturales, K562 (círculo blanco) (figura 5C).

Descripción detallada de la invención

25 A continuación en el presente documento se dan a conocer realizaciones preferidas de la presente solicitud.

Fragmentos de ML-IAP y composiciones de vacuna terapéuticas que comprenden tales fragmentos o ML-IAP de longitud completa

30 En realizaciones preferidas, la presente solicitud se refiere a fragmentos de ML-IAP y a composiciones de vacuna terapéuticas que comprenden uno o más fragmentos de ML-IAP, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de vacuna puede comprender además un portador y/o un compuesto adyuvante. También se proporciona una composición de vacuna que comprende ML-IAP de longitud completa (SEQ ID NO: 1).

A continuación en el presente documento, se indican fragmentos preferidos de residuos de aminoácido de ML-IAP consecutivos según la presente solicitud. Los fragmentos pueden seleccionarse de la secuencia de residuos de aminoácido de ML-IAP de longitud completa indicada a continuación en el presente documento como SEQ ID NO: 1:

35 mgpkdsakcl hrgppqshwa agdgptqerc gprslgspvl gldtcrawdh vdgqilgqlr plteeeeeeg agatlsrgpa fpgmgseeir lasfydwplk aevppellaa agffhtghqd kvrcffcygg lqswkrghdd wthakwfpsc qflrskgrd fvhsvqeths qlgswdpwe epedaapvap svpasgypel pptrrevqse saqepggvsp aeaqrawwvl eppgardvea qlrlqeert kvcldravs ivfvpchgvl caecapglql cpicrapvrs rvrtfls (SEQ ID NO: 1).

40 No es posible predecir fácilmente qué fragmentos de un polipéptido dado, tal como ML-IAP, constituirán buenos antígenos o dianas eficaces para respuestas de CTL espontáneas. Por tanto, es crítico identificar péptidos que sean adecuados como antígenos. La presente solicitud proporciona métodos para someter a prueba fragmentos de ML-IAP, es decir pruebas para determinar la afinidad de unión a moléculas de HLA, respuesta de CTL provocada y/o cualquier otra propiedad antigénica para identificar aquellos fragmentos de ML-IAP que constituyen buenos antígenos. Además, la invención proporciona péptidos de ML-IAP útiles.

45 La unión de péptidos al CMH es una etapa crucial en la generación de una respuesta de células T. Por tanto, una manera comúnmente usada de identificar epítopos de CTL es el uso de algoritmos sofisticados, que incorporan información sobre la contribución de todas las cadenas laterales peptídicas a la unión global de un péptido particular en un intento por mejorar la predicción de epítopos de CTL. Sin embargo, en primer lugar se ha descrito que no hay una correlación fuerte entre la unión real y predicha de un péptido a CMH a partir de algoritmos informáticos (20). En segundo lugar, la unión de un péptido a CMH es uno de varios factores diferentes que determinan la inmunogenicidad de un péptido dado. Estos incluyen el nivel de expresión de la proteína fuente relevante, procesamiento, transporte de TAP, nivel de expresión del CMH de clase I sobre la superficie celular, repertorio de TCR, sensibilidad de CTL, inmunosupresión y citocinas (23). Por tanto, hay muchos factores que determinan una respuesta de CTL contra un péptido dado. Además, con frecuencia muchos epítopos inmunodominantes en respuestas de CTL frente a proteínas propias pueden ser determinantes subdominantes o crípticos, en vez de

(SEQ ID NO: 220); paeaqrww (SEQ ID NO: 221); aeaqrwwv (SEQ ID NO: 222); eaqrwwvl (SEQ ID NO: 223); aqrwwvle (SEQ ID NO: 224); qrwwvlep (SEQ ID NO: 225); rawwvlepp (SEQ ID NO: 226); awwvleppg (SEQ ID NO: 227); wwvleppga (SEQ ID NO: 228); wvleppgar (SEQ ID NO: 229); vleppgard (SEQ ID NO: 230); leppgardv (SEQ ID NO: 231); eppgardve (SEQ ID NO: 232); ppgardvea (SEQ ID NO: 233); pgardveaq (SEQ ID NO: 234); gardveaql (SEQ ID NO: 235); ardveaqlr (SEQ ID NO: 236); rdveaqlrr (SEQ ID NO: 237); dveaqlrrl (SEQ ID NO: 238); veaqlrrlq (SEQ ID NO: 239); eaqlrrlqe (SEQ ID NO: 240); aqlrrlqee (SEQ ID NO: 241); qlrrlqeer (SEQ ID NO: 242); lrrlqeer (SEQ ID NO: 243); rrlqeerc (SEQ ID NO: 244); rlqeertck (SEQ ID NO: 245); lqeertckv (SEQ ID NO: 246); qeertckvc (SEQ ID NO: 247); eertckvcl (SEQ ID NO: 248); ertckvcl (SEQ ID NO: 249); rtckvcl (SEQ ID NO: 250); tckvcl (SEQ ID NO: 251); ckvcl (SEQ ID NO: 252); kvcl (SEQ ID NO: 253); vcl (SEQ ID NO: 254); ddravsiv (SEQ ID NO: 255); ldravsivf (SEQ ID NO: 256); dravsivfv (SEQ ID NO: 257); ravsivfvp (SEQ ID NO: 258); avsvivfvp (SEQ ID NO: 259); vsivfvp (SEQ ID NO: 260); sivfvp (SEQ ID NO: 261); ivfvp (SEQ ID NO: 262); vfvpcghiv (SEQ ID NO: 263); fvp (SEQ ID NO: 264); vpcghivca (SEQ ID NO: 265); poghivcae (SEQ ID NO: 266); cghivcaec (SEQ ID NO: 267); ghivcaeca (SEQ ID NO: 268); hlvcaecap (SEQ ID NO: 269); lvcaecap (SEQ ID NO: 270); vcaecap (SEQ ID NO: 271); caecap (SEQ ID NO: 272); aecap (SEQ ID NO: 273); ecap (SEQ ID NO: 274); cap (SEQ ID NO: 275); ap (SEQ ID NO: 276); p (SEQ ID NO: 277); g (SEQ ID NO: 278); l (SEQ ID NO: 279); q (SEQ ID NO: 280); i (SEQ ID NO: 281); c (SEQ ID NO: 282); p (SEQ ID NO: 283); r (SEQ ID NO: 284); s (SEQ ID NO: 285); v (SEQ ID NO: 286); a (SEQ ID NO: 287); p (SEQ ID NO: 288); v (SEQ ID NO: 289); r (SEQ ID NO: 290).

20 En una realización de la presente invención, preferiblemente el fragmento no es SEQ ID NO: 35.

Fragmentos que comprenden una secuencia de 10 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP

La presente solicitud también se refiere a fragmentos que comprenden o que consisten en 10 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), tales como por ejemplo los 10 residuos de aminoácido más N-terminales de SEQ ID NO: 1, es decir mgpkdsakcl (SEQ ID NO: 291), así como a composiciones de vacuna que comprenden tales fragmentos. Por tanto, pueden obtenerse fragmentos adicionales que comprenden o que consisten en 10 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP de la siguiente manera:

seleccionar uno cualquiera de los fragmentos anteriores definidos por de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 289 (es decir un fragmento indicado anteriormente definido por SEQ ID NO: N, en el que N es un entero mayor que 2 y menor que 290), y

30 añadir el residuo de aminoácido C-terminal de SEQ ID NO: N+1 al residuo de aminoácido C-terminal del fragmento seleccionado en etapa i).

En una realización de la presente solicitud, preferiblemente el fragmento no es SEQ ID NO: 299.

Fragmentos que comprenden una secuencia de 11 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP

La presente solicitud también se refiere a fragmentos que comprenden o que consisten en 11 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), tales como por ejemplo los 11 residuos de aminoácido más N-terminales de SEQ ID NO: 1, es decir mgpkdsakclh (SEQ ID NO: 292), así como a composiciones de vacuna que comprenden tales fragmentos. Por tanto, pueden obtenerse fragmentos adicionales que comprenden o que consisten en 11 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP de la siguiente manera:

seleccionar uno cualquiera de los fragmentos anteriores definidos por de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 288 (es decir un fragmento indicado anteriormente definido por SEQ ID NO: N, en el que N es un entero mayor que 2 y menor que 289), y

añadir los 2 residuos de aminoácido más C-terminales de SEQ ID NO: N+2 al residuo de aminoácido C-terminal del fragmento seleccionado en la etapa i).

Fragmentos que comprenden una secuencia de 12 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP

La presente solicitud también se refiere a fragmentos que comprenden o que consisten en 12 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), tales como por ejemplo los 12 residuos de aminoácido más N-terminales de SEQ ID NO: 1, es decir mgpkdsakclhr (SEQ ID NO: 293), así como a composiciones de vacuna que comprenden tales fragmentos. Por tanto, pueden obtenerse fragmentos adicionales que comprenden o que consisten en 12 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP de la siguiente manera:

seleccionar uno cualquiera de los fragmentos anteriores definidos por de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 287 (es decir un fragmento indicado anteriormente definido por SEQ ID NO: N, en el que N es un entero mayor que 2 y menor que 288), y

añadir los 3 residuos de aminoácido más C-terminales de SEQ ID NO: N+3 al residuo de aminoácido C-terminal del fragmento seleccionado en la etapa i).

Fragmentos que comprenden una secuencia de 13 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP

La presente solicitud también se refiere a fragmentos que comprenden o que consisten en 13 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), tales como por ejemplo los 13 residuos de aminoácido más N-terminales de SEQ ID NO: 1, es decir mgpkdsakcihrq (SEQ ID NO: 294), así como a composiciones de vacuna que comprenden tales fragmentos. Por tanto, generalmente pueden obtenerse fragmentos adicionales que comprenden o que consisten en 13 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP de la siguiente manera:

seleccionar uno cualquiera de los fragmentos anteriores definidos por de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 286 (es decir un fragmento indicado anteriormente definido por SEQ ID NO: N, en el que N es un entero mayor que 2 y menor que 287), y

añadir los 4 residuos de aminoácido más C-terminales de SEQ ID NO: N+4 al residuo de aminoácido C-terminal del fragmento seleccionado en la etapa i).

Fragmentos que comprenden una secuencia de 14 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP

La presente solicitud también se refiere a fragmentos que comprenden o que consisten en 14 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), tales como por ejemplo los 14 residuos de aminoácido más N-terminales de SEQ ID NO: 1, es decir mgpkdsakclhrqp (SEQ ID NO: 295), así como a composiciones de vacuna que comprenden tales fragmentos. Por tanto, generalmente pueden obtenerse fragmentos adicionales que comprenden o que consisten en 14 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP de la siguiente manera:

seleccionar uno cualquiera de los fragmentos anteriores definidos por de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 285 (es decir un fragmento indicado anteriormente definido por SEQ ID NO: N, en el que N es un entero mayor que 2 y menor que 286), y

añadir los 5 residuos de aminoácido más C-terminales de SEQ ID NO: N+5 al residuo de aminoácido C-terminal del fragmento seleccionado en la etapa i).

Fragmentos que comprenden una secuencia de 15 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP

La presente solicitud también se refiere a fragmentos que comprenden o que consisten en 15 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), tales como por ejemplo los 15 residuos de aminoácido más N-terminales de SEQ ID NO: 1, es decir mgpkdsakclhrqpq (SEQ ID NO: 296), así como a composiciones de vacuna que comprenden tales fragmentos. Por tanto, generalmente pueden obtenerse fragmentos adicionales que comprenden o que consisten en 15 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP de la siguiente manera:

seleccionar uno cualquiera de los fragmentos anteriores definidos por de SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 284 (es decir un fragmento indicado anteriormente definido por SEQ ID NO: N, en el que N es un entero mayor que 2 y menor que 285), y

añadir los 6 residuos de aminoácido más C-terminales de SEQ ID NO: N+6 al residuo de aminoácido C-terminal del fragmento seleccionado en la etapa i).

Por consiguiente, para cualquiera de los fragmentos anteriores de ML-IAP que comprenden o que consisten en desde 10 hasta 15 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP, N es un entero desde 3 hasta preferiblemente menos de 290, tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284 (fragmentos que comprenden o que consisten en 15 o menos residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP), 285 (fragmentos que comprenden o que consisten en 14 o menos residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP), 286 (fragmentos que comprenden o que consisten en 13 o menos residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP), 287 (fragmentos que comprenden o que consisten en 12 o menos residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP), 288 (fragmentos que comprenden o que consisten en 11 o menos residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP), 289 (fragmentos que comprenden o que consisten en 10 o menos residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP).

Por consiguiente, en realizaciones preferidas, la presente solicitud se refiere a fragmentos de ML-IAP que comprenden o que consisten en más de 9 residuos de aminoácido consecutivos. Tales fragmentos pueden

235 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 236 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 237 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 238 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 239 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 240 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 241 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 242 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 243 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 244 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 245 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 246 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 247 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 248 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 249 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 250 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 251 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 252 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 253 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 254 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 255 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 256 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 257 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 258 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 259 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 260 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 261 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 262 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 263 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 264 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 265 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 266 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 267 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 268 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 269 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 270 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 271 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 272 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 273 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 274 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 275 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 276 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 277 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 278 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 279 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 280 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 281 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 282 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 283 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 284 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 285 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 286 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 287 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 288 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 289 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 290 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 291 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 292 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 293 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 294 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 295 de SEQ ID NO: 1, tal como el residuo 296 de SEQ ID NO: 1, por ejemplo el residuo 297 de SEQ ID NO: 1,

con la condición de que la longitud de un fragmento dado, medida como el número de residuos de aminoácido, es más corta que o igual que el resultado obtenido restando de 297 (el número de residuos en la secuencia de ML-IAP de longitud completa) la posición (el número) en SEQ ID NO: 1 del residuo de aminoácido N-terminal del fragmento en cuestión.

A continuación en el presente documento en la tabla 1 se indican fragmentos muy preferidos de ML-IAP y se caracterizan por su valor de C₅₀ (µM) como la concentración del péptido requerida para la mitad de la unión máxima a HLA-A2. El intervalo de valores indicado en subíndice indica la posición del primer aminoácido en la secuencia.

Tabla 1

Fragmento de ML-IAP	Secuencia	C ₅₀ (µM)
ML-IAP ₂₄₅	RLQEERTCKV (SEQ ID NO: 297)	1
ML-IAP ₂₈₀	QLCPICRAPV (SEQ ID NO: 298)	20
ML-IAP ₉₀	RLASFYDWPL (SEQ ID NO: 299)	0,2
ML-IAP ₁₅₄	LLRSKGRDFV (SEQ ID NO: 300)	10
ML-IAP ₂₃₀	VLEPPGARDV (SEQ ID NO: 301)	>100
ML-IAP ₉₈	PLTAEVPPPEL (SEQ ID NO: 302)	>100
ML-IAP ₂₆₁	SIVFVPCG	Sin unión
ML-IAP ₃₄	SLGSPVLGL (SEQ ID NO: 35)	1
ML-IAP ₅₄	QILGQLRPL (SEQ ID NO: 55)	1
ML-IAP ₉₉	LTAEVPPPEL (SEQ ID NO: 100)	0,9
ML-IAP ₈₃	GMGSEELRL (SEQ ID NO: 84)	30
ML-IAP ₂₀₀	ELPTPRREV (SEQ ID NO: 200)	Sin unión

Fragmentos de polipéptido de ML-IAP muy preferidos

En un aspecto, la presente solicitud se refiere a un fragmento de polipéptido que puede provocar una respuesta de células T específica, comprendiendo dicho fragmento un péptido que consiste en al menos 9 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1), en el que dicho péptido se selecciona del grupo que consiste en rlqeertck (SEQ ID NO: 245), qilgqlrpl (SEQ ID NO: 55), ltaevppel (SEQ ID NO: 100), gmgseelrl (SEQ ID NO: 84), elptprrev (SEQ ID NO: 200), rlqeertckv (SEQ ID NO: 297), qlcpicrapv (SEQ ID NO: 298), llrskgrdfv (SEQ ID NO: 300), vleppgardv (SEQ ID NO: 301) y pltaevppel (SEQ ID NO: 302); y comprendiendo dicho fragmento de polipéptido como máximo 100 aminoácidos.

Preferiblemente el fragmento de polipéptido comprende como máximo 90, más preferiblemente como máximo 80, incluso más preferiblemente como máximo 70, aún más preferiblemente como máximo 60, incluso más preferiblemente como máximo 50, aún más preferiblemente como máximo 40, incluso más preferiblemente como máximo 30, aún más preferiblemente como máximo 20, incluso más preferiblemente como máximo 18, aún más preferiblemente como máximo 16, incluso más preferiblemente como máximo 15, aún más preferiblemente como máximo 14, incluso más

preferiblemente como máximo 13, aún más preferiblemente como máximo 12, tal como como máximo 11, por ejemplo como máximo 10, tal como como máximo 9 aminoácidos.

5 Se prefiere que el fragmento de polipéptido comprenda al menos 9, tal como al menos 10, por ejemplo al menos 11, tal como al menos 12, por ejemplo al menos 13, tal como al menos 14, por ejemplo al menos 15 aminoácidos consecutivos de ML-IAP (SEQ ID: 1). Por tanto, el fragmento de polipéptido puede consistir en 9, tal como 10, por ejemplo 11, tal como 12, por ejemplo 13, tal como 14, por ejemplo 15 aminoácidos consecutivos de SEQ ID: 1, que comprende (SEQ ID NO: 245), (SEQ ID NO: 55), (SEQ ID NO: 100), (SEQ ID NO: 84), (SEQ ID NO: 200), (SEQ ID NO: 297), (SEQ ID NO: 298), (SEQ ID NO: 300), (SEQ ID NO: 301) o (SEQ ID NO: 302).

Caracterización funcional de fragmentos de ML-IAP preferidos

10 Fragmentos de ML-IAP muy preferidos según la presente solicitud son fragmentos de ML-IAP que pueden provocar una respuesta de células T específica, que puede ser o bien una respuesta de células T citotóxicas o bien una respuesta de células T cooperadoras, pero que es preferiblemente una respuesta de células T citotóxicas. Pueden usarse varios métodos del estado de la técnica diferentes para identificar fragmentos de péptido que pueden provocar una respuesta de células T específica. Sin embargo, es difícil predecir si un péptido dado podrá provocar
15 una respuesta de células T específica. Aunque modelos informáticos pueden predecir epítopos funcionales, habitualmente se requiere evidencia experimental con el fin de verificar si un epítipo predicho es de hecho un epítipo funcional. Ni siquiera fragmentos que se asocian con moléculas de CMH con alta afinidad darán lugar necesariamente a una respuesta de células T determinada por ejemplo mediante ensayo ELISPOT (véase a continuación en el presente documento) o en un individuo.

20 Por tanto, en una realización de la presente solicitud, se prefiere que los fragmentos de ML-IAP puedan asociarse con una molécula de CMH, se prefiere incluso más que el fragmento pueda asociarse con una molécula de CMH de clase I. Moléculas de clase I de CMH preferidas son moléculas de clase I de CMH que se producen con frecuencia, por ejemplo las moléculas de clase I de CMH descritas a continuación en el presente documento. La asociación entre ML-IAP y una molécula de CMH puede determinarse por ejemplo usando el ensayo de ensamblaje descrito a
25 continuación en el presente documento.

Un fragmento de ML-IAP preferido descrito en la solicitud puede caracterizarse por tener un valor de C_{50} , medido como la concentración (μM) del fragmento de polipéptido requerida para la mitad de la unión máxima a una molécula de CMH, preferiblemente a una molécula de clase I de CMH, en el intervalo de desde 500 hasta 1000, tal como en el intervalo de 200 a 500, por ejemplo en el intervalo de 100 a 200, tal como en el intervalo de 50 a 100, por ejemplo en el intervalo de 25 a 50, tal como en el intervalo de 10 a 25, por ejemplo en el intervalo de 5 a 10 tal como en el intervalo de 1 a 5, por ejemplo en el intervalo de 0,1 a 1 tal como en el intervalo de 0,05 a 0,1, por ejemplo inferior a 0,05. Dicha molécula de clase I de CMH puede ser cualquier molécula de clase I de CMH, por ejemplo una molécula de HLA-A, tal como HLA-A2. Moléculas de clase I de CMH preferidas son moléculas de clase I de CMH que se producen con frecuencia, por ejemplo las moléculas de clase I de CMH descritas a continuación en el presente documento.
35

Fragmentos de ML-IAP más preferidos incluyen fragmentos de ML-IAP en los que el valor de C_{50} es inferior a 1000 μM , incluso más preferiblemente inferior a 200 μM , aún más preferiblemente inferior a 100 μM , aún incluso más preferiblemente inferior a 75 μM , incluso más preferiblemente inferior a 50 μM , aún más preferiblemente inferior a 40 μM , incluso más preferiblemente inferior a 31 μM , aún más preferiblemente inferior a 25 μM , incluso más preferiblemente inferior a 10 μM , aún más preferiblemente inferior a 5 μM , incluso más preferiblemente inferior a 1 μM , aún más preferiblemente inferior a 0,5 μM , incluso más preferiblemente inferior a 0,2 μM , aún más preferiblemente inferior a 0,1 μM , incluso más preferiblemente inferior a 0,05 μM , en los que el valor de C_{50} es la concentración del péptido requerida para la mitad de la unión máxima a una molécula de CMH, preferiblemente a una molécula de clase I de CMH. Dicha molécula de clase I de CMH puede ser cualquier molécula de clase I de CMH, tal como una molécula de HLA-A, por ejemplo HLA-A2. Moléculas de clase I de CMH preferidas son moléculas de clase I de CMH que se producen con frecuencia, por ejemplo las moléculas de clase I de CMH descritas a continuación en el presente documento.
40

Se prefiere que el valor de C_{50} se determine según el ensayo de ensamblaje descrito a continuación en el presente documento.

50 Por consiguiente, en una realización de la presente invención pueden seleccionarse fragmentos de ML-IAP preferidos del grupo que consiste en ML-IAP₂₈₀, ML-IAP₈₃, ML-IAP₁₅₄, ML-IAP₂₄₅, ML-IAP₅₄ y ML-IAP₉₉. Pueden seleccionarse fragmentos de ML-IAP más preferidos del grupo que consiste en ML-IAP₂₄₅, ML-IAP₅₄ y ML-IAP₉₉.

Ensayo de ensamblaje

55 Pueden llevarse a cabo ensayos de ensamblaje para determinar la unión de los péptidos sintéticos a moléculas de CMH de clase I marcadas metabólicamente con [³⁵S]-metionina tal como se describe a continuación. El experto en la técnica apreciará que el protocolo puede adoptarse para cualquier péptido y cualquier molécula de CMH de clase I. Previamente se ha demostrado que la concentración de péptido que da como resultado la mitad de la unión máxima

en un ensayo de ensamblaje para determinar la unión del péptido a CMH de clase I es una buena aproximación de K_a ¹⁵.

5 En resumen, se marcaron metabólicamente células deficientes en TAP con [³⁵S]-metionina (Amersham, Freiburg, Alemania). Se lisaron las células en 0,5 ml de tampón de lisis (NaCl 150 mM, TrisHCl 50 mM, NP-40 al 0,5% (Fluka, Buchs, Suiza), EDTA 5 mM, pH 7,5) con Mega-9 al 0,5% (Sigma, St. Louis, EE.UU.) en presencia de inhibidores de proteasa (PMSF 2 mM, yodoacetamida 5 mM, pepstatina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml) con o sin péptido sintético (para una lista de péptidos de control positivos, véase la tabla 2).

10 Tras 20 min. de incubación, se extrajeron los núcleos celulares mediante centrifugación (5 min., 10.000 g) y 50 µl (10% v/v) de microorganismos *Staphylococcus aureus* recién lavados (Pansorbin, Calbiochem, Nottingham, R.U.). Al día siguiente se retiró Pansorbin mediante centrifugación (12 min., 16.000 g) y se añadió el anticuerpo monoclonal apropiado a una concentración final de 10 µg/ml, se incubó durante 90 min., seguido por adición de proteína A-Sepharose (75 µl, 10% v/v) e incubación durante 1 h. Se lavaron las perlas 4 veces y se almacenaron a -20°C hasta el análisis mediante electroforesis.

15 Para determinar la unión de péptido a HLA-B*2705 y H-2K^k se usó un ensayo de ensamblaje modificado tal como se describió anteriormente³⁹. Cuando se transfectan en células T2, B*2705 y K^k son inusualmente estables en ausencia de péptido añadido. Para evitar esto, se introdujo una etapa de calentamiento leve con el fin de desestabilizar preferiblemente moléculas de CMH que permanecen vacías tras la incubación con péptido. En resumen, se incuban los lisados celulares con péptido durante 2 h a 4°C, permitiendo la unión de péptido a moléculas de clase I vacías. A continuación, se calentaron los lisados celulares (60°C durante 5 min. para T2-B*2705 o 55°C durante 2 min. para T2-K^k). Entonces se añadió Pansorbin a las muestras como en el ensayo de ensamblaje convencional.

Electroforesis

25 En el caso de un ensayo de ensamblaje con el anticuerpo monoclonal W6/32 dependiente de la conformación específico para clase I de HLA, se eluyeron muestras en tampón de reducción (urea 9,5 M, NP-40 al 2%, 2-mercaptoetanol al 5%, Ampholine al 2%, intervalo de pH de 3,5-9,5 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia)) y se enfocaron durante 16 h a 880 V en geles de isoelectroenfoque (IEF) de poliacrilamida al 5,5%^{2d,39}.

30 Se eluyeron muestras de ensayos de ensamblaje con anticuerpos específicos para alelo mediante ebullición (5 min.) en tampón de reducción de SDS (TrisHCl 50 mM pH 6,8, SDS al 2%, 2-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 2,5%) y se sometieron a electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% (1 h a 200 V). Se fijaron todos los geles en ácido acético al 10% con metanol al 5% y se secaron sobre papel 3 MM (Whatman, Maidstone, R.U.). Se cuantificaron bandas de cadena pesada de CMH usando el programa Imagequant Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EE.UU.). La intensidad de la banda está directamente relacionada con la cantidad de complejo de CMH de clase I unido a péptido recuperado durante el ensayo. Por tanto, puede determinarse el valor de C_{50} (µM) como la concentración del péptido requerida para la mitad de la unión máxima a CMH. Las afinidades de unión de los péptidos analizados se determinan según su eficacia de estabilización de moléculas de clase I de HLA. La afinidad de unión se representa como la concentración de péptido requerida para alcanzar la mitad de la estabilización máxima de una molécula de HLA apropiada. Análisis previos han mostrado que los valores de C_{50} medidos en este ensayo se ajustan bien con la constante de disociación (Kd) del complejo³¹.

35 Puede realizarse una predicción de epítomos usando un algoritmo adecuado, preferiblemente un algoritmo basado en el libro "MHC Ligands and Peptide Motifs" de H.G. Rammensee, J. Bachmann y S. Stevanovic. Sin embargo, tal predicción de epítomos no es fiable, y por tanto se prefiere dentro de la presente invención que se identifiquen fragmentos de ML-IAP usando ensayos ELISPOT y/o ensayos de unión tal como se describe en otras partes en el presente documento. Un método de predicción de epítomos es usando el algoritmo de predicción de epítomos SYFPEITHI. Pueden encontrarse explicaciones adicionales sobre el algoritmo en HG Rammensee, Bachmann, NPN Emmerich, OA Bacher y S Stevanovic (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics 50:213-219. La base de datos de SYFPEITHI puede encontrarse en el sitio de Internet: <http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/CMHServer.dll/home.htm>.

40 El algoritmo calcula la fuerza de ligamiento predicha a un tipo de HLA definido para una secuencia de aminoácidos. Un ML-IAP preferido tiene una fuerza de ligamiento predicha a una molécula de HLA dada calculada usando dicho algoritmo de al menos 10, preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 15, incluso más preferiblemente al menos 16, tal como al menos 18, por ejemplo al menos 20.

45 Sin embargo, fragmentos incluso más preferidos descritos en la solicitud son fragmentos de ML-IAP que pueden provocar una respuesta de células T específica determinada mediante un ensayo ELISPOT, por ejemplo el ensayo ELISPOT descrito a continuación en el presente documento. Algunos fragmentos de ML-IAP, aunque no se unen a CMH con alta afinidad, todavía pueden dar lugar a una respuesta de células T determinada mediante ELISPOT. Otros fragmentos de ML-IAP pueden ser capaces de unirse a CMH con alta afinidad y dar lugar a una respuesta de células T determinada mediante ELISPOT. Ambas clases de fragmentos son fragmentos preferidos según la invención.

Por tanto, fragmentos preferidos descritos en la solicitud son fragmentos de ML-IAP que pueden provocar una respuesta de células T específica medida mediante un ensayo ELISPOT_T, en el que se miden más de 50 puntos específicos para fragmento por 10^8 células, más preferiblemente por 10^7 células, incluso más preferiblemente por 10^6 células, aún más preferiblemente por 10^5 células, por ejemplo por 10^4 células.

- 5 Por tanto, en una realización descrita en la solicitud, pueden seleccionarse fragmentos de ML-IAP preferidos del grupo que consiste en ML-IAP₂₄₅ (SEQ ID NO: 297), ML-IAP₂₈₀ (SEQ ID NO: 298) y ML-IAP₂₃₀, (SEQ ID NO: 301). Fragmentos preferidos adicionales son péptidos que comprenden o incluso más preferiblemente que consisten en SEQ ID NO: 245.

ELISPOT

10 Estimulación de antígenos de PBL

Se obtuvo sangre periférica de pacientes con melanoma antes de la vacunación y tras una serie de vacunaciones. Con el fin de identificar precursores de células T específicas para péptido, se usaron linfocitos de sangre periférica (PBL) directamente en el ELISPOT (denominado ELISPOT directo). Sin embargo, para ampliar la sensibilidad del ensayo ELISPOT, se estimularon PBL una vez *in vitro* antes del análisis^{17,18}. En el día 0, se descongelaron PBL o ganglios linfáticos aplastados y se sembraron en placa a 2 ml/pocillo a una concentración de 2×10^6 células en placas de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca) en medio X-vivo (Bio Whittaker, Walquersville, Maryland), suero humano inactivado por calor al 5% y L-glutamina 2 mM en presencia de 10 μ M de péptido. Dos días después, se añadieron 20 UI/ml de interleucina 2 (IL-2) recombinante (Chiron, Ratingen, Alemania) a los cultivos. Se sometieron a prueba las células en cultivo para determinar la reactividad en ELISPOT en el día 8.

20 Ensayo ELISPOT

El ensayo ELISPOT usado para cuantificar células efectoras que liberan interferón γ específicas para epítipo peptídico se adaptó a partir de Lavani *et al.*³⁷ y Scheibenbogen *et al.*³⁸. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore) durante la noche a 4°C con 7,5 μ g/ml de anticuerpo anti-IFN- γ (1-D1 K, Mabtech, Suecia) en 75 μ l de PBS estéril. Posteriormente, se lavaron los pocillos seis veces con PBS, y se bloqueó la unión no específica mediante medio X-vivo durante 2 horas a 37°C. Se añadieron células o PBL recién aislados, que se habían estimulado una vez *in vitro*, por duplicado a diferentes concentraciones de células (desde 10^6 hasta 10^5 células por pocillo para PBL no estimulados, y desde 3×10^5 – 3×10^4 células por pocillo para PBL que se habían estimulado una vez *in vitro*), en 100 μ l de medio X-vivo. Entonces se añadieron péptidos a cada pocillo hasta una concentración final de 2 μ M y se incubaron durante la noche a 37°C.

- 30 Al día siguiente, se desecharon los medios y se lavaron los pocillos (seis veces) con PBS que contenía el 0,05% de Tween (PBS/Tw) antes de la adición de anticuerpo secundario biotilado (7-B6-1-Biotin, Mabtech) a 0,5 μ g/ml en 75 μ l de PBS que contenía el 1% de BSA y el 0,02% de NaN₃ (PBS/BSA). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron los pocillos (seis veces) con PBS/Tw. Después se añadieron 75 μ l de conjugado de avidina-enzima (AP-Avidin, Calbiochem) diluido 1:2000 en PBS/BSA a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora. Se preparó el sustrato enzimático NBT/BCIP de manera reciente según las instrucciones del fabricante (Gibco, código 18280-016) y se añadieron 75 μ l a cada pocillo y se incubaron durante 5-10 min. Se terminó la reacción lavando con agua del grifo tras la aparición de puntos de color morado oscuro. Entonces se contaron los puntos usando el sistema Alphamager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EE.UU.) y pudo calcularse la frecuencia de CTL específicos para péptido como el número de células formadoras de punto.

- 40 Se prefiere que el ensayo ELISPOT se realice usando PBL derivados de un individuo que no se haya inmunizado previamente con ML-IAP o un fragmento del mismo. Más preferiblemente, dicho individuo no se ha sometido a ninguna clase de terapia inmunitaria contra una enfermedad neoplásica. Por tanto, se prefiere por ejemplo que el individuo no se haya inmunizado previamente con células tumorales. PBL de individuos que se han sometido a terapia inmunitaria, en particular terapia inmunitaria que comprende ML-IAP, pueden dar un resultado positivo contra un péptido dado en un ensayo ELISPOT, aunque los PBL de una persona que no había recibido tratamiento no habrían dado un resultado positivo.

- 50 En aún otra realización descrita en la solicitud, fragmentos de ML-IAP preferidos son fragmentos que pueden activar el crecimiento de células T *in vitro*. En particular, fragmentos de ML-IAP preferidos inducen la expansión de CTL específicos para antígeno usando DC cargadas con dichos fragmentos. A continuación en el presente documento se describe un método de expansión de CTL específicos para antígeno. Por consiguiente, fragmentos de ML-IAP muy preferidos incluyen fragmentos en los que pueden recogerse más de 10^5 CTL específicos para antígeno, más preferiblemente 10^6 , incluso más preferiblemente 10^7 CTL específicos para antígeno, tras 4 ciclos de estimulación comenzando con 10^4 PBMC tal como se describe a continuación en el presente documento.

Expansión de CTL específicos para antígeno usando DC cargadas con antígeno

- 55 Se realizó la generación de células dendríticas (DC) tal como se describe⁴⁰. Se sembraron PBMC en placas de 85 mm (placas de cultivo bacteriológico, Primaria o tisular, Falcon, n.º de cat. 1005, 3038 ó 3003; Becton Dickinson, Hershey,

EE.UU.) a una densidad de 50×10^6 células por placa en 10 ml de medio de cultivo completo y se incubaron a 37°C y CO_2 al 5% durante 1 h. Tras un control microscópico de la adherencia, se retiró la fracción no adherente y se añadieron (día 0) 10 ml de medio completo reciente, caliente (RPMI 1640 (n.º de producto 12-167, Bio Whittaker, Walquersville, EE.UU.) complementado con gentamicina (Refobacin 10, Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de $20 \mu\text{g/ml}$, glutamina a una concentración final de 2 mM (n.º de producto 17-605, Bio Whittaker) y plasma humano inactivado por calor al 1% (56° durante 30 min.). Se centrifugaron las fracciones no adherentes y se sembraron una vez más en placas de cultivo tisular de 85 mm nuevas para su readherencia. Se descartó la fracción no adherente de estas placas "nuevamente sembradas" tras 1 h de adherencia. Se cultivaron todas las fracciones adherentes hasta el día 1, después se extrajo cuidadosamente medio de cultivo de modo que no se retiraron células poco adherentes, y se añadió nuevo medio de cultivo que contenía GM-CSF (concentración final de 800 U/ml) e IL-4 (concentración final de 1000 U/ml). Se añadieron citocinas de nuevo en el día 3 en 3 ml de medio reciente (que contenía 8000 U de GM-CSF y 10.000 U de IL-4) por placa. En el día 5 se recogieron todas las células no adherentes, se contaron y volvieron a sembrarse en medio completo reciente (que contenía citocinas en la misma dosificación que la descrita anteriormente) en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en 3 ml de medio. En el día 6 se añadieron $750 \mu\text{l}$ de medio condicionado con monocitos (MCM) para inducir la maduración de DC, y en el día 7 u 8 se recogieron las células.

Todas las preparaciones de DC se enriquecieron altamente en DC maduras mostrando $> 90\%$ un fenotipo característico mediante citometría de flujo (HLA-DR $^{+++}$, CD86 $^{+++}$, CD40+, CD25+, CD14-). Más del 80% de las células expresaron el antígeno CD83 como marcador para DC maduras.

Se preparó MCM de la siguiente manera: se prepararon placas bacteriológicas recubiertas con Ig (85 mm, Falcon 1005) inmediatamente antes de su uso. Como inmunoglobulina, se usó Sandoglobin^(TM) (Novartis). Se realizó el recubrimiento con 10 ml de inmunoglobulina ($10 \mu\text{g/ml}$) diluida (con PBS sin calcio o magnesio, Bio Whittaker) durante 10 min. a temperatura ambiente. Tras el procedimiento de recubrimiento se aclararon las placas dos veces con PBS sin calcio o magnesio (Bio Whittaker). Se sembraron 50×10^6 PBMC en estas placas en medio completo sin citocinas y se incubaron a 37°C , CO_2 al 5% durante 20 h. Entonces se recogió el medio condicionado con monocitos, se centrifugó a 1360 g durante 10 min. (22°C), se esterilizó por filtración (filtros de $0,22 \mu\text{m}$, Millipore, Molsheim, Francia) y se congeló en alícuotas a -20°C .

Se pulsaron 5×10^6 células DC/pocillo con péptido limitado a HLA $50 \mu\text{g/ml}$, por ejemplo un fragmento de ML-IAP, durante 2 h a 37°C péptido. Se cultivaron conjuntamente aproximadamente 10^4 PBMC/pocillo y 5×10^3 DC autólogas cargadas con antígeno/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos en $200 \mu\text{l}$ de medio MCM/pocillo complementado con plasma autólogo al 5%. En el día 7, volvieron a estimularse las PBMC con DC cargadas con antígeno. Tras un total de 4 a 5 ciclos de estimulación se enriquecieron linfocitos T CD8+ a partir de PBMC mediante depleción de células CD4 $^+$, CD11b $^+$, CD16 $^+$, CD19 $^+$, CD36 $^+$ y CD56 $^+$ con clasificación celular magnética usando un dispositivo midiMACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). La población resultante consistió en $>90\%$ de células T CD8 $^+$.

Para la expansión de CTL específicos, tales como CTL específicos para tumor, se transfirieron las células T enriquecidas en CD8 a matraces de 25 cm^2 recubiertos con AcM anti-CD3/anti-CD28, tal como se describió previamente⁴¹. En resumen, se recubrieron matraces de 25 cm^2 (Falcon, Heidelberg, Alemania) con AcM anti-CD3 humano (OKT3, Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, NJ) y AcM anti-CD28 humano (L293, Becton Dickinson) a una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ en PBS/tampón HEPES 100 mM (pH 9). Tras la incubación durante la noche a 4°C , se lavaron los matraces recubiertos dos veces con PBS. Se colocaron células T CD8 $^+$ sobre los matraces previamente recubiertos y lavados a 5×10^5 células/ml en 10 ml de medio MCM complementado con suero AB humano al 10% (PAA Laboratories GmbH, Coelbe, Alemania) y 100 UI de IL-2/ml (EuroCetus, Amsterdam, Países Bajos). Volvieron a estimularse las células con AcM anti-CD3/anti-CD28 una vez por semana, se cambió el medio de cultivo e IL-2 (100 UI/ml) dos veces por semana. Parte de los CTL purificados con CD8 se expandieron mediante nueva estimulación semanal con PBL o DC cargadas con antígeno.

En algunas realizaciones descritas en la solicitud, fragmentos de ML-IAP preferidos son fragmentos que pueden presentarse por una molécula de CMH específica. Por tanto, fragmentos de ML-IAP muy preferidos pueden ser fragmentos que pueden provocar una respuesta de células T específica en un individuo con un tipo de tejido específico. A continuación en el presente documento se indican moléculas de CMH preferidas según la invención.

En particular, los péptidos indicados a continuación en el presente documento son péptidos preferidos para su uso en un individuo del tipo de tejido específico:

HLA-A1

MLIAP85	G S E E L R L A S	(SEQ ID NO: 86)
MLIAP50	H V D G Q I L G Q	(SEQ ID NO: 51)
MLIAP120	D K V R C F F C Y	(SEQ ID NO: 121)
MLIAP213	A Q E P G G V S P	(SEQ ID NO: 213)

ES 2 415 336 T3

MLIAP230 V L E P P G A R D (SEQ ID NO: 230)
 MLIAP86 S E E L R L A S F Y (SEQ ID NO: 303)
 MLIAP166 V Q E T H S Q L L G (SEQ ID NO: 304)
 MLIAP100 T A E V P P E L L A (SEQ ID NO: 305)
 5 MLIAP119 Q D K V R C F F C Y (SEQ ID NO: 306)
 HLA-A3
 MLIAP245 R L Q E E R T C K (SEQ ID NO: 245)
 MLIAP218 G V S P A E A Q R (SEQ ID NO: 218)
 MLIAP288 P V R S R V R T F (SEQ ID NO: 288)
 10 MLIAP106 E L L A A A G F F (SEQ ID NO: 107)
 MLIAP242 Q L R R L Q E E R (SEQ ID NO: 242)
 MLIAP253 K V C L D R A V S (SEQ ID NO: 253)
 MLIAP253 K V C L D R A V S I (SEQ ID NO: 307)
 MLIAP244 R R L Q E E R T C K (SEQ ID NO: 308)
 15 MLIAP153 F L L R S K G R D F (SEQ ID NO: 309)
 MLIAP106 E L L A A A G F F H (SEQ ID NO: 310)
 MLIAP255 C L D R A V S I V F (SEQ ID NO: 311)
 MLIAP55 I L G Q L R P L T E (SEQ ID NO: 312)
 MLIAP126 F C Y G G L Q S W K (SEQ ID NO: 313)
 20 HLA-A24
 MLIAP80 A F P G M G S E E L (SEQ ID NO: 314)
 MLIAP147 W F P S C Q F L L (SEQ ID NO: 147)
 HLA-B7/HLA-B35
 MLIAP193 V P A S G Y P E L (SEQ ID NO: 193)
 25 MLIAP81 F P G M G S E E L (SEQ ID NO: 82)
 MLIAP2 G P K D S A K C L (SEQ ID NO: 3)
 MLIAP31 G P R S L G S P V (SEQ ID NO: 32)
 MLIAP276 A P G L Q L C P I (SEQ ID NO: 276)
 MLIAP31 G P R S L G S P V L (SEQ ID NO: 315)
 30 MLIAP190 A P S V P A S G Y (SEQ ID NO: 190)
 HLA-B27
 MLIAP32 P R S L G S P V L (SEQ ID NO: 33)
 MLIAP236 A R D V E A Q L R (SEQ ID NO: 236)
 MLIAP289 V R S R V R T F L (SEQ ID NO: 289)
 35 MLIAP237 R D V E A Q L R R (SEQ ID NO: 237)
 MLIAP76 S R G P A F P G M (SEQ ID NO: 77)
 MLIAP122 V R C F F C Y G G L (SEQ ID NO: 316)

MLIAP244 R R L Q E E R T C K (SEQ ID NO: 317)

MLIAP249 E R T C K V C L D R (SEQ ID NO: 318)

Un péptido muy preferido es MLIAP245 R L Q E E R T C K (SEQ ID NO: 245).

- 5 En otra realización descrita en la solicitud, fragmentos de ML-IAP preferidos son fragmentos que pueden dar lugar a una respuesta de células T específica sin conducir a la producción de anticuerpos. Se han descrito en la técnica anterior epítomos que sólo conducen a una respuesta de células T, pero no a una respuesta de IgG^{29,30}.

Métodos de identificación de fragmentos

En un aspecto, la presente solicitud también se refiere a métodos de selección de un péptido que comprende un fragmento de ML-IAP para su uso en una composición de vacuna que comprende las etapas de

- 10 i) proporcionar un individuo que no se ha sometido a terapia inmunitaria
- ii) proporcionar fragmentos de ML-IAP
- iii) someter a prueba respuestas de células T específicas contra fragmentos de ML-IAP en dicho individuo
- iv) seleccionar fragmentos de ML-IAP en los que dicha respuesta de células T corresponde a o es mejor que un criterio de selección predeterminado.
- 15 La respuesta de células T puede someterse a prueba según cualquier método adecuado, sin embargo se prefiere que someter a prueba dicha respuesta de células T comprenda un ensayo ELISPOT. El ensayo ELISPOT es preferiblemente el ensayo descrito anteriormente en el presente documento.

Preferiblemente, se seleccionan fragmentos que dan lugar a más de 50 puntos específicos para péptido por 10⁶ células en un ensayo ELISPOT, preferiblemente el ensayo ELISPOT descrito anteriormente en el presente documento.

20 Composiciones de vacuna y usos de las mismas

La presente solicitud describe en una realización una composición inmunogénica tal como una composición de vacuna que puede dar lugar por ejemplo a una respuesta de células T específica. La composición de vacuna comprende ML-IAP (SEQ ID NO: 1), y/o uno o más fragmentos del mismo. Preferiblemente, las composiciones de vacuna comprenden ML-IAP aislado y/o uno o más fragmentos aislados del mismo. El término "péptido de ML-IAP" tal como se usa a continuación en el presente documento se refiere a ML-IAP (SEQ ID NO: 1) y a fragmentos del mismo tal como se describe en otras partes en el presente documento. Cualquiera de los fragmentos de ML-IAP descritos anteriormente en el presente documento puede estar comprendido dentro de dicha vacuna, en particular los fragmentos de ML-IAP preferidos descritos anteriormente pueden estar comprendidos dentro de una vacuna.

30 Por tanto, las composiciones de vacuna descritas en la solicitud pueden comprender más de un fragmento de ML-IAP diferente, tal como 2, por ejemplo 3, tal como 4, por ejemplo 5, tal como 6, por ejemplo 7, tal como 8, por ejemplo 9, tal como 10, tal como un número de fragmentos en el intervalo de desde 5 hasta 10, por ejemplo en el intervalo de desde 10 hasta 15, tal como en el intervalo de desde 15 hasta 20, por ejemplo en el intervalo de desde 20 hasta 30, tal como en el intervalo de desde 30 hasta 40, por ejemplo en el intervalo de desde 40 hasta 60, tal como en el intervalo de desde 60 hasta 100, por ejemplo en el intervalo de desde 100 hasta 200 fragmentos de ML-IAP diferentes.

35 La composición de vacuna puede comprender al menos 1, más preferiblemente al menos 2, incluso más preferiblemente al menos 3, aún más preferiblemente al menos 4, por ejemplo al menos 5, tal como al menos 6, por ejemplo 7 fragmentos de ML-IAP diferentes que pueden cada uno asociarse con una molécula de HLA diferente seleccionada del grupo que consiste en HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B27 y HLA-B44.

40 En una realización descrita en la solicitud, los diferentes fragmentos de ML-IAP se seleccionan de manera que una composición de vacuna comprende fragmentos que pueden asociarse con moléculas de CMH diferentes, tales como moléculas de clase I de CMH diferentes, es decir los fragmentos de ML-IAP se limitan a HLA específicos. Preferiblemente, una composición de vacuna comprende fragmentos que pueden asociarse con las moléculas de clase I de CMH que se producen con la mayor frecuencia. Se indican moléculas de clase I de CMH preferidas en otras partes en el presente documento. Por tanto, composiciones de vacuna preferidas comprenden diferentes fragmentos que pueden asociarse con al menos 2 moléculas de clase I de CMH preferidas, más preferiblemente al menos 3 moléculas de clase I de CMH preferidas, incluso más preferiblemente al menos 4 moléculas de clase I de CMH preferidas.

50 En otra realización descrita en la solicitud, la composición de vacuna comprende uno o más fragmentos que pueden asociarse con una molécula de clase I de CMH y uno o más fragmentos que pueden asociarse con una molécula de clase II de CMH. Por tanto, preparaciones de vacunas peptídicas que pueden usarse según la presente invención pueden comprender un péptido de ML-IAP limitado a clase I y/o un péptido de ML-IAP limitado a clase II y/o péptidos de fusión que comprenden ambos péptidos. Por tanto, una composición de vacuna de este tipo puede preferiblemente provocar una respuesta de células T citotóxicas específica y/o una respuesta de células T cooperadoras específica.

La composición de vacuna puede comprender además un adyuvante y/o un portador. A continuación en el presente documento se facilitan ejemplos de adyuvantes y portadores útiles. Por tanto ML-IAP, o el fragmento del mismo, presente en la composición puede asociarse con un portador tal como por ejemplo una proteína o una célula presentadora de antígeno tal como por ejemplo una célula dendrítica (DC) que puede presentar ML-IAP o un fragmento del mismo a una célula T.

Adyuvantes son cualquier sustancia cuya adición a la composición de vacuna aumenta o modifica de otro modo la respuesta inmunitaria frente a ML-IAP o a un fragmento. Portadores son estructuras de soporte, por ejemplo un polipéptido o un polisacárido, con los que puede asociarse ML-IAP, o el fragmento del mismo.

Pueden seleccionarse adyuvantes por ejemplo del grupo que consiste en: $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, sílice, alumbre, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, caolín, carbono, hidróxido de aluminio, muramil dipéptidos, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-nomuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también denominado MTP-PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión del 2% de escualeno/Tween-80.RTM, lipopolisacáridos y sus diversos derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvantes incompletos de Freund, adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli-IC y poli-AU), cera D de micobacteria, tuberculosis, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* y miembros del género *Brucella*, liposomas u otras emulsiones lipídicas, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véanse los documentos US 58767 y 5.554.372), derivados de lípido A, derivados de toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices peptídicas sintéticas o GMDP, interleucina 1, interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Los adyuvantes preferidos para usarse con la invención incluyen Montanide ISA-51 y QS-21.

Montanide ISA-51 (Seppic, Inc.) es un adyuvante a base de aceite mineral análogo al adyuvante incompleto de Freund, que debe administrarse como una emulsión. QS-21 (Anti-genics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) es una saponina soluble en agua, altamente purificada, que se manipula como una disolución acuosa. Los adyuvantes QS-21 y Montanide ISA-51 pueden proporcionarse en viales estériles de un único uso.

Adyuvantes preferidos adicionales que pueden usarse en composiciones de vacuna que comprenden ML-IAP, y/o uno o más fragmentos del mismo, son por ejemplo cualquier sustancia que fomenta una respuesta inmunitaria. Con frecuencia, el adyuvante de elección es adyuvante completo o incompleto de Freund, o microorganismos de *B. pertussis* muertos, usados por ejemplo en combinación con antígeno precipitado por alumbre. Se proporciona una discusión general de adyuvantes en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2ª edición, 1986) en las páginas 61-63. Sin embargo, Goding indica que cuando el antígeno de interés tiene bajo peso molecular, o es poco inmunogénico, se recomienda el acoplamiento con un portador inmunogénico. Los ejemplos de tales moléculas portadoras incluyen hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulinas aviares. También se ha sugerido que diversos extractos de saponina son útiles como adyuvantes en composiciones inmunogénicas. Recientemente se ha propuesto usar factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), una citocina bien conocida, como un adyuvante (documento WO 97/28816).

En la siguiente tabla se indican funcionalidades deseables de adyuvantes que pueden usarse según la presente invención.

Tabla 1. Modos de acción de adyuvantes

Acción	Tipo de adyuvante	Beneficio
1. Inmunomodulación	Moléculas o proteínas generalmente pequeñas que modifican la red de citocinas	Regulación por incremento de la respuesta inmunitaria. Selección de Th1 o Th2
2. Presentación	Moléculas o complejos generalmente anfipáticos que interactúan con inmunógeno en su conformación nativa	Aumento de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Mayor duración de respuesta
3. Inducción de CTL	<ul style="list-style-type: none"> Partículas que pueden unirse o encerrar inmunógeno y que pueden fusionarse con, o romper, membranas celulares Emulsiones w/o para unión directa de péptido a CMH-1 de superficie celular 	<ul style="list-style-type: none"> Procesamiento citosólico de proteína que proporciona péptidos limitados a clase 1 correctos Proceso sencillo si se conoce(n) péptido(s) promiscuo(s)
4. Direccionamiento	<ul style="list-style-type: none"> Adyuvantes particulados que se unen a inmunógeno. Adyuvantes que saturan células de Kupffer Adyuvantes de hidratos de carbono que seleccionan como diana receptores de lectina en macrófagos y DC 	<ul style="list-style-type: none"> Uso eficaz de adyuvante e inmunógeno Como anteriormente. También puede determinar el tipo de respuesta si es selectivo de direccionamiento
5. Generación de depósito	<ul style="list-style-type: none"> Emulsión w/o a corto plazo Microesferas o nanoesferas a largo plazo 	<ul style="list-style-type: none"> Eficacia Posibilidad de vacuna de una única dosis

Fuente: Cox, J.C., y Coulter, A.R. (1997). Vaccine 15, 248-56.

Una composición de vacuna descrita en la solicitud puede comprender más de un adyuvante diferente. Además, la invención abarca una composición terapéutica que comprende además cualquier sustancia adyuvante incluyendo cualquiera de las anteriores o combinaciones de las mismas. También se contempla que ML-IAP, o uno o más fragmentos del mismo y el adyuvante pueden administrarse por separado en cualquier secuencia apropiada.

- 5 Un portador puede estar presente independientemente de un adyuvante. La función de un portador puede ser por ejemplo aumentar el peso molecular, en particular, de fragmentos de ML-IAP con el fin de aumentar su actividad o inmunogenicidad, conferir estabilidad, aumentar la actividad biológica o aumentar la semivida en suero. Además, un portador puede ayudar a presentar ML-IAP, o los fragmentos del mismo, a células T. El portador puede ser cualquier portador adecuado conocido por el experto en la técnica, por ejemplo una proteína o una célula presentadora de antígeno. Una proteína portadora puede ser, pero no se limita a, hemocianina de lapa californiana, proteínas de suero tales como transferrina, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana, tiroglobulina u ovoalbúmina, inmunoglobulinas u hormonas, tales como insulina o ácido palmítico. Para la inmunización de seres humanos, el portador debe ser un portador fisiológicamente aceptable, aceptable para seres humanos y seguro. Sin embargo, el toxoide del tétanos y/o el toxoide de la difteria son portadores adecuados en una realización de la invención. Alternativamente, el portador puede ser dextranos, por ejemplo Sepharose.

En una realización, la composición de vacuna puede comprender células dendríticas. Las células dendríticas (DC) pueden prepararse y usarse en un procedimiento terapéutico según cualquier protocolo adecuado, por ejemplo, tal como se describe a continuación en el presente documento. El experto en la técnica apreciará que el protocolo puede adaptarse para usarse con pacientes con diferente tipo de HLA y diferentes enfermedades. El péptido en el siguiente procedimiento puede ser cualquier fragmento de ML-IAP tal como por ejemplo fragmentos de ML-IAP descritos en el presente documento, en particular fragmentos de ML-IAP preferidos descritos en el presente documento.

Vacunas basadas en DC y procedimientos terapéuticos que usan DC

Se incluyeron pacientes con cáncer, tales como por ejemplo pacientes con melanoma metastásico en estadio IV con enfermedad progresiva, en un ensayo de vacunación basada en DC, por ejemplo tras no haber logrado responder a quimioterapia. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para participar en la vacunación experimental y para donar sangre para la monitorización inmunológica.

La determinación del tipo de HLA serológico reveló que los pacientes eran HLA-A2. Se pulsaron células dendríticas (DC) con péptido limitado a HLA 50 µg/ml durante 1 h a 37°C péptido y se administraron 5×10^6 células por vía subcutánea en el día 1 y 14, posteriormente cada 4 semanas, leucaféresis adicional tras 5 vacunaciones.

Todas las preparaciones de vacuna estaban altamente enriquecidas en DC maduras mostrando > 90% un fenotipo característico mediante citometría de flujo (HLA-DR+++ , CD86+++ , CCD40+ , CCD25+ , CD14-). Más del 80% de las células expresaron el antígeno CD83 como marcador para DC madura. El péptido usado en el ensayo de vacunación se sintetizó con una calidad de GMP por Clinalfa (pureza >98%).

35 Se realizó la generación de DC para su uso clínico y el control de calidad tal como se describe⁴⁰. Se sembraron PBMC en placas de 85 mm (placas de cultivo bacteriológico, Primaria o tisular, Falcon, n.º de cat. 1005, 3038 ó 3003; Becton Dickinson, Hershey, EE.UU.) a una densidad de 50×10^6 células por placa en 10 ml de medio de cultivo completo y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 1 h. Tras un control microscópico de la adherencia, se retiró la fracción no adherente y se añadieron (día 0) 10 ml de medio completo reciente, caliente (RPMI 1640 (n.º de producto 12-167, Bio Whittaker, Walquersville, EE.UU.) complementado con gentamicina (Refobacin 10, Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 20 µg/ml, glutamina a una concentración final de 2 mM (n.º de producto 17-605, Bio Whittaker) y plasma humano inactivado por calor al 1% (56° durante 30 min.).

45 Se centrifugaron las fracciones no adherentes y se sembraron una vez más en placas de cultivo tisular de 85 mm nuevas para su readherencia. Se descartó la fracción no adherente de estas placas "nuevamente sembradas" tras 1 h de adherencia. Se cultivaron todas las fracciones adherentes hasta el día 1, después se extrajo cuidadosamente medio de cultivo de modo que no se retiraron células poco adherentes, y se añadió nuevo medio de cultivo que contenía GM-CSF (concentración final de 800 U/ml) e IL-4 (concentración final de 1000 U/ml). Se añadieron citocinas de nuevo en el día 3 en 3 ml de medio reciente (que contenía 8000 U de GM-CSF y 10.000 U de IL-4) por placa. En el día 5 se recogieron todas las células no adherentes, se contaron y volvieron a sembrarse en medio completo reciente (que contenía citocinas en la misma dosificación que la descrita anteriormente) en placas de 6 pocillos a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en 3 ml de medio. En el día 6 se añadieron 750 µl de medio condicionado con monocitos (MCM) para inducir la maduración de DC, y en el día 7 u 8 se recogieron las células.

55 Se preparó MCM (medio condicionado con monocitos) de la siguiente manera: se prepararon placas bacteriológicas recubiertas con Ig (85 mm, Falcon 1005) inmediatamente antes de su uso. Como inmunoglobulina, se usó Sandoglobin^(TM) (Novartis). Se realizó el recubrimiento con 10 ml de inmunoglobulina (10 µg/ml) diluida (con PBS sin calcio o magnesio, Bio Whittaker) durante 10 min. a temperatura ambiente. Tras el procedimiento de recubrimiento se aclararon las placas dos veces con PBS sin calcio o magnesio (Bio Whittaker). Se sembraron 50×10^6 PBMC en estas placas en medio completo sin citocinas y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante 20 h. Entonces se recogió el

medio condicionado con monocitos, se centrifugó a 1360 g durante 10 min. (22°C), se esterilizó por filtración (filtros de 0,22 µm, Millipore, Molsheim, Francia) y se congeló en alícuotas a -20°C.^{16,38,42}

Vacunas peptídicas

5 Pueden prepararse y administrarse composiciones de vacuna usando cualquier protocolo convencional conocido por un experto en la técnica. A continuación se facilita un ejemplo no limitativo de preparación de una composición de vacuna según la invención así como un ejemplo no limitativo ejemplo de administración de una vacuna de este tipo. El experto en la técnica apreciará que el protocolo puede adaptarse fácilmente a cualquiera de las composiciones de vacuna descritas en el presente documento.

10 Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos de ML-IAP, por ejemplo, en la UVA Biomolecular Core Facility con un extremo terminal de NH₂ con amida libre y un extremo terminal de COOH con ácido libre. Cada uno se proporcionó como un péptido liofilizado, que entonces se reconstituyó en agua estéril y se diluyó con disolución de Ringer lactato (LR, Baxter Healthcare, Deerfield, IL) como tampón para una concentración final del 67-80% de disolución de Ringer lactato en agua. Entonces se esterizaron por filtración estas disoluciones, se colocaron en viales de vidrio de borosilicato y se presentaron para una serie de estudios de garantía de calidad incluyendo confirmación de la identidad, esterilidad, seguridad general y pureza, según directrices de la FDA, tal como se define en la norma IND 6453. Pruebas de estabilidad de péptidos demostraron que no había reducción de la pureza o de la concentración de péptido cuando se almacenaron estas disoluciones de péptidos a -20°C durante 3 años.

20 En circunstancias prácticas, los pacientes recibirán una vacuna que comprende aproximadamente 100 µg de un péptido de ML-IAP limitado a HLA de clase I con o sin un péptido cooperador de ML-IAP limitado a HLA de clase II. Se vacunan los pacientes, por ejemplo, con aproximadamente 100 µg del péptido de HLA de clase I en adyuvante solo, o se vacunaron, por ejemplo, con aproximadamente 100 µg del péptido limitado a HLA de clase I más 190 µg del péptido cooperador limitado a clase II. Se calculó la dosis superior del péptido cooperador para proporcionar cantidades equimolares de los epítomos cooperador y citotóxico. Adicionalmente, pueden vacunarse los pacientes con un péptido más largo que comprende las secuencias de aminoácidos de ambos péptidos.

25 Los péptidos anteriores, en 1 ml de disolución acuosa, pueden administrarse o bien como disolución/suspensión con aproximadamente 100 µg de QS-21, o bien como emulsión con aproximadamente 1 ml de adyuvante Montanide ISA-51.

30 Se inmunizan los pacientes, por ejemplo, en el día 0 y en los meses 1, 2, 3, 6, 9 y 12, con los péptidos más adyuvante, para un total de siete inmunizaciones. Con raras excepciones, se administran las vacunaciones en el mismo brazo con cada vacuna. Se administraron los péptidos s.c.^{43,44}

Moléculas de CMH

35 En una realización descrita en la solicitud, fragmentos de ML-IAP preferidos son fragmentos que pueden asociarse con una molécula de CMH. Dado que diferentes moléculas de CMH tienen diferentes afinidades por un péptido dado, pueden preferirse diferentes fragmentos de ML-IAP con diferentes realizaciones de la invención. La invención también se refiere a composiciones que comprenden diferentes fragmentos de ML-IAP, que tienen preferiblemente afinidad por diferentes moléculas de CMH.

Moléculas de CMH preferidas según la presente invención son moléculas de clase I de CMH y moléculas de clase II de CMH, más preferiblemente moléculas de clase I de CMH.

40 Moléculas de clase I de CMH preferidas son las moléculas de clase I de CMH que se producen más comúnmente. En una realización de la presente invención, las moléculas de clase I de CMH preferidas pueden seleccionarse del grupo que consiste en HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B27 y HLA-B44.

45 Composiciones preferidas según la presente invención comprenden al menos 1, más preferiblemente al menos 2, incluso más preferiblemente al menos 3, aún más preferiblemente al menos 4, por ejemplo al menos 5, tal como al menos 6, por ejemplo 7 fragmentos de ML-IAP diferentes que pueden cada uno asociarse con una molécula de HLA diferente seleccionada del grupo que consiste en HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B27 y HLA-B44.

A modo de ejemplo, una composición preferida puede comprender un péptido de ML-IAP que puede asociarse con HLA-A2 y un péptido de ML-IAP que puede asociarse con HLA-A1 y un péptido de ML-IAP que puede asociarse con HLA-A3 y un péptido de ML-IAP que puede asociarse con HLA-A24.

50 Métodos ex vivo para obtener y cultivar células T

En una realización, la solicitud describe un método para activar y expandir células T específicas para ML-IAP o fragmentos del mismo así como a células T obtenidas mediante tales métodos. Preferiblemente, los métodos se refieren a células T citotóxicas específicas para fragmentos de ML-IAP. Los métodos comprenden preferiblemente las etapas de cultivar conjuntamente células T y ML-IAP, o al menos un fragmento del mismo, activando así las

células T, y opcionalmente aislar células T específicas para ML-IAP activadas o células T específicas para fragmentos de ML-IAP.

5 Cultivar conjuntamente células T y ML-IAP o fragmentos del mismo puede realizarse mediante cualquier método convencional. Por ejemplo pueden usarse métodos que implican células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas (DC). Por tanto, el método puede comprender generar y cargar células dendríticas (DC) derivadas de monocitos con fragmento(s) de ML-IAP y cultivar conjuntamente dichas DC y monocitos de sangre periférica (PBMC) que comprenden células T o células T purificadas a partir de PBMC. Opcionalmente, entonces pueden aislarse las células T específicas para ML-IAP. Preferiblemente, las células T específicas para ML-IAP son células T citotóxicas.

10 Un método preferido para generar y cargar DC derivadas de monocitos y para cultivar conjuntamente DC y monocitos de sangre periférica (PBMC) se describió anteriormente en el presente documento en la sección "Expansión de CTL específicos para antígeno usando CD cargadas con antígeno":

Sin embargo, pueden usarse diferentes clases de células presentadoras de antígeno (APC) con la invención.

15 En un ejemplo, se proporciona un método para la inmunización *in vitro* con células de *Drosophila* como APC. Por tanto, el método puede comprender generar células de *Drosophila melanogaster* que expresan una o más moléculas de HLA diferentes, cargar dichas células de *Drosophila melanogaster* con fragmento(s) de ML-IAP y cultivar conjuntamente dichas células de *Drosophila* con monocitos de sangre periférica (PBMC) que comprenden células T o células T purificadas a partir de PBMC. Así, pueden generarse células T específicas para ML-IAP. Preferiblemente, dichas células T son células T citotóxicas. Opcionalmente, las células T pueden aislarse posteriormente. Una ventaja de usar células de *Drosophila melanogaster* es que no son viables a 37°C.

20 Se usaron células de *Drosophila melanogaster* como APC^{45,46}. Estas células son vehículos eficaces para la presentación de péptidos en el contexto de clase I de HLA, especialmente para la inmunización *de novo* de CTL CD8⁺. Se transdujo la línea celular de *Drosophila* Schneider S2 (colección americana de cultivos tipo CRL 10974, Rockville, MD) con HLA-A2.1, CD80 (B7-1) y CD54 (molécula de adhesión intracelular 1) con un vector de plásmido pRmHa-3. Se hicieron crecer células de *Drosophila* en medio de Schneider (10⁶ células/ml) con suero bovino fetal al 10% y CuSO₄ a 27°C, la temperatura óptima para estas células de insecto. Se recogieron, se lavaron y volvieron a suspenderse en medio X-press (Bio Whittaker, Walquersville, MD) que contenía 100 µg/ml del epítipo peptídico limitado a HLA.

25 Se obtuvieron células T CD8⁺ a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante selección positiva con un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-CD8 novedoso capturado con una perla magnética de oveja anti-ratón (Dynal, Lake Success, NY)⁴⁷.

30 Tras la incubación a 27°C con el epítipo peptídico limitado a HLA durante 3 horas, se incubaron las células de *Drosophila* con las células T CD8⁺ a 37°C a una razón de 1:10 en medio RPMI 1640 que contenía suero autólogo al 10%. Dos días después, se añadieron 20 UI de IL-2 y 30 UI de IL-7 al medio de crecimiento. Se continuó la incubación durante 1 semana, tras lo cual se sustituyeron las células de *Drosophila* con PBMC irradiadas autólogas (30 Gy) y el péptido limitado a HLA. Esto se repitió para un ciclo de estimulación adicional, tras lo cual se sometieron a prueba las células T CD8⁺ para determinar la citotoxicidad mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas. La preparación final contenía al menos el 92% de células T CD8⁺, con el 4% o menos de células (linfocitos citolíticos naturales) CD16⁺ y el 4% o menos de células T CD4⁺.

35 La presente solicitud también se refiere a métodos de tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesita, que comprende realizar la (re)infusión de células T específicas para ML-IAP en el mismo. Además, la invención se refiere al uso de células T específicas para ML-IAP para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesita y a medicamentos para tratar un estado clínico que comprende células T específicas para ML-IAP como principio activo.

40 En la técnica se conocen métodos de (re)infusión de células T en un individuo. A continuación en el presente documento se expone un ejemplo de un método adecuado.

45 En aún otra realización se proporciona un método para obtener células T a partir de un individuo y realizar la reinfusión de las células T tras la inmunización *ex vivo*. Se realizó la leucaféresis para obtener aproximadamente 1 x 10¹⁰ células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Tras tres ciclos (3 semanas) de inmunización *in vitro*, se realizaron pruebas bacteriológicas y micológicas formales para verificar la estabilidad antes de administrar las células.

50 No permanecían células de *Drosophila* en la preparación de CTL tras el procedimiento de inmunización. Las células de *Drosophila* son viables a 27°C, pero no son viables a 37°C. Además, se realizaron dos ciclos de inmunización con cambios de medio cada vez tras la inmunización inicial con las células de mosca. Finalmente, se usó la reacción en cadena de la polimerasa con el fin de detectar ADN de *Drosophila* residual en la preparación final de CTL antes de la reinfusión. ADN de *Drosophila* estaba uniformemente ausente mediante este método sensible.

Para la infusión en el paciente, volvieron a suspenderse los CTL en 200 ml de solución salina al 0,9% con albúmina sérica humana al 5% en un envase de transferencia (Baxter [McGaw Park, IL], n.º de catálogo 4R-2014, bolsa de plástico de infusión de células de sangre) y se administraron por vía intravenosa a lo largo de un periodo de 1 hora en la unidad de trasplante de células madre. Enfermeras experimentadas midieron los signos vitales cada 15 minutos y monitorizaron a los pacientes para detectar signos de toxicidad o de reacciones de hipersensibilidad inmediata.

Terapia de combinación

La presente solicitud describe además composiciones farmacéuticas y kit de partes para su uso en terapia de combinación.

La terapia de combinación tal como se usa en el presente documento indica el tratamiento de un individuo que lo necesita con más de un método diferente. Por tanto, la terapia de combinación puede implicar en un aspecto la administración de una composición farmacéutica o un kit de partes que comprende una composición de vacuna tal como se describió anteriormente en el presente documento y un medicamento anticancerígeno. Los medicamentos anticancerígenos pueden ser cualquiera de los medicamentos descritos a continuación en el presente documento, por ejemplo un agente quimioterápico o un agente inmunoterápico.

En particular, la terapia de combinación puede implicar la administración a un individuo de un agente quimioterápico y/o un agente inmunoterápico en combinación con uno o más de i) ML-IAP, o un fragmento del mismo, ii) una célula presentadora de antígeno que presenta ML-IAP y iii) una célula T específica para péptido de ML-IAP activada. Sin embargo, la terapia de combinación también puede implicar radioterapia, terapia génica y/o cirugía.

Por tanto, la terapia de combinación puede incluir la administración, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, de por ejemplo:

i) ML-IAP y/o fragmentos del mismo + al menos un agente quimioterápico

ii) ML-IAP y/o fragmentos del mismo + al menos un agente inmunoterápico

iii) célula presentadora de antígeno que presenta ML-IAP y/o fragmentos del mismo + al menos un agente quimioterápico

iv) célula presentadora de antígeno que presenta ML-IAP y/o fragmentos del mismo + al menos un agente inmunoterápico

v) células T activadas + al menos un agente quimioterápico

vi) células T activadas + al menos un agente inmunoterápico

Las combinaciones adicionales incluyen i) y ii); iii) y iv); v) y vi); i) y iii); i) y iv), i) y v); i) y vi); ii) y iii); ii) y iv); ii) y v); ii) y vi); iii) y v); iii) y vi); iv) y v); iv) y vi); i) y iv) y cualquiera de v) y vi).

El agente quimioterápico puede ser por ejemplo metotrexato, vincristina, adriamicina, cisplatino, cloroetilnitrosoureas que no contienen azúcar, 5-fluorouracilo, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina, dacarbazina, taxol, fragilina, meglamina GLA, valrubicina, carmustina y poliferposano, MM1270, BAY 12-9566, inhibidor de RAS famesil transferasa, inhibidor de famesil transferasa, MMP, MTA/LY231514, LY264618/lometexol, Glamolec, CI-994, TNP-470, Hycamtin/topotecán, PKC412, Valspodar/PSC833, Novantrone/mitoxantrona, Metaret/suramina, Batimastat, E7070, BCH-4556, CS-682, 9-AC, AG3340, AG3433, Incel/VX-710, VX-853, ZD0101, ISI641, ODN 698, TA 2516/marmistat, BB2516/marmistat, CDP 845, D2163, PD183805, DX8951f, Lemonal DP 2202, FK 317, Picibanil/OK-432, AD 32/valrubicina, Metastron/derivado de estroncio, Temodal/temozolomida, Evacet/doxorubicina liposómica, Yewtaxan/paclitaxel, Taxol/paclitaxel, Xeload/capecitabina, Furtulon/doxifluridina, Cydopax/paclitaxel oral, taxoide oral, SPU-077/cisplatino, HMR 1275/flavopiridol, CP-358 (774)/EGFR, CP-609 (754)/inhibidor de oncogén de RAS, BMS-182751/platino oral, UFT(tegafur/uracilo), Ergamisol/levamisol, eniluracilo/776C85/potenciador de 5FU, Campto/levamisol, Camptosar/irinotecán, Tumodex/ralitrexed, Leustatin/cladribina, Paxex/paclitaxel, Doxil/doxorubicina liposómica, Caelyx/doxorubicina liposómica, Fludara/fludarabina, Pharmarubicin/epirubicina, DepoCyt, ZD1839, LU 79553/bis-naftalimida, LU 103793/dolastatina, Caetyx/doxorubicina liposómica, Gemzar/gemcitabina, ZD 0473/Anormed, YM 116, simientes de yodo, inhibidores de CDK4 y CDK2, inhibidores de PARP, D4809/dexifosamida, Ifes/Mesnex/ifosamida, Vumon/tenipósido, Paraplatin/carboplatino, Plantinol/cisplatino, Vepeside/etopósido, ZD 9331, Taxotere/docetaxel, profármaco de guanina arabinósido, análogo de taxano, nitrosoureas, agentes alquilantes tales como melfalán y ciclofosfamida, amino-glutetimida, asparaginasa, busulfano, carboplatino, clorambucilo, citarabina HCl, dactinomicina, daunorubicina HCl, fosfato sódico de estramustina, etopósido (VP16-213), floxuridina, fluorouracilo (5-FU), flutamida, hidroxíurea (hidroxicarbamida), ifosfamida, interferón alfa-2a, alfa-2b, acetato de leuprolida (análogo de factor liberador de LHRH), lomustina (CCNU), mecloretamina HCl (mostaza nitrogenada), mercaptopurina, mesna, mitotano (o.p'-DDD), mitoxantrona HCl, octreotida, plicamicina, procarbazona HCl, estreptozocina, citrato de tamoxifeno, tioguanina, tiotepa, sulfato de vinblastina, amsacrina (m-AMSA), azacitidina, eritropoyetina, hexametil-melamina (HMM),

interleucina 2, mitoguazona (metil-GAG; metil-glioxal-bis-guanilhidrazona; MGBG), pentostatina (2'-desoxicoformicina), semustina (metil-CCNU), tenipósido (VM-26) y sulfato de vindesina. Además, el agente quimioterápico puede ser cualquiera de los agentes quimioterápicos mencionados en la tabla 3 del documento US 6.482.843, columnas 13 a 18.

- 5 El agente inmunoterápico puede ser por ejemplo Ributaxin, Herceptin, Quadramet, Panorex, IDEC-Y2B8, BEC2, C225, Oncolym, SMART MI 95, ATRAGEN, Ovarex, Bexxar, LDP-03, ior t6, MDX-210, MDX-11, MDX-22, OV103, 3622W94, anticuerpo anti-VEGF, Zenapax, MDX-220, MDX-447, MELIMMUNE-2, MELIMMUNE-1, CEACIDE, Pretarget, NovoMab- G2, TNT, Gllomab-H, GNI-250, EMD-72000, LymphoCide, CMA 676, Monopharm-C, 4B5, ior egf.r3, ior c5, BABS, anticuerpo anti-FLK-2, MDX-260, Ac ANA, Ac SMART 1 D10, Ac SMART ABL 364 e
10 ImmuRAIT-CEA. Además el agente inmunoterápico puede ser cualquier citocina o interferón.

Las composiciones terapéuticas o composiciones de vacuna de la invención también pueden usarse en combinación con otras estrategias anticancerígenas, y tales terapias de combinación son eficaces en la inhibición y/o eliminación de la metástasis o el crecimiento tumoral. Los métodos de la presente invención pueden usarse ventajosamente con otras modalidades de tratamiento, incluyendo, sin limitación, radiación, cirugía, terapia génica y quimioterapia.

- 15 La "terapia de combinación" puede incluir la introducción de ácidos nucleicos heterólogos en células adecuadas, generalmente conocido como terapia génica. Por ejemplo, la terapia génica puede implicar la introducción de genes supresores de tumor o genes promotores de la apoptosis en células tumorales. Alternativamente, pueden introducirse en células tumorales secuencias de ácido nucleico que inhiben la expresión de oncogenes o de genes que inhiben la apoptosis. Además, pueden introducirse genes que codifican para enzimas que pueden conferir a las
20 células tumorales sensibilidad frente a agentes quimioterápicos. Por consiguiente, la presente invención en una realización proporciona un método que comprende la etapa de tratar el cáncer introduciendo un vector génico, codificando una proteína que puede convertir enzimáticamente un profármaco, es decir, un compuesto no tóxico, en un compuesto tóxico. En el método descrito en la solicitud, la secuencia de ácido nucleico terapéutica es un ácido nucleico que codifica para un producto, provocando el producto la muerte celular por sí mismo o en presencia de
25 otros fármacos. Un ejemplo representativo de un ácido nucleico terapéutico de este tipo es uno que codifica para timidina cinasa de virus del herpes simple. Ejemplos adicionales son timidina cinasa de virus de la varicela zóster y citosina desaminasa de genes bacterianos, que pueden convertir 5-fluorocitosina en el compuesto altamente citotóxico 5- fluorouracilo.

Indicaciones clínicas que pueden tratarse con la presente invención

- 30 Las composiciones de vacuna o las composiciones terapéuticas/farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento pueden usarse para tratar varios estados clínicos diferentes. Además, la presente solicitud describe métodos de tratamiento de dichos estados clínicos en un individuo que lo necesita, métodos de diagnóstico de dichos estados clínicos y uso de ML-IAP o fragmentos del mismo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado clínico en un individuo que lo necesita así como medicamentos para tratar un estado
35 clínico que comprende ML-IAP o fragmentos del mismo como principio activo.

- En una realización preferida descrita en la solicitud, el estado clínico es un cáncer. Se pretende que el término "cáncer", tal como se usa en el presente documento, abarque cualquier cáncer, enfermedad neoplásica y preneoplásica. Dicho cáncer puede seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste en carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de próstata, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangeosarcoma, sarcoma linfangeoendotelial, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiomasarcoma, rbdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma,
40 seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioblastomas, neurinomas, craneofaringiomas, schwannomas, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neurinoma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemias y linfomas, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda, policitemia vera,
45 mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, y enfermedad de cadenas pesadas, leucemias no linfocíticas agudas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, cáncer de recto, cánceres urinarios, cánceres uterinos, cánceres orales, cánceres de piel, cáncer de estómago, tumores cerebrales, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer de esófago, tumores de mama, leucemia linfoide aguda (ALL) nula infantil, ALL tímica, ALL de células B, leucemia mielóide aguda, leucemia mielomonocitoide,
50 leucemia megacariocitoide aguda, linfoma de Burkitt, leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crónica y leucemia de células T, carcinoma de pulmón de células pequeñas y grandes no pequeñas, leucemia granulocítica aguda, tumores de células germinales, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfoide crónica, leucemia de células pilosas y cáncer de tiroides.

- 60 En realizaciones preferidas descritas en la solicitud, el estado clínico es un tipo de cáncer que expresa frecuentemente ML-IAP o un tipo de cáncer en el que líneas celulares derivadas de dicho tipo de cáncer expresan

frecuentemente ML-IAP. Por ejemplo líneas celulares derivadas de melanomas malignos expresan frecuentemente ML-IAP^{14,26}, mientras que líneas celulares derivadas de cáncer de mama con frecuencia no expresan ML-IAP²⁶. Sin embargo, se prefiere mucho que el estado clínico sea un cáncer que expresa ML-IAP. En una realización preferida, el estado clínico es melanoma maligno.

5 En otra realización descrita en la solicitud, el estado clínico es una enfermedad autoinmunitaria.

Las enfermedades autoinmunitarias pueden agruparse de manera no estricta en las que se limitan principalmente a órganos o tejidos específicos y las que afectan a todo el cuerpo. Los ejemplos de trastornos específicos de órganos (con el órgano afectado) incluyen esclerosis múltiple (recubrimiento de mielina en prolongaciones de neuronas), diabetes mellitus tipo I (páncreas), tiroiditis de Hashimoto (glándula tiroidea), anemia perniciosa (estómago), enfermedad de Addison (glándulas suprarrenales), miastenia grave (receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular), artritis reumatoide (revestimiento de las articulaciones), uveítis (ojo), psoriasis (piel), síndrome de Guillain-Barre (células nerviosas) y enfermedad de Grave (tiroides). Las enfermedades autoinmunitarias sistémicas incluyen lupus eritematoso sistémico y dermatomiositis.

Otros ejemplos de trastornos de hipersensibilidad incluyen asma, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, otras dermatitis eczematosas, dermatitis seborreica, rinitis, liquen plano, pénfigo, penfigoide ampolloso, epidermolisis ampollosa, urticaria, angioedemas, vasculitis, eritemas, eosinofilia cutánea, alopecia areata, aterosclerosis, cirrosis biliar primaria y síndrome nefrótico. Las enfermedades relacionadas incluyen inflamaciones intestinales, tales como enfermedad celiaca, proctitis, gastroenteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, así como alergias relacionadas con alimentos.

El individuo que necesita tratamiento puede ser cualquier individuo, preferiblemente un ser humano. Los péptidos tendrán generalmente diferentes afinidades para diferentes moléculas de HLA. Por tanto, en las realizaciones de la presente invención en las que la composición de vacuna o la composición farmacéutica comprende péptidos de ML-IAP, se prefiere que una composición de vacuna o una composición farmacéutica que va a administrarse a un individuo dado comprenda al menos un péptido que puede asociarse con moléculas de HLA de ese individuo particular.

Los métodos según la presente invención permiten la vacunación incluso de individuos que no han recibido tratamiento inmunológico, porque las composiciones de vacuna según la invención comprenden preferiblemente fragmentos de ML-IAP inmunológicamente dominantes. Por tanto, en una realización de la presente invención, el individuo que necesita tratamiento no se ha sometido anteriormente a terapia inmunitaria frente a una enfermedad neoplásica. En particular se prefiere que el individuo no se haya sometido anteriormente a una terapia inmunitaria que comprenda inmunización con un componente que comprende ML-IAP o un fragmento del mismo. Por tanto, por ejemplo, se prefiere que dicho individuo no se haya inmunizado con una célula tumoral que expresa ML-IAP.

Composiciones farmacéuticas

Por consiguiente, la solicitud en realizaciones preferidas describe composiciones farmacéuticas que comprenden ML-IAP (SEQ ID NO: 1) y/o variantes o fragmentos de esas moléculas tal como se definió anteriormente en el presente documento para el tratamiento de trastornos patológicos relacionados con, o mediados por, ML-IAP.

Pueden formularse composiciones terapéuticas útiles desde el punto de vista farmacéutico y/o veterinario según métodos conocidos tales como la adición de uno o más excipientes o portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario. Pueden encontrarse ejemplos de tales excipientes, portadores y métodos de formulación, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co, Easton, PA). Para formar una composición aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario adecuada para la administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz de un modulador de polipéptido, ácido nucleico, anticuerpo o compuesto.

Se administran composiciones terapéuticas o de diagnóstico descritas en la solicitud a un individuo (mamífero, ser humano o animal) o se usan en cantidades suficientes para tratar o diagnosticar trastornos relacionados con apoptosis. La cantidad eficaz puede variar según una variedad de factores tales como el estado, peso, sexo y edad del individuo. Otros factores incluyen el modo de administración.

El término derivado funcional incluye una molécula que contiene restos químicos adicionales que no son normalmente parte de la molécula de base. Tales restos pueden mejorar la solubilidad, semivida, absorción, etc. de la molécula de base. Alternativamente, los restos pueden atenuar efectos secundarios indeseables de la molécula de base o reducir la toxicidad de la molécula de base. Se describen ejemplos de tales restos en una variedad de textos, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences.

Las composiciones farmacéuticas y veterinarias adecuadas para su uso tal como se describe en la solicitud incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. La determinación de una dosis eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. La dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente o bien en ensayos de cultivo celular, por ejemplo, de células neoplásicas, o bien en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. También se usa el modelo animal para lograr un intervalo de concentración y vía de administración deseables. Entonces puede usarse

tal información para determinar dosis y vías administración útiles en seres humanos y otros animales. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad de compuesto, péptido, anticuerpo o ácido nucleico que mejora o previene un estado apoptótico disfuncional. La dosificación exacta la elige el médico individual a la vista del paciente que va a tratarse.

- 5 Pueden usarse compuestos identificados según los métodos dados a conocer en el presente documento así como anticuerpos terapéuticos, ácidos nucleicos terapéuticos y péptidos contemplados en el presente documento solos a dosificaciones apropiadas definidas mediante pruebas rutinarias con el fin de obtener una modulación óptima de la actividad de livina. Además, puede ser deseable la administración conjunta o administración secuencial de estos y otros agentes.
- 10 Las composiciones farmacéuticas o veterinarias pueden administrarse al individuo por una variedad de vías tales como subcutánea, tópica, oral e intramuscular. La administración de composiciones farmacéuticas se logra por vía oral o por vía parenteral. Los métodos de administración parenteral incluyen administración tópica, intraarterial (directamente en el tejido), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La presente invención también tiene el objetivo de proporcionar formulaciones farmacéuticas adecuadas tópicas, orales, sistémicas y parenterales para su uso en los métodos de tratamiento
- 15 novedosos de la presente invención. Las composiciones que contienen compuestos identificados según esta invención como principio activo para su uso en la modulación de una proteína que media en la apoptosis pueden administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación terapéuticas en vehículos convencionales para la administración. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse en formas de dosificación orales tales como
- 20 comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación controlada y de liberación sostenida), pastillas, polvos, gránulos, elixires, tinturas, disoluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o mediante inyección. Igualmente, también pueden administrarse en forma intravenosa (tanto en bolo como infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión o intramuscular, todas usando formas bien conocidas por los expertos habituales en las técnicas farmacéuticas. Puede emplearse una cantidad eficaz pero no tóxica del compuesto, ácido
- 25 nucleico o péptido deseado como agente modulador de la apoptosis.

La dosificación diaria de los productos puede variarse a lo largo de un amplio intervalo de desde 0,001 hasta 1.000 mg por ser humano adulto/al día. Para la administración oral, las composiciones se administran preferiblemente en forma de comprimidos ranurados o no ranurados que contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0,

30 10,0, 15,0, 25,0 y 50,0 miligramos del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que va a tratarse. Habitualmente se administra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de desde aproximadamente 0,0001 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día. El intervalo es más particularmente de desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 10 mg/kg de peso corporal al día. Incluso más particularmente, el intervalo varía entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1 mg/kg.

Evidentemente, el nivel de dosificación variará dependiendo de la potencia del compuesto particular. Determinados compuestos serán más potentes que otros. Además, el nivel de dosificación variará dependiendo de la biodisponibilidad del compuesto. Cuanto más biodisponible y potente es el compuesto, menos compuesto necesitará administrarse mediante cualquier vía de administración, incluyendo, pero sin limitarse a, la administración oral.

35

Las dosificaciones de moduladores de livina se ajustan cuando se combinan para lograr efectos deseados. Por otra parte, las dosificaciones de estos diversos agentes pueden optimizarse independientemente y combinarse para lograr un resultado sinérgico en el que la patología se reduce más de lo que se reduciría si se usara cualquiera de los agentes solo. Los expertos en la técnica emplearán formulaciones diferentes para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores.

40

También se proporcionan terapias de combinación que comprenden la etapa de administrar las composiciones de vacuna según la invención en combinación con un agente quimioterápico y/o un agente inmunoterápico y/o una vacuna contra el cáncer.

45

Variantes y equivalentes funcionales de ML-IAP

La presente solicitud también describe variantes y equivalentes funcionales de los fragmentos indicados anteriormente de ML-IAP.

La afinidad de diversas moléculas de HLA hacia un péptido dado depende de la secuencia de dicho péptido. En la tabla 2 a continuación en el presente documento se describen los aminoácidos en una posición dada dentro de un péptido que da como resultado la afinidad superior de dicho péptido hacia una molécula de HLA dada.

50

Por tanto, a continuación en el presente documento se indican variantes preferidas de péptidos de ML-IAP con alta afinidad hacia una molécula de HLA particular con una indicación de la posición en la que se ha producido preferiblemente una sustitución para cada uno de los fragmentos indicados anteriormente. En la tabla se indica el residuo de aminoácido preferido en la posición respectiva de la variante.

55

Por consiguiente, a modo de ejemplo, una variante de péptido de ML-IAP preferida que puede unirse a HLA-B54 tiene una prolina en la segunda posición.

Tabla 2. Motivos de residuo de anclaje primario empleados

Alelo de HLA	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 5	Posición 6	Posición 7	Extremo C-terminal
HLA-A1		T, S	D, E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L, V
HLA-A3		L, V, M	F, Y				K, Y F
HLA-A11		V, I, F, Y	M, L, F, Y, I				K, R
HLA-A23		I, Y					W, I
HLA-A24		Y		I, V	F		I, L, F
HLA-A25		M, A, T	I				W
HLA-A26	E, D	V, T, I, L, F			I, L, V		Y, F
HLA-A28	E, D	V, A, L					A, R
HLA-A29		E					Y, L
HLA-A30		Y, L, F, V					Y
HLA-A31			L, M, F, Y				R
HLA-A32		I, L					W
HLA-A33		Y, I, L, V					R
HLA-A34		V, L					R
HLA-A66	E, D	T, V					R, K
HLA-A68	E, D	T, V					R, K
HLA-A69		V, T, A					V, L
HLA-A74		T					V, L
HLA-B5		A, P	F, Y				I, L
HLA-B7		P					L, F
HLA-B8			K	K, R			L
HLA-B14		R, K					L, V
HLA-B15 (B62)		Q, L, K, P, H, V, I, M, S, T					F, Y, W
HLA-B17							L, V
HLA-B27		R					Y, K, F, L
HLA-B35		P					I, L, M, Y
HLA-B37		D, E					I, L, M
HLA-B38		H	D, E				F, L
HLA-B39		R, H					L, F
HLA-B40 (B60,61)		E	F, I, V				L, V, A, W, M, T, R
HLA-B42		L, P					Y, L
HLA-B44		E					F, Y, W
HLA-B46		M, I, L, V					Y, F
HLA-B48		Q, K					L
HLA-B51		A, P, G					F, Y, I, V
HLA-B52		Q	F, Y				I, V
HLA-B53		P					W, F, L
HLA-B54		P					
HLA-B55		P					A, V
HLA-B56		P					A, V
HLA-B57		A, T, S					F, W, Y
HLA-B58		A, T, S					F, W, Y
HLA-B67		P					L
HLA-B73		R					P
HLA-Cw1		A, L					L
HLA-Cw2		A, L					F, Y
HLA-Cw3		A, L					L, M
HLA-Cw4		Y, P, F					L, M, F, Y
HLA-Cw6		Y					L, I, V, Y
HLA-Cw6		Y					L, Y, F
HLA-Cw8		Y					L, I
HLA-Cw16		A, L					L, V

Equivalentes funcionales y variantes se usan de manera intercambiable en el presente documento. Cuando son polipéptidos, las variantes se determinan basándose en su grado de identidad o en su grado de homología con cualquier secuencia predeterminada de secuencias de aminoácidos consecutivos de un fragmento de ML-IAP, tal como por ejemplo SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 290.

Por tanto, inicialmente se define una secuencia de residuos de aminoácido de ML-IAP consecutivos y luego se definen variantes y equivalentes funcionales en relación con la misma. Por consiguiente, las variantes preferiblemente tienen una identidad de secuencia de al menos el 75%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 80%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 85%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 90%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 91%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 91%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 92%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 93%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 94%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 95%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 96%, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 97%, tal como una identidad de secuencia de al menos el 98%, por ejemplo una identidad de secuencia del 99%, con la secuencia de residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP predeterminada.

La identidad de secuencia se determina en una realización utilizando fragmentos de péptidos que comprenden al menos 9 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 80%, tal como en un 85%, por ejemplo en un 90%, tal como en un 95%, por ejemplo en un 99% a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 290, respectivamente, determinándose la identidad en porcentaje con el algoritmo GAP, BESTFIT o FASTA en la versión de paquete de software 7.0 de Wisconsin Genetics, usando pesos de hueco por defecto.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia predeterminada" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Puede realizarse una alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 85: 2444, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en la versión de paquete de software 7.0 de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de aminoácidos son idénticas en la ventana de comparación.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se producen residuos de aminoácido idénticos en ambas secuencias para dar el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Aplicado a polipéptidos, un grado de identidad de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. Un grado de homología o similitud de secuencias de aminoácidos es función del número de aminoácidos, es decir estructuralmente relacionados, en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos.

El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos el 75 por ciento, tal como una identidad de secuencia de al menos el 80 por ciento, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 85 por ciento, tal como por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 90 por ciento, por ejemplo una identidad de secuencia de al menos el 95 por ciento, tal como una identidad de secuencia de al menos el 98 por ciento, o incluso una identidad de secuencia de al menos el 99 por ciento, en comparación con una secuencia predeterminada en una ventana de comparación de al menos 9 residuos de aminoácido, tal como 10 residuos de aminoácido, por ejemplo 11 residuos de aminoácido, tal como 12 residuos de aminoácido, por ejemplo 13 residuos de aminoácido, tal como 14 residuos de aminoácido, por ejemplo 15 residuos de aminoácido, tal como 20 residuos de aminoácido, por ejemplo 30 residuos de aminoácido, tal como 40 residuos de aminoácido, por ejemplo 50 residuos de aminoácido, tal como 60 residuos de aminoácido, por ejemplo 70 residuos de aminoácido, tal como 80 residuos de aminoácido, por ejemplo 90 residuos de aminoácido, tal como 100 residuos de aminoácido, por ejemplo 110 residuos de aminoácido, tal como 120 residuos de aminoácido, por ejemplo 130 residuos de aminoácido, tal como 140 residuos de aminoácido, por ejemplo 150 residuos de aminoácido, tal como 175 residuos de aminoácido, por ejemplo 200 residuos de aminoácido, tal como 225 residuos de aminoácido, por ejemplo 250 residuos de aminoácido, tal como 275 residuos de aminoácido, por ejemplo 297 residuos de aminoácido. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservativas.

Una secuencia “no relacionada” o “no homóloga” comparte una identidad de menos del 40%, aunque preferiblemente una identidad de menos del 25%, con una secuencia de aminoácidos de ML-IAP de la presente invención.

5 Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren en una realización a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo
10 de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos preferidos de sustitución de aminoácidos conservativa son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

Adicionalmente, las variantes también se determinan basándose en un número predeterminado de sustituciones de aminoácidos conservativas tal como se define a continuación en el presente documento. La sustitución de aminoácido conservativa, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la sustitución de un aminoácido (dentro de un grupo de aminoácidos predeterminado) por otro aminoácido (dentro del mismo grupo), mostrando los aminoácidos características similares o sustancialmente similares.

Dentro del significado del término “sustitución de aminoácidos conservativa” tal como se aplica en el presente documento, un aminoácido puede sustituirse por otro dentro de los grupos de aminoácidos indicados a continuación en el presente documento:

Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)

25 Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida (Asn, Gln)

Aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo (Ser, Thr)

30 Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met)

Aminoácidos neutros, débilmente hidrófobos (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)

Aminoácidos hidrófilos, ácidos (Gln, Asn, Glu, Asp) y

Aminoácidos hidrófobos (Leu, Ile, Val)

35 Por consiguiente, una variante o un fragmento de la misma tal como se describe en la solicitud puede comprender al menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente entre sí. Está claro a partir del resumen anterior que la misma variante o fragmento de la misma puede comprender más de una sustitución de aminoácidos conservativa de más de un grupo de aminoácidos conservativos tal como se definió anteriormente en el presente documento.

40 La adición o delección de al menos un aminoácido puede ser una adición o delección de desde preferiblemente 2 hasta 250 aminoácidos, tal como desde 10 hasta 20 aminoácidos, por ejemplo desde 20 hasta 30 aminoácidos, tal como desde 40 hasta 50 aminoácidos. Sin embargo, adiciones o delecciones de más de 50 aminoácidos, tales como adiciones de desde 50 hasta 100 aminoácidos, adición de 100 a 150 aminoácidos, adición de 150-250 aminoácidos, también están comprendidas dentro de la presente invención. La delección y/o la adición puede ser
45 (independientemente entre sí) una delección y/o una adición dentro de una secuencia y/o en el extremo de una secuencia.

Los fragmentos de polipéptido tal como se describe en la solicitud, incluyendo cualquier equivalente funcional de los mismos, pueden comprender en una realización una secuencia de residuos de aminoácido de ML-IAP consecutivos de menos de 250 residuos de aminoácido, tal como menos de 240 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 225 residuos de aminoácido, tal como menos de 200 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 180 residuos
50 de aminoácido, tal como menos de 160 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 150 residuos de aminoácido,

tal como menos de 140 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 130 residuos de aminoácido, tal como menos de 120 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 110 residuos de aminoácido, tal como menos de 100 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 90 residuos de aminoácido, tales como menos de 85 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 80 residuos de aminoácido, tal como menos de 75 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 70 residuos de aminoácido, tal como menos de 65 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 60 residuos de aminoácido, tal como menos de 55 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 50 residuos de aminoácido, tal como menos de 45 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 30 residuos de aminoácido, tal como menos de 25 residuos de aminoácido, por ejemplo menos de 20 residuos de aminoácido, tal como menos de 15 residuos de aminoácido, por ejemplo 14 residuos de aminoácido consecutivos, tal como 13 residuos de aminoácido consecutivos, por ejemplo 12 residuos de aminoácido consecutivos, tal como 11 residuos de aminoácido consecutivos, por ejemplo 10 residuos de aminoácido consecutivos, tal como 9 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1).

La "equivalencia funcional" tal como se usa en la presente invención, se establece según una realización preferida haciendo referencia a la funcionalidad correspondiente de un fragmento predeterminado de la secuencia.

La equivalencia funcional puede establecerse por ejemplo mediante afinidades de unión similares a las moléculas de clase I de HLA, o potencia similar demostrada mediante ensayos ELISPOT.

Se entenderá que los equivalentes funcionales o variantes de un fragmento de ML-IAP tal como se describe en el presente documento muestran secuencias de aminoácidos que difieren gradualmente de secuencias predeterminadas, preferidas, a medida que aumenta el número y el alcance de inserciones, deleciones y sustituciones incluyendo sustituciones conservativas. Esta diferencia se mide como una reducción en la homología entre una secuencia predeterminada, preferida, y el fragmento variante de ML-IAP o equivalente funcional de ML-IAP.

Todos los fragmentos de ML-IAP que comprenden o que consisten en residuos de aminoácido de ML-IAP consecutivos así como las variantes y equivalentes funcionales de los mismos están incluidos dentro del alcance de esta invención, independientemente del grado de homología que muestran con una secuencia predeterminada. El motivo para esto es que es muy probable que algunas regiones de los fragmentos de ML-IAP puedan mutar fácilmente o puedan delecionarse completamente, sin ningún efecto significativo sobre, por ejemplo, la actividad de unión del fragmento resultante.

Una variante funcional obtenida mediante sustitución puede mostrar bien alguna forma o grado de actividad de unión nativa, y todavía ser menos homóloga, si se sustituyen residuos que contienen cadenas laterales de aminoácidos similares en funcionalidad. Similar en funcionalidad, a este respecto, se refiere a características dominantes de las cadenas laterales tales como hidrófobas, básicas, neutras o ácidas, o a la presencia o ausencia de impedimento estérico. Por consiguiente, en una realización de la invención, el grado de identidad no es una medida principal de que un fragmento sea una variante o equivalente funcional de un fragmento predeterminado preferido según la presente invención.

La homología entre secuencias de aminoácidos puede calcularse usando algoritmos bien conocidos tales como uno cualquiera de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85 y BLOSUM 90.

Ha de considerarse que los fragmentos que comparten homología con fragmentos que comprenden o que consisten en residuos de aminoácido de ML-IAP consecutivos se encuentran dentro del alcance de la presente invención cuando son homólogos preferiblemente en al menos aproximadamente el 90 por ciento, por ejemplo homólogos en al menos el 92 por ciento, tal como homólogos en al menos el 94 por ciento, por ejemplo homólogos en al menos el 95 por ciento, tal como homólogos en al menos el 96 por ciento, por ejemplo homólogos en al menos el 97 por ciento, tal como homólogos en al menos el 98 por ciento, por ejemplo homólogos en al menos el 99 por ciento con un fragmento de ML-IAP predeterminado. Según una realización de la invención, los porcentajes de homología indicados anteriormente son porcentajes de identidad.

Factores adicionales que pueden tenerse en cuenta cuando se determina la equivalencia funcional según el significado usado en el presente documento son i) la capacidad de los antisueros para detectar un fragmento de ML-IAP según la presente invención, o ii) la capacidad de un fragmento de ML-IAP funcionalmente equivalente para competir con un fragmento de ML-IAP predeterminado en un ensayo. Geysen ha descrito un método para determinar una secuencia de aminoácidos inmunogénicamente activos con una secuencia de aminoácidos conocida en el documento US 5.595.915 y se incorpora al presente documento como referencia.

En el documento US 6.013.478, que se incorpora al presente documento como referencia, se describe un método adicional adaptable de manera adecuada para determinar relaciones de estructura y función de fragmentos de péptido. Además, el experto en la técnica conoce métodos de someter a ensayo la unión de una secuencia de aminoácidos a un resto de receptor tal como por ejemplo a un receptor de células T.

Además de las sustituciones conservativas introducidas en cualquier posición de fragmentos de ML-IAP preferidos, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservativas en una cualquiera o más posiciones de un fragmento de este tipo. Una sustitución no conservativa que conduce a la formación de un fragmento funcionalmente

- equivalente por ejemplo i) diferiría sustancialmente en la polaridad, por ejemplo un residuo con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met) sustituido por un residuo con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn o Gln o un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg o Lys, o la sustitución de un residuo cargado o polar por uno no polar; y/o ii) diferiría sustancialmente en su efecto sobre la orientación de estructura principal polipeptídica tal como sustitución de Pro o Gly por otro residuo; y/o iii) diferiría sustancialmente en la carga eléctrica, por ejemplo sustitución de un residuo cargado negativamente tal como Glu o Asp por un residuo cargado positivamente tal como Lys, His o Arg (y viceversa); y/o iv) diferiría sustancialmente en el impedimento estérico, por ejemplo sustitución de un residuo voluminoso tal como His, Trp, Phe o Tyr por uno que tiene una cadena lateral menor, por ejemplo Ala, Gly o Ser (y viceversa).
- 5
- 10 Las variantes obtenidas mediante la sustitución de aminoácidos pueden producirse en una realización preferida basándose en valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad y en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, incluyendo carga, tamaño y similares. Los expertos en la técnica conocen bien sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo que tienen en cuenta diversas de las características anteriores e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.
- 15 En una realización adicional, la presente invención se refiere a variantes funcionales que comprenden aminoácidos sustituidos que tienen valores hidrófilos o índices hidropáticos que están dentro de +/- 4,9, por ejemplo dentro de +/- 4,7, tal como dentro de +/- 4,5, por ejemplo dentro de +/- 4,3, tal como dentro de +/- 4,1, por ejemplo dentro de +/- 3,9, tal como dentro de +/- 3,7, por ejemplo dentro de +/- 3,5, tal como dentro de +/- 3,3, por ejemplo dentro de +/- 3,1, tal como dentro de +/- 2,9, por ejemplo dentro de +/- 2,7, tal como dentro de +/- 2,5, por ejemplo dentro de +/- 2,3, tal como dentro de +/- 2,1, por ejemplo dentro de +/- 2,0, tal como dentro de +/- 1,8, por ejemplo dentro de +/- 1,6, tal como dentro de +/- 1,5, por ejemplo dentro de +/- 1,4, tal como dentro de +/- 1,3 por ejemplo dentro de +/- 1,2, tal como dentro de +/- 1,1, por ejemplo dentro de +/- 1,0, tal como dentro de +/- 0,9, por ejemplo dentro de +/- 0,8, tal como dentro de +/- 0,7, por ejemplo dentro de +/- 0,6, tal como dentro de +/- 0,5, por ejemplo dentro de +/- 0,4, tal como dentro de +/- 0,3, por ejemplo dentro de +/- 0,25, tal como dentro de +/- 0,2 del valor del aminoácido que se ha sustituido.
- 20
- 25

La importancia de los índices de aminoácidos hidrófilos e hidropáticos para conferir función biológica interactiva en una proteína se entiende bien en la técnica (Kyte & Doolittle, 1982 y Hopp, patente estadounidense n.º 4.554.101, incorporándose cada uno en el presente documento como referencia).

- 30 Los valores de índice hidropático de aminoácidos tal como se usan en el presente documento son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5) (Kyte & Doolittle, 1982).

- 35 Los valores de hidrofiliidad de aminoácidos son: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +/- 0,1); glutamato (+3,0 +/- 0,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 +/- 0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4) (documento U.S. 4.554.101).

- 40 Además de los compuestos de peptidilo descritos en el presente documento, pueden formularse compuestos estéricamente similares para imitar a las partes clave de la estructura peptídica y tales compuestos también pueden usarse de la misma manera que los péptidos de la invención. Esto puede lograrse mediante técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede emplearse esterificación y otras alquilaciones para modificar el extremo amino terminal, por ejemplo, de una estructura principal peptídica de di-arginina, para imitar a la estructura tetrapeptídica. Se entenderá que todos los constructos estéricamente similares se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

- 45 Las variantes y equivalentes funcionales de ML-IAP también incluyen derivados de ML-IAP o fragmentos de los mismos, por ejemplo ML-IAP o fragmentos de ML-IAP sustituidos con uno o más restos químicos.

- 50 Dentro de la presente invención también se engloban péptidos con alquilaciones N-terminales y esterificaciones C-terminales. Los equivalentes funcionales también comprenden conjugados de agregación o covalentes y glicosilados formados con el mismo u otros fragmentos de ML-IAP, incluyendo dímeros o restos químicos no relacionados. Tales equivalentes funcionales se preparan mediante la unión de funcionalidades a grupos que se encuentran en el fragmento incluyendo en uno cualquiera o ambos de los extremos N- y C-terminal, mediante medios conocidos en la técnica.

- 55 Los equivalentes funcionales pueden comprender por tanto fragmentos de ML-IAP conjugados con amidas o ésteres alifáticos o acíclicos del extremo carboxilo terminal, alquilaminas o residuos que contienen cadenas laterales de carboxilo, por ejemplo, conjugados con alquilaminas en residuos de ácido aspártico; derivados de O-acilo de residuos que contienen grupos hidroxilo y derivados de N-acilo del aminoácido amino-terminal o residuos que contienen grupos amino, por ejemplo conjugados con fMet-Leu-Phe o proteínas inmunogénicas. Los derivados de grupos acilo se seleccionan del grupo de restos alquilo (incluyendo alquilo normal de C3 a C10), que forman de ese modo especies de alcanilo, y compuestos carbocíclicos o heterocíclicos, que forman de ese modo especies de

arólio. Los grupos reactivos son preferiblemente compuestos difuncionales conocidos *per se* para su uso en reticulación de proteínas para dar lugar a matrices insoluble a través de grupos laterales reactivos.

Los equivalentes funcionales de agregación o covalentes y derivados de los mismos son útiles como reactivos en inmunoensayos o para procedimientos de purificación por afinidad. Por ejemplo, un fragmento de ML-IAP según la presente invención puede insolubilizarse mediante unión covalente a Sepharose activada con bromuro de cianógeno mediante métodos conocidos *per se* o puede adsorberse a superficies de poliolefina, o bien con o bien sin reticulación de glutaraldehído, para su uso en un ensayo o purificación de anticuerpos anti-fragmento de ML-IAP o receptores de la superficie celular. Los fragmentos también pueden marcarse con un grupo detectable, por ejemplo, marcarse con radioyodo mediante el procedimiento de la cloramina T, unirse covalentemente a quelatos de tierras raras o conjugarse a otro resto fluorescente para su uso por ejemplo en ensayos de diagnóstico.

Los fragmentos de ML-IAP según la invención pueden sintetizarse tanto *in vitro* como *in vivo*. En una realización, los fragmentos de ML-IAP de la invención se sintetizan mediante síntesis automatizada. Puede emplearse cualquiera de las técnicas de fase sólida disponibles comercialmente, tal como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en el que los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento. (Véase Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963).

El equipo para la síntesis automatizada de polipéptidos está disponible comercialmente de proveedores tales como Applied Biosystems, Inc. de Foster City, Calif., y puede operarse generalmente según las instrucciones del fabricante. La síntesis en fase sólida permitirá la incorporación de sustituciones de aminoácidos deseables en cualquier fragmento de ML-IAP según la presente invención. Se entenderá que pueden combinarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier subcombinación de las mismas para llegar a una secuencia final de un equivalente funcional. Se entenderá que las inserciones incluyen fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales, por ejemplo con una proteína hidrófoba o inmunogénica o un portador tal como cualquier polipéptido o estructura de soporte que pueda servir como portador.

También se proporcionan oligómeros que incluyen dímeros que incluyen homodímeros y heterodímeros de fragmentos de ML-IAP según la invención y se encuentran dentro del alcance de la invención. Los equivalentes funcionales y variantes de fragmentos de ML-IAP pueden producirse como homodímeros o heterodímeros con otras secuencias de aminoácidos o con secuencias de ML-IAP nativas. Los heterodímeros incluyen dímeros que contienen fragmentos de ML-IAP inmunorreactivos así como fragmentos de ML-IAP que no necesitan tener ni ejercer ninguna actividad biológica.

Ejemplos

La siguiente sección sirve para describir más completamente la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el auténtico alcance de esta invención, sino que más bien se presentan para fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Péptidos

Todos los péptidos se adquirieron de Research Genetics (Huntsville, AL, EE.UU.) y se proporcionaron con una pureza >80% tal como se verificó mediante análisis de HPLC y EM. Todos los péptidos usados se indican en la tabla 1.

Ensayo de ensamblaje para unión de péptidos a moléculas de CMH de clase I

Se llevaron a cabo ensayos de ensamblaje para determinar la unión de los péptidos sintéticos a moléculas de CMH de clase I marcadas metabólicamente con [³⁵S]-metionina tal como se describe^{15,16}. El ensayo de ensamblaje se basa en la estabilización de la molécula de clase I tras la carga del péptido a la línea celular deficiente en transportador de péptidos T2. Posteriormente, se inmunoprecipitan cadenas pesadas de CMH estables plegadas correctamente usando anticuerpos dependientes de conformación. Tras la electroforesis en IEF, se expusieron los geles a pantallas de detección y cuantificación de la radiactividad y se cuantificó la unión de péptidos usando el programa Imagequant PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Estimulación antigénica de PBL

Para ampliar la sensibilidad del ensayo ELISPOT, se estimularon PBL una vez *in vitro* antes del análisis^{17,18}. En el día 0, se descongelaron PBL o ganglios linfáticos aplastados y se sembraron en placa a 2 ml/pocillo a una concentración de 2×10^6 células en placas de 24 pocillos (Nunc, Dinamarca) en medio X-vivo (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland), suero humano inactivado por calor al 5% y L-glutamina 2 mM en presencia de 10 μ M de péptido. Dos días después, se añadieron 20 UI/ml de interleucina 2 (IL-2) recombinante (Chiron, Ratingen,

Alemania) a los cultivos. Se sometieron a prueba las células en cultivo para determinar la reactividad en ELISPOT en el día 12.

Ensayo ELISPOT

5 Se realizó el ensayo ELISPOT usado para cuantificar células efectoras que liberan interferón- γ específicas para epítipo peptídico tal como se describió anteriormente¹⁹. En resumen, se recubrieron placas de 69 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore, Hedehusene, Dinamarca) con anticuerpo anti-IFN- γ (1-D1K, Mabtech, Nacka, Suecia). Se lavaron los pocillos, se bloquearon mediante medio X-vivo y se añadieron las células por duplicado a diferentes concentraciones de células. Entonces se añadieron péptidos a cada pocillo y se incubaron las placas durante la noche. Al día siguiente, se desecharon los medios y se lavaron los pocillos antes de la adición de anticuerpo secundario biotinilado (T-B6-1-Biotin, Mabtech). Se incubaron las placas durante 2 horas, se lavaron y se añadió conjugado de avidina-enzima (AP-Avidin, Calbiochem, Life Technologies) a cada pocillo. Se incubaron las placas a TA durante 1 hora y se añadió el sustrato enzimático NBT/BCIP (Gibco, Life Technologies) a cada pocillo y se incubaron a TA durante 5-10 min. Se terminó la reacción lavando con agua del grifo tras la aparición de puntos de color morado oscuro. Se contaron los puntos usando el sistema Alphamager (Alpha Innotech, San Leandro, CA. EE.UU.) y pudo calcularse la frecuencia de CTL específicos para péptido a partir de los números de células formadoras de punto. Todos los ensayos se realizaron por duplicado para cada antígeno peptídico.

Ejemplo 2

20 El presente ejemplo demuestra que ML-IAP se reconoce como antígeno tumoral en pacientes con cáncer ya que ML-IAP se somete a respuestas de células T.

Se examinó la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ML-IAP para determinar epítopos peptídicos concebibles noamérico de HLA-A2 y decamérico de HLA-A2 usando los residuos de anclaje específicos para HLA-A2 principales²⁰.

25 Se sintetizaron doce péptidos deducidos de ML-IAP y se examinaron para determinar la unión a HLA-A2 en comparación con el epítipo de control positivo de alta afinidad por HLA-A2 de HIV-1 pol₄₇₆₋₄₈₄ (ILKEPVHGV) (tabla 1). La concentración de péptido requerida para la mitad de la recuperación máxima del CMH de clase I (valor de C₅₀) fue de 0,2 μ M para el control positivo.

30 Cinco péptidos de ML-IAP se unieron con alta afinidad similar a la del control positivo; MLIAP₂₄₅, MLIAP₉₀, MLIAP₃₄, MLIAP₅₄ y MLIAP₉₉ (C₅₀ = 1, 0,2, 1, 1 y 0,9 μ M, respectivamente) (tabla 1). Los péptidos MLIAP₂₈₀, MLIAP₈₃ y MLIAP₁₅₄ se unieron en comparación con afinidad intermedia (C₅₀ = 20, 30 y 10 μ M, respectivamente), mientras que los péptidos MLIAP₂₃₀ y MLIAP₉₈ sólo se unieron débilmente a HLA-A2 (C₅₀ >100 μ M). Dos de los péptidos examinados (MLIAP₂₆₁, MLIAP₂₀₀) no se unieron a HLA-A2 (tabla 1).

35 Usando el ensayo de secreción de IFN- γ ELISPOT, se examinó la presencia de respuestas de células T específicas contra la ML-IAP deducida, los péptidos de unión a HLA-A2 en células T de sangre periférica (n = 7) o TIL (n = 22) de pacientes con melanoma. La alta sensibilidad de este ensayo permite la detección fiable de tan sólo 10-100 células T específicas/1 millón. Además, antes del análisis, se estimularon las células T una vez *in vitro* para ampliar la sensibilidad. Se ha demostrado previamente que este método es altamente eficaz para identificar epítopos peptídicos reconocidos por CTL en pacientes con cáncer^{10,21,22}. En cambio, otros ensayos *ex vivo* tales como tinción de IFN- γ intracelular o análisis de tetrámeros mediante citometría de flujo requieren frecuencias de células T específicas aproximadamente 10 veces superiores para su detección.

40 En la primera serie de experimentos se examinó la reactividad de las células T contra los 12 péptidos de ML-IAP deducidos. Basándose en estos resultados preliminares también se incluyó el péptido ML-IAP₂₃₀ de unión a HLA-A2 débil además de los péptidos de mejor unión para el análisis adicional. Las respuestas de CTL más fuertes se detectaron contra el péptido ML-IAP₂₈₀ (QLCPICRAPV) de unión a HLA-A2 intermedia y tales respuestas pudieron detectarse tanto en TIL como en PBL.

45 La figura 1 ilustra estas respuestas espontáneas fuertes detectadas en TIL y PBL de tres pacientes con melanoma (figura 1 A-D); cada punto representa una célula que produce INF- γ , reactiva frente a péptidos. Se calculó el número promedio de puntos por péptido usando un dispositivo de barrido CCD y un sistema informático (figura 1 E). Además, se pudo detectar una respuesta contra ML-IAP₂₈₀ en una de las muestras de PBL y en TIL de siete pacientes (figura 2). Además, se detectó una respuesta contra el péptido ML-IAP₂₄₅ (RLQEERTCKV) de unión a HLA-A2 fuerte en cinco de las muestras de TIL y una de las de PBL (figura 2). Además, se identificó reactividad contra el péptido ML-IAP₉₀ (RLASFYDWPL) de unión a HLA-A2 fuerte en siete muestras de TIL y en PBL de dos pacientes (figura 2). De manera sorprendente, se detectó una respuesta contra el péptido ML-IAP₂₃₀ (VLEPPGARDV) de unión a HLA-A2 débil en seis cultivos de TIL y en dos muestras de PBL aun cuando este péptido no pudo estabilizar la molécula de HLA-A2 (figura 2).

Once de las 22 muestras de TIL y tres de las siete muestras de PBL no mostraron ninguna respuesta específica para ML-IAP (datos no mostrados). Por tanto, se detectaron respuestas espontáneas de células T contra ML-IAP en aproximadamente la mitad de los pacientes examinados.

5 Por consiguiente, se analizaron fragmentos del polipéptido de ML-IAP para determinar la presencia de motivos de unión a HLA-A2 y, tras la identificación satisfactoria, los fragmentos se usaron para someter a prueba la reactividad específica de células T en pacientes con melanoma mediante el ensayo ELISPOT. Siguiendo esta estrategia, se identificaron satisfactoriamente respuestas de CTL fuertes contra el péptido ML-IAP₂₈₀ de unión a HLA-A2 intermedia.

10 Pudieron detectarse respuestas espontáneas más débiles contra tres epítomos peptídicos adicionales, los péptidos MLIAP₂₄₅ y MLIAP₉₀ de unión a HLA-A2 fuerte y el péptido MLIAP₂₃₀ de unión muy débil. A este respecto, merece la pena observar que hay muchos factores que determinan una respuesta de CTL contra un péptido dado. Estos incluyen el nivel de expresión del polipéptido fuente relevante, procesamiento, transporte de TAP, nivel de expresión del CMH de clase I sobre la superficie celular, repertorio de TCR, sensibilidad de CTL, inmunosupresión y citocinas²³. Por tanto, la unión del péptido a clase I es uno de varios factores diferentes que determinan la
15 inmunogenicidad de un péptido dado. Adicionalmente, a diferencia de los péptidos extraños, cuando se expresan péptidos propios sobre la superficie de la célula a alta densidad debido a la alta afinidad de unión de CMH, parece inducirse tolerancia y las células T reactivas se eliminan o inactivan²⁴.

20 Posteriormente, con frecuencia muchos epítomos inmunodominantes en respuestas de CTL a polipéptidos propios pueden ser determinantes subdominantes o crípticos, en vez de dominantes. Esto puede explicar la observación de que muchos epítomos de antígenos de melanoma humano, que son polipéptidos propios no mutados, tales como gp100 y MART-1, tienen afinidades de unión relativamente bajas a CMH de clase I²⁶. Dado que la eficacia de la inmunoterapia tumoral depende lo más probablemente de la avidez de los CTL reclutados³², podrían ser importantes los epítomos tumorales de baja afinidad TAA, siempre que puedan movilizar su repertorio de CTL específico y que se presenten por células tumorales de manera suficientemente eficaz como para reconocerse por CTL.

25 Ejemplo 3

Uno de los epítomos limitados al antígeno HLA-A2 identificado de ML-IAP fue el péptido decamérico ML-IAP₂₄₅ (RLQEERTCKV). El siguiente ejemplo se refiere al péptido nonamérico análogo ML-IAP₂₄₅₋₂₅₃ (RLQEERTCK).

30 El péptido decamérico se presenta por células de melanoma en el contexto del antígeno HLA-A2. Para investigar si el péptido nonamérico se genera asimismo por la maquinaria de procesamiento de antígenos y posteriormente se presenta en el contexto del antígeno HLA-A3, se analizaron PBL de 14 pacientes con melanoma positivo para antígeno HLA-A3 para determinar las respuestas inmunitarias espontáneas por medio de ELISPOT contra este péptido. Para este fin, cinco de los pacientes con melanoma albergaban una respuesta inmunitaria de más de 200 células T específicas para ML-IAP₂₄₅₋₂₅₃ (RLQEERTCK) por 10⁶ células CD8+ (figura 3).

35 Por tanto, están presentes respuestas inmunitarias espontáneas contra este epítomo en aproximadamente un tercio de los pacientes positivos para antígeno HLA-A3.

40 La caracterización de múltiples epítomos de ML-IAP con diferentes elementos de restricción de clase I amplía el potencial clínico de este antígeno diana de dos formas importantes: Por una parte, aumenta el número de pacientes elegibles para inmunoterapia basándose en péptidos derivados de ML-IAP, puesto que aunque el antígeno HLA-A2 es una de las moléculas de clase I de HLA expresadas con más frecuencia, todavía se expresa sólo en aproximadamente el 50% de los pacientes con melanoma. El antígeno HLA-A3 se expresa en el 30% de los pacientes³⁴. Se encuentra coexpresión en aproximadamente el 10% de los pacientes. Por tanto, puede vacunarse aproximadamente al 70% de los pacientes con los epítomos de ML-IAP identificados.

45 Por otra parte, es probable que la selección como diana colectiva de varios elementos de restricción disminuya el riesgo de escape inmunitario por pérdida de alelo de HLA de clase I. La pérdida de un único alelo de HLA de clase I es un componente significativo de las alteraciones del CMH descritas en las células cancerosas, mientras que la pérdida total de expresión de HLA de clase I es un acontecimiento bastante infrecuente. Aunque el porcentaje de pacientes que expresan tanto antígenos HLA-A2 como HLA-A3 sólo es del 10%, la identificación de epítomos para otros alelos de HLA de clase I sí que aumenta este porcentaje de pacientes con solapamiento alélico.

Ejemplo 4

50 Se detectaron células T reactivas para ML-IAP *in situ* de la siguiente manera.

55 Se obtuvieron multímeros de monómeros específicos para HLA-A2 y ML-IAP₂₄₅/HLA-A2 usando moléculas de dextrano, que se conjugaron tanto con estreptavidina como con isotiocianato de fluoresceína. Se usaron complejos de CMH multimerizados para teñir material congelado, fijado con acetona, tal como se describió anteriormente^{11,48} y se visualizaron células específicas para antígeno usando un microscopio láser confocal. Se analizaron secciones de melanoma primario de seis pacientes y pudieron detectarse fácilmente CLT reactivos para ML-IAP₂₈₀ y ML-IAP₂₄₅ *in situ* en el microentorno tumoral de dos de los pacientes (figura 4).

Ejemplo 5

Para caracterizar la capacidad funcional de los CTL reactivos para ML-IAP, se aislaron estas células por medio de perlas magnéticas recubiertas con complejos HLA-A2/ML-IAP de manera similar a la descrita en Schrama *et al.*, 2001³⁸. Se aislaron directamente células específicas para ML-IAP₂₄₅ a partir de PBL (figura 5A). Se enriquecieron las células reactivas para ML-IAP₂₈₀ a partir de TIL de un ganglio linfático con infiltración de melanoma tras estimularse una vez *in vitro* con péptido. Estas células lisaron a células T2 de una manera específica de péptido (figura 4B). Adicionalmente, se sometió a prueba la citotoxicidad de los CTL reactivos para ML-IAP₂₈₀ contra la línea de melanoma autóloga FM72, la línea celular de melanoma apareada con HLA-A2, FM93 y la línea celular de melanoma de apareamiento erróneo con HLA, FM56. Este análisis reveló que las células T reactivas para ML-IAP₂₈₀ lisaron eficazmente las líneas celulares de melanoma tanto autólogas como apareada con HLA. En cambio, no se observó citotoxicidad contra la línea celular de melanoma negativa para HLA-A2, FM56 ni contra la célula diana de linfocitos citolíticos naturales K562 (figura 4C).

Los datos presentados anteriormente en el presente documento demuestran que ML-IAP, que es de importancia crucial para la supervivencia de una célula cancerosa, representa un antígeno tumoral novedoso. Pueden usarse ventajosamente IAP tales como ML-IAP para fines de vacunación, ya que la regulación por disminución o pérdida de la expresión de tales polipéptidos (constituyendo por lo demás una forma de escape inmunitario) afectaría al crecimiento tumoral sostenido. Se identifican péptidos útiles específicos.

Lista de referencias

1. Van den Eynde, B.J. y Boon, T. (1997). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int.J.Clin.Lab.Res.* 27, 81-86.
2. Heslop, H.E. y Rooney, C.M. (1997). Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol Rev.* 157, 217-222.
3. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., y White, D.E. (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.* 4, 321-327.
4. Nestle, F.O., Aljagdic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., y Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat.Med.* 4, 328-332.
5. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E.B., Steinman, R.M., Enk, A., Kampgen, E., y Schuler, G. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J.Exp.Med.* 190, 1669-1678.
6. Rosenberg, S.A. (1996). Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens. *J.Natl.Cancer Inst.* 20, 1635-1644.
7. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Boursolond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P.Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P.G., van der Bruggen, P., y Boon, T. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA- A1. *Int.J.Cancer* 80, 219-230.
8. Cormier, J.N., Abati, A., Fetsch, P., Hijazi, Y.M., Rosenberg, S.A., Marincola, F.M., y Topalian, S.L. (1998). Comparative analysis of the *in vivo* expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J.Immunother.* 21, 27-31.
9. Becker, J.C., Schwinn, A., Dummer, R., Burg, G., y Brocker, E.B. (1993). Lesion-specific activation of cloned human tumor-infiltrating lymphocytes by autologous tumor cells: induction of proliferation and cytokine production. *J.Invest.Dermatol.* 101, 15-21.
10. Andersen, M.H., Pedersen, L.O., Becker, J.C., y thor Straten, P. (2001). Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the Apoptose Inhibitor Polypeptide Survivin in Cancer Patients. *Cancer Res.* 61, 869-872.
11. Andersen, M.H., Pedersen, L.O., Capeller, B., Brocker, E. B., Becker, J.C., y thor, S.P. (2001). Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes *in situ* as well as *ex vivo* in cancer patients. *Cancer Res.* 61, 5964-5968.
12. Jaattela, M. (1999). Escaping cell death: survival polypeptides in cancer. *Exp.Cell Res.* 248, 30-43.
13. Kasof, G.M. y Gomes, B.C. (2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis polypeptide family member. *J.Biol.Chem.* 276, 3238-3246.

14. Vucic, D., Stennicke, H.R., Pisabarro, M.T., Salvesen, G.S., y Dixit, V.M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr.Biol.* 10, 1359-1366.
15. Andersen, M.H., Sondergaard, I., Zeuthen, J., Elliott, T., y Haurum, J.S. (1999). An assay for peptide binding to HLA-Cw*0102. *Tissue Antigens.* 54, 185-190.
- 5 16. Andersen, M.H., Bonfill, J.E., Neisig, A., Arsequell, G., Sondergaard, I., Neefjes, J., Zeuthen, J., Elliott, T., y Haurum, J.S. (1999). Phosphorylated Peptides Can Be Transported by TAP Molecules, Presented by Class I MHC Molecules, and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL. *J.Immunol.* 163, 3812-3818.
17. McCutcheon, M., Wehner, N., Wensky, A., Kushner, M., Doan, S., Hsiao, L., Calabresi, P., Ha, T., Tran, T.V., Tate, K.M., Winkelhake, J., y Spack, E.G. (1997). A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J.Immunol.Methods* 210, 149-166.
- 10 18. Pass, H.A., Schwarz, S.L., Wunderlich, J.R., y Rosenberg, S.A. (1998). Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay [véanse los comentarios]. *Cancer J.Sci.Am.* 4, 316-323.
19. Berke, Z., Andersen, M.H., Pedersen, M., Fugger, L., Zeuthen, J., y Haurum, J.S. (2000). Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion polypeptides bind common HLA class I molecules. *Leukemia* 14, 419-426.
- 15 20. Andersen, M.H., Tan, L., Sondergaard, I., Zeuthen, J., Elliott, T., y Haurum, J.S. (2000). Poor correspondence between predicted and experimental binding of peptides to class I MHC molecules. *Tissue Antigens* 55, 519-531.
21. Scheibenbogen, C., Sun, Y., Keilholz, U., Song, M., Stevanovic, S., Asemissen, A.M., Nagorsen, D., Thiel, E., Rammensee, H.G., y Schadendorf, D. (2002). Identification of known and novel immunogenic T-cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cells from patients responding to IL-2-based treatment. *Int.J.Cancer* 20, 409-414.
22. Herr, W., Ranieri, E., Gambotto, A., Kierstead, L.S., Amoscato, A.A., Gesualdo, L., y Storkus, W.J. (1999). Identification of naturally processed and HLA-presented Epstein-Barr virus peptides recognized by CD4(+) or CD8(+) T lymphocytes from human blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12033-12038.
- 25 23. Yewdell, J.W. y Bennink, J.R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu.Rev.Immunol.* 17, 51-88.
24. Moudgil, K.D. y Sercarz, E.E. (1994). Can antitumor immune responses discriminate between self and nonself? *Immunol.Today* 15, 353-355.
- 30 25. Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A., y Kawakami, Y. (1996). Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201-binding residues. *J.Immunol.* 157, 2539-2548.
26. Ashhab, Y., Alian, A., Polliack, A., Panet, A., y Ben Yehuda, D. (2001). Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS Lett.* 20, 56-60.
- 35 27. Jager, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jager, D., Oesch, F., y Knuth, A. (1997). Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int.J.Cancer* 71, 142-147.
28. Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P., Byrd, D.R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M.M., Riddell, S.R., y Greenberg, P.D. (2000). Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo. *J.Exp.Med.* 192, 1637-1644.
- 40 29. Ennis, F.A., Yi-Hua, Q., y Schild, G.C. (1982). Antibody and cytotoxic T lymphocyte responses of humans to live and inactivated influenza vaccines. *J. Gen. Virol.* 58, 273-81.
30. Bategay, M., Moskophidis, D., Waldner, H., Brundler, M.A., Fung-Leung, W.P., Mak, T.W., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1993). Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 15, 5408-15.
- 45 31. Elvin, J., Potter, C., Elliott, T., Cerundolo, V., y Townsend, A. (1993). A method to quantify binding of unlabeled peptides to class I MHC molecules and detect their allele specificity. *J. Immunol. Methods.* 158, 161-171.
32. Zeh, H.J. 3rd, Perry-Lalley, D., Dudley, M.E., Rosenberg, S.A., y Yang, J.C (1999). High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol.*, 162, 989-94.

33. Kubo, R.T., Sette, A., Grey, H.M., Appella, E., Sakaguchi, K., Zhu, N.Z., Arnott, D., Sherman, N., Shabanowitz, J., Michel, H., *et al.* (1994). Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.* 152, 3913-3924.
- 5 34. Kessler, J.H., Mommaas, B., Mutis, T., Hujibers, I., Vissers, D., Benckhuijsen, W.E., Schreuder, G.M., Offringa, R., Goulmy, E., Melief, C.J., van der Burg, S.H., y Drijfhout, J.W. (2003). Competition-based cellular peptide binding assays for 13 prevalent HLA class I alleles using fluorescein-labeled synthetic peptides. *Hum. Immunol.* 64, 245-255.
35. Vonderheide, R.H., Anderson, K.S., Hahn, W.C., Butler, M.O., Schultze, J.L., y Nadler, L.M. (2001). Characterization of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive against the widely expressed tumor antigen telomerase. *Clin. Cancer Res.* 7, 3343-3348.
- 10 36. Schrama, D., Andersen, M.H., Terheyden, P., Schroder, L., Pedersen, L.O., thor Straten, P., Becker, J.C. (2001). Oligoclonal T-cell receptor usage of melanocyte differentiation antigen-reactive T cells in stage IV melanoma patients. *Cancer Res.* 61, 493-496.
37. Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V.S., y McMichael, A.J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J. Exp. Med.* 186, 859-865.
- 15 38. Scheibenbogen, C., Lee, K.H., Mayer, S., Stevanovic, S., Moebius, U., Herr, W., Rammensee, H.G., y Keilholz, U. (1997). A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of healthy donors and melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 3, 221-6.
39. Tan, L., Andersen, M.H., Elliott, T., y Haurum, J.S. (1997). An improved assembly assay for peptide binding to HLA-B*2705 and H-2K(k) class I MHC molecules, *J.Immunol.Methods* 209, 25.
- 20 40. Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A., y Schuler, G. (1999) Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application *J.Immunol.Methods* 223, 1.
41. Oelke, M., Moehrle, U., Behringer, D., Lindemann, A., Mackensen, A. (2000). Activation and purification of Melan-A-specific human CD8+ T cells in vitro for adoptive transfer in tumor immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 6, 1997-2005.
- 25 42. Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S., y Weber, J. (1999). Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin. Cancer Res.* 5, 2756.
- 30 43. Kensil, C. R., Patel, U., Lennick, M., Marciani, D. (1991). Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunol.* 146, 431-437.
44. Kensil, C.R., Wu, J.Y., Soltysik, S. (1995). Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. *Pharmaceut. Biotechnol.* 6, 525-541.
- 35 45. Cai, Z., Brunmark, A., Jackson, M.R., *et al.* (1996). Transfected drosophila cells as a probe for defining the minimal requirements for stimulating unprimed CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14736-14741.
46. Sun, S., Cai, Z., Langlade-Demoyen, P., *et al.* (1996). Dual function of *Drosophila* cells as APCs for naive CD8+ T cells: Implications for tumor immunotherapy. *Immunity* 4, 555-564.
47. Luxembourg, A.T., Borrow, B., Teyton, L., *et al.* (1998). Biomagnetic isolation of antigen-specific CD8+ T cells usable in immunotherapy. *Nat Biotechnol* 16, 281-285.
- 40 48. Schrama, D., Pedersen, L.O., Keikavoussi, P., Andersen, M.H., thor Straten, P., Brocker, E.B., Kampgen, E., y Becker, J.C. (2002). Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells. *J.Invest. Dermatol.* 119, 1443-1448.

Lista de secuencias

<110> Danish Cancer Society

<120> Vacuna terapéutica contra el cáncer

<130> P 734 PC00

5 <150> PA 2003 00572

<151> 04-11-2003

<160> 318

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

10 <211> 297

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg Gly Pro Gln Pro
1 5 10 15

Ser His Trp Ala Ala Gly Asp Gly Pro Thr Gln Glu Arg Cys Gly Pro
20 25 30

Arg Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly Leu Asp Thr Cys Arg Ala Trp
35 40 45

Asp His Val Asp Gly Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu Thr Glu
50 55 60

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Ala Thr Leu Ser Arg Gly Pro Ala
65 70 75 80

Phe Pro Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp
85 90 95

Trp Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly
100 105 110

Phe Phe His Thr Gly His Gln Asp Lys Val Arg Cys Phe Phe Cys Tyr
115 120 125

ES 2 415 336 T3

Gly Gly Leu Gln Ser Trp Lys Arg Gly Asp Asp Pro Trp Thr His Ala
 130 135 140

Lys Trp Phe Pro Ser Cys Gln Phe Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp
 145 150 155 160

Phe Val His Ser Val Gln Glu Thr His Ser Gln Leu Leu Gly Ser Trp
 165 170 175

Asp Pro Trp Glu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Pro Val Ala Pro Ser Val
 180 185 190

Pro Ala Ser Gly Tyr Pro Glu Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val Gln
 195 200 205

Ser Glu Ser Ala Gln Glu Pro Gly Gly Val Ser Pro Ala Glu Ala Gln
 210 215 220

Arg Ala Trp Trp Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg Asp Val Glu Ala
 225 230 235 240

Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Leu Asp
 245 250 255

Arg Ala Val Ser Ile Val Phe Val Pro Cys Gly His Leu Val Cys Ala
 260 265 270

Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val
 275 280 285

Arg Ser Arg Val Arg Thr Phe Leu Ser
 290 295

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys
 1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3
 Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu
 1 5
 5 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4
 Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His
 10 1 5
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 5
 Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg Gly
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7
 Ser Ala Lys Cys Leu His Arg Gly Pro
 1 5
 <210> 8
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

Ala Lys Cys Leu His Arg Gly Pro Gln
 1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 Lys Cys Leu His Arg Gly Pro Gln Pro
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 Cys Leu His Arg Gly Pro Gln Pro Ser
 1 5
 <210> 11
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 Leu His Arg Gly Pro Gln Pro Ser His
 1 5
 20 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 His Arg Gly Pro Gln Pro Ser His Trp
 25 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 13
 Arg Gly Pro Gln Pro Ser His Trp Ala
 1 5
 <210> 14

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 Gly Pro Gln Pro Ser His Trp Ala Ala
 5 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 15
 Pro Gln Pro Ser His Trp Ala Ala Gly
 1 5
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16
 Gln Pro Ser His Trp Ala Ala Gly Asp
 1 5
 <210> 17
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17
 Pro Ser His Trp Ala Ala Gly Asp Gly
 1 5
 <210> 18
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18
 Ser His Trp Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 1 5
 30 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19
 His Trp Ala Ala Gly Asp Gly Pro Thr
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20
 Trp Ala Ala Gly Asp Gly Pro Thr Gln
 1 5
 <210> 21
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21
 Ala Ala Gly Asp Gly Pro Thr Gln Glu
 1 5
 15 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22
 Ala Gly Asp Gly Pro Thr Gln Glu Arg
 20 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 23
 Gly Asp Gly Pro Thr Gln Glu Arg Cys
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24
 Asp Gly Pro Thr Gln Glu Arg Cys Gly
 1 5
 <210> 25

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25
 5 Gly Pro Thr Gln Glu Arg Cys Gly Pro
 1 5
 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 26
 Pro Thr Gln Glu Arg Cys Gly Pro Arg
 1 5
 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27
 Thr Gln Glu Arg Cys Gly Pro Arg Ser
 1 5
 <210> 28
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28
 Gln Glu Arg Cys Gly Pro Arg Ser Leu
 1 5
 <210> 29
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29
 Glu Arg Cys Gly Pro Arg Ser Leu Gly
 1 5
 30 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30
 Arg Cys Gly Pro Arg Ser Leu Gly Ser
 1 5
 <210> 31
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31
 Cys Gly Pro Arg Ser Leu Gly Ser Pro
 1 5
 <210> 32
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 32
 Gly Pro Arg Ser Leu Gly Ser Pro Val
 1 5
 15 <210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33
 Pro Arg Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu
 20 1 5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 34
 Arg Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly
 1 5
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35
 Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu Gly Leu
 1 5
 <210> 36

<400> 41
 Leu Gly Leu Asp Thr Cys Arg Ala Trp
 1 5

<210> 42
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 42
 Gly Leu Asp Thr Cys Arg Ala Trp Asp
 1 5

<210> 43
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43
 Leu Asp Thr Cys Arg Ala Trp Asp His
 1 5

15 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44
 Asp Thr Cys Arg Ala Trp Asp His Val
 20 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 45
 Thr Cys Arg Ala Trp Asp His Val Asp
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 <212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46
 Cys Arg Ala Trp Asp His Val Asp Gly
 1 5

<210> 47

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 47
 5 Arg Ala Trp Asp His Val Asp Gly Gln
 1 5
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 48
 Ala Trp Asp His Val Asp Gly Gln Ile
 1 5
 <210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 49
 Trp Asp His Val Asp Gly Gln Ile Leu
 1 5
 <210> 50
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 50
 Asp His Val Asp Gly Gln Ile Leu Gly
 1 5
 <210> 51
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 51
 His Val Asp Gly Gln Ile Leu Gly Gln
 1 5
 30 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

Val Asp Gly Gln Ile Leu Gly Gln Leu
1 5

<210> 53

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 53

Asp Gly Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg
1 5

<210> 54

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 54

Gly Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro
1 5

15 <210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 55

Gln Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu
1 5

20 <210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 56

Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu Thr
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu Thr Glu
1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 58

Gly Gln Leu Arg Pro Leu Thr Glu Glu
1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

Gln Leu Arg Pro Leu Thr Glu Glu Glu
1 5

<210> 60

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Leu Arg Pro Leu Thr Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 61

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Arg Pro Leu Thr Glu Glu Glu Glu
1 5

25 <210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 62

30 Pro Leu Thr Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 63

Leu Thr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly
1 5

<210> 64

5 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

Thr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala
1 5

10 <210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

15 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 66

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Ala
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 67

Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gly Ala Thr
1 5

<210> 68

<211> 9

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

Glu Glu Glu Gly Ala Gly Ala Thr Leu
 1 5
 <210> 69
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69
 Glu Glu Gly Ala Gly Ala Thr Leu Ser
 1 5
 <210> 70
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70
 Glu Gly Ala Gly Ala Thr Leu Ser Arg
 1 5
 <210> 71
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71
 Gly Ala Gly Ala Thr Leu Ser Arg Gly
 1 5
 20 <210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72
 Ala Gly Ala Thr Leu Ser Arg Gly Pro
 25 1 5
 <210> 73
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 73
 Gly Ala Thr Leu Ser Arg Gly Pro Ala
 1 5
 <210> 74

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 74
 5 Ala Thr Leu Ser Arg Gly Pro Ala Phe
 1 5
 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 75
 Thr Leu Ser Arg Gly Pro Ala Phe Pro
 1 5
 <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 76
 Leu Ser Arg Gly Pro Ala Phe Pro Gly
 1 5
 <210> 77
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 77
 Ser Arg Gly Pro Ala Phe Pro Gly Met
 1 5
 <210> 78
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 78
 Arg Gly Pro Ala Phe Pro Gly Met Gly
 1 5
 30 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

Gly Pro Ala Phe Pro Gly Met Gly Ser
1 5

<210> 80

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 80

Pro Ala Phe Pro Gly Met Gly Ser Glu
1 5

<210> 81

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 81

Ala Phe Pro Gly Met Gly Ser Glu Glu
1 5

15 <210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

Phe Pro Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu
1 5

20 <210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 83

Pro Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 84

Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu
1 5

<210> 85

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 85
 5 Met Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu Ala
 1 5
 <210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 86
 Gly Ser Glu Glu Leu Arg Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 87
 Ser Glu Glu Leu Arg Leu Ala Ser Phe
 1 5
 <210> 88
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 88
 Glu Glu Leu Arg Leu Ala Ser Phe Tyr
 1 5
 <210> 89
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89
 Glu Leu Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp
 1 5
 30 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 90
 Leu Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp Trp
 1 5

<210> 91
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 91
 Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp Trp Pro
 1 5

<210> 92
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92
 Leu Ala Ser Phe Tyr Asp Trp Pro Leu
 1 5

15 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 93
 Ala Ser Phe Tyr Asp Trp Pro Leu Thr
 20 1 5

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 94
 Ser Phe Tyr Asp Trp Pro Leu Thr Ala
 1 5

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 95
 Phe Tyr Asp Trp Pro Leu Thr Ala Glu
 1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 96

Tyr Asp Trp Pro Leu Thr Ala Glu Val
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 97

Asp Trp Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro
1 5

<210> 98

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 98

Trp Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro
1 5

<210> 99

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu
1 5

25 <210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 100

30 Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
1 5

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*
 <400> 101
 Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu Leu
 1 5
 <210> 102
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 102
 Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu Leu Ala
 1 5
 10 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 103
 15 Glu Val Pro Pro Glu Leu Leu Ala Ala
 1 5
 <210> 104
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 104
 Val Pro Pro Glu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5
 <210> 105
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 105
 Pro Pro Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly
 1 5
 <210> 106
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 106
 Pro Glu Leu Ala Ala Ala Gly Phe
 1 5

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 107

Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Phe Phe
1 5

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 108

Leu Leu Ala Ala Ala Gly Phe Phe His
1 5

<210> 109

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 109

Leu Ala Ala Ala Gly Phe Phe His Thr
1 5

<210> 110

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 110

Ala Ala Ala Gly Phe Phe His Thr Gly
1 5

25 <210> 111

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 111

30 Ala Ala Gly Phe Phe His Thr Gly His
1 5

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Ala Gly Phe Phe His Thr Gly His Gln
1 5

<210> 113

5 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 113

Gly Phe Phe His Thr Gly His Gln Asp
1 5

10 <210> 114

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 114

15 Phe Phe His Thr Gly His Gln Asp Lys
1 5

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 115

Phe His Thr Gly His Gln Asp Lys Val
1 5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 116

His Thr Gly His Gln Asp Lys Val Arg
1 5

<210> 117

<211> 9

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 117

Thr Gly His Gln Asp Lys Val Arg Cys
 1 5
 <210> 118
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 118
 Gly His Gln Asp Lys Val Arg Cys Phe
 1 5
 <210> 119
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 119
 His Gln Asp Lys Val Arg Cys Phe Phe
 1 5
 <210> 120
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 120
 Gln Asp Lys Val Arg Cys Phe Phe Cys
 1 5
 20 <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 121
 Asp Lys Val Arg Cys Phe Phe Cys Tyr
 25 1 5
 <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 122
 Lys Val Arg Cys Phe Phe Cys Tyr Gly
 1 5
 <210> 123
 <211> 9

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 123
 Val Arg Cys Phe Phe Cys Tyr Gly Gly
 1 5
 5 <210> 124
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 124
 Arg Cys Phe Phe Cys Tyr Gly Gly Leu
 10 1 5
 <210> 125
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 125
 Cys Phe Phe Cys Tyr Gly Gly Leu Gln
 1 5
 <210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 126
 Phe Phe Cys Tyr Gly Gly Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 127
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 127
 Phe Cys Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Trp
 1 5
 <210> 128
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 128

Cys Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Trp Lys
 1 5
 <210> 129
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 129
 Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Trp Lys Arg
 1 5
 <210> 130
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 130
 Gly Gly Leu Gln Ser Trp Lys Arg Gly
 1 5
 <210> 131
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 131
 Gly Leu Gln Ser Trp Lys Arg Gly Asp
 1 5
 20 <210> 132
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 132
 Leu Gln Ser Trp Lys Arg Gly Asp Asp
 25 1 5
 <210> 133
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 133
 Gln Ser Trp Lys Arg Gly Asp Asp Pro
 1 5
 <210> 134
 <211> 9

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 134
 Ser Trp Lys Arg Gly Asp Asp Pro Trp
 1 5
 5 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 135
 Trp Lys Arg Gly Asp Asp Pro Trp Thr
 10 1 5
 <210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 136
 Lys Arg Gly Asp Asp Pro Trp Thr His
 1 5
 <210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 137
 Arg Gly Asp Asp Pro Trp Thr His Ala
 1 5
 <210> 138
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 138
 Gly Asp Asp Pro Trp Thr His Ala Lys
 1 5
 <210> 139
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 139

Asp Asp Pro Trp Thr His Ala Lys Trp
 1 5
 <210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 140
 Asp Pro Trp Thr His Ala Lys Trp Phe
 1 5
 <210> 141
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141
 Pro Trp Thr His Ala Lys Trp Phe Pro
 1 5
 <210> 142
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142
 Trp Thr His Ala Lys Trp Phe Pro Ser
 1 5
 20 <210> 143
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143
 Thr His Ala Lys Trp Phe Pro Ser Cys
 25 1 5
 <210> 144
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 144
 His Ala Lys Trp Phe Pro Ser Cys Gln
 1 5
 <210> 145

<400> 150
 Ser Cys Gln Phe Leu Leu Arg Ser Lys
 1 5
 <210> 151
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 151
 Cys Gln Phe Leu Leu Arg Ser Lys Gly
 1 5
 <210> 152
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 152
 Gln Phe Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg
 1 5
 15 <210> 153
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 153
 Phe Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp
 20 1 5
 <210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 154
 Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe
 1 5
 <210> 155
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 155
 Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe Val
 1 5

<210> 156
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 156
 Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe Val His
 1 5
 <210> 157
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 157
 Ser Lys Gly Arg Asp Phe Val His Ser
 1 5
 <210> 158
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 158
 Lys Gly Arg Asp Phe Val His Ser Val
 1 5
 <210> 159
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 159
 Gly Arg Asp Phe Val His Ser Val Gln
 1 5
 25 <210> 160
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 160
 Arg Asp Phe Val His Ser Val Gln Glu
 30 1 5
 <210> 161
 <211> 9
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*
 <400> 161
 Asp Phe Val His Ser Val Gln Glu Thr
 1 5
 <210> 162
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 162
 Phe Val His Ser Val Gln Glu Thr His
 1 5
 10 <210> 163
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 163
 Val His Ser Val Gln Glu Thr His Ser
 15 1 5
 <210> 164
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 164
 His Ser Val Gln Glu Thr His Ser Gln
 1 5
 <210> 165
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 165
 Ser Val Gln Glu Thr His Ser Gln Leu
 1 5
 <210> 166
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 166

Val Gln Glu Thr His Ser Gln Leu Leu
 1 5
 <210> 167
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 167
 Gln Glu Thr His Ser Gln Leu Leu Gly
 1 5
 <210> 168
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 168
 Glu Thr His Ser Gln Leu Leu Gly Ser
 1 5
 <210> 169
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 169
 Thr His Ser Gln Leu Leu Gly Ser Trp
 1 5
 20 <210> 170
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 170
 His Ser Gln Leu Leu Gly Ser Trp Asp
 25 1 5
 <210> 171
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 171
 Ser Gln Leu Leu Gly Ser Trp Asp Pro
 1 5
 <210> 172

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 172
 5 Gln Leu Leu Gly Ser Trp Asp Pro Trp
 1 5
 <210> 173
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 173
 Leu Leu Gly Ser Trp Asp Pro Trp Glu
 1 5
 <210> 174
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 174
 Leu Gly Ser Trp Asp Pro Trp Glu Glu
 1 5
 <210> 175
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 175
 Gly Ser Trp Asp Pro Trp Glu Glu Pro
 1 5
 <210> 176
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 176
 Ser Trp Asp Pro Trp Glu Glu Pro Glu
 1 5
 30 <210> 177
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 177

Trp Asp Pro Trp Glu Glu Pro Glu Asp
1 5

<210> 178

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 178

Asp Pro Trp Glu Glu Pro Glu Asp Ala
1 5

<210> 179

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 179

Pro Trp Glu Glu Pro Glu Asp Ala Ala
1 5

15 <210> 180

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 180

20 Trp Glu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 181

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 181

Glu Glu Pro Glu Asp Ala Ala Pro Val
1 5

<210> 182

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 182

Glu Pro Glu Asp Ala Ala Pro Val Ala
1 5

<210> 183

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 183
 Pro Glu Asp Ala Ala Pro Val Ala Pro
 5 1 5
 <210> 184
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 184
 Glu Asp Ala Ala Pro Val Ala Pro Ser
 1 5
 <210> 185
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 185
 Asp Ala Ala Pro Val Ala Pro Ser Val
 1 5
 <210> 186
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 186
 Ala Ala Pro Val Ala Pro Ser Val Pro
 1 5
 <210> 187
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 187
 Ala Pro Val Ala Pro Ser Val Pro Ala
 1 5
 30 <210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 188
 Pro Val Ala Pro Ser Val Pro Ala Ser
 1 5
 <210> 189
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 189
 Val Ala Pro Ser Val Pro Ala Ser Gly
 1 5
 <210> 190
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 190
 Ala Pro Ser Val Pro Ala Ser Gly Tyr
 1 5
 15 <210> 191
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 191
 Pro Ser Val Pro Ala Ser Gly Tyr Pro
 20 1 5
 <210> 192
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 192
 Ser Val Pro Ala Ser Gly Tyr Pro Glu
 1 5
 <210> 193
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 193
 Val Pro Ala Ser Gly Tyr Pro Glu Leu
 1 5
 <210> 194

<400> 199
 Pro Glu Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu
 1 5
 <210> 200
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 200
 Glu Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val
 1 5
 <210> 201
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 201
 Leu Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val Gln
 1 5
 15 <210> 202
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 202
 Pro Thr Pro Arg Arg Glu Val Gln Ser
 20 1 5
 <210> 203
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 203
 Thr Pro Arg Arg Glu Val Gln Ser Glu
 1 5
 <210> 204
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 204
 Pro Arg Arg Glu Val Gln Ser Glu Ser
 1 5
 <210> 205

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 205
 5 Arg Arg Glu Val Gln Ser Glu Ser Ala
 1 5
 <210> 206
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 206
 Arg Glu Val Gln Ser Glu Ser Ala Gln
 1 5
 <210> 207
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 207
 Glu Val Gln Ser Glu Ser Ala Gln Glu
 1 5
 <210> 208
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 208
 Val Gln Ser Glu Ser Ala Gln Glu Pro
 1 5
 <210> 209
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 209
 Gln Ser Glu Ser Ala Gln Glu Pro Gly
 1 5
 30 <210> 210
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 210
 Ser Glu Ser Ala Gln Glu Pro Gly Gly
 1 5
 <210> 211
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 211
 Glu Ser Ala Gln Glu Pro Gly Gly Val
 1 5
 <210> 212
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 212
 Ser Ala Gln Glu Pro Gly Gly Val Ser
 1 5
 15 <210> 213
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 213
 Ala Gln Glu Pro Gly Gly Val Ser Pro
 20 1 5
 <210> 214
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 214
 Gln Glu Pro Gly Gly Val Ser Pro Ala
 1 5
 <210> 215
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 215
 Glu Pro Gly Gly Val Ser Pro Ala Glu
 1 5

<210> 216

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 216

Pro Gly Gly Val Ser Pro Ala Glu Ala
1 5

<210> 217

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 217

Gly Gly Val Ser Pro Ala Glu Ala Gln
1 5

<210> 218

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 218

Gly Val Ser Pro Ala Glu Ala Gln Arg
1 5

<210> 219

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 219

Val Ser Pro Ala Glu Ala Gln Arg Ala
1 5

25 <210> 220

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 220

30 Ser Pro Ala Glu Ala Gln Arg Ala Trp
1 5

<210> 221

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*
 <400> 221
 Pro Ala Glu Ala Gln Arg Ala Trp Trp
 1 5
 <210> 222
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 222
 Ala Glu Ala Gln Arg Ala Trp Trp Val
 1 5
 10 <210> 223
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 223
 Glu Ala Gln Arg Ala Trp Trp Val Leu
 15 1 5
 <210> 224
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 224
 Ala Gln Arg Ala Trp Trp Val Leu Glu
 1 5
 <210> 225
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 225
 Gln Arg Ala Trp Trp Val Leu Glu Pro
 1 5
 <210> 226
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 226
 Arg Ala Trp Trp Val Leu Glu Pro Pro
 1 5

<210> 227

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 227

Ala Trp Trp Val Leu Glu Pro Pro Gly
1 5

<210> 228

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 228

Trp Trp Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala
1 5

<210> 229

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 229

Trp Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg
1 5

<210> 230

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 230

Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg Asp
1 5

25 <210> 231

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 231

30 Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg Asp Val
1 5

<210> 232

<211> 9

<212> PRT

Arg Asp Val Glu Ala Gln Leu Arg Arg
 1 5
 <210> 238
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 238
 Asp Val Glu Ala Gln Leu Arg Arg Leu
 1 5
 <210> 239
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 239
 Val Glu Ala Gln Leu Arg Arg Leu Gln
 1 5
 <210> 240
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 240
 Glu Ala Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu
 1 5
 20 <210> 241
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 241
 Ala Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu
 25 1 5
 <210> 242
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 242
 Gln Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg
 1 5
 <210> 243
 <211> 9

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 243
 Leu Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr
 1 5
 5 <210> 244
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 244
 Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys
 10 1 5
 <210> 245
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 245
 Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys
 1 5
 <210> 246
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 246
 Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val
 1 5
 <210> 247
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 247
 Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys
 1 5
 <210> 248
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 248

Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Leu
 1 5
 <210> 249
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 249
 Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Leu Asp
 1 5
 <210> 250
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 250
 Arg Thr Cys Lys Val Cys Leu Asp Arg
 1 5
 <210> 251
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 251
 Thr Cys Lys Val Cys Leu Asp Arg Ala
 1 5
 20 <210> 252
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 252
 Cys Lys Val Cys Leu Asp Arg Ala Val
 25 1 5
 <210> 253
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 253
 Lys Val Cys Leu Asp Arg Ala Val Ser
 1 5
 <210> 254

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 254
 Val Cys Leu Asp Arg Ala Val Ser Ile
 5 1 5
 <210> 255
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 255
 Cys Leu Asp Arg Ala Val Ser Ile Val
 1 5
 <210> 256
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 256
 Leu Asp Arg Ala Val Ser Ile Val Phe
 1 5
 <210> 257
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 257
 Asp Arg Ala Val Ser Ile Val Phe Val
 1 5
 <210> 258
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 258
 Arg Ala Val Ser Ile Val Phe Val Pro
 1 5
 30 <210> 259
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 259
 Ala Val Ser Ile Val Phe Val Pro Cys
 1 5
 <210> 260
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 260
 Val Ser Ile Val Phe Val Pro Cys Gly
 1 5
 <210> 261
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 261
 Ser Ile Val Phe Val Pro Cys Gly His
 1 5
 15 <210> 262
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 262
 Ile Val Phe Val Pro Cys Gly His Leu
 20 1 5
 <210> 263
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 263
 Val Phe Val Pro Cys Gly His Leu Val
 1 5
 <210> 264
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 264
 Phe Val Pro Cys Gly His Leu Val Cys
 1 5
 <210> 265

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 265
 5 Val Pro Cys Gly His Leu Val Cys Ala
 1 5
 <210> 266
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 266
 Pro Cys Gly His Leu Val Cys Ala Glu
 1 5
 <210> 267
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 267
 Cys Gly His Leu Val Cys Ala Glu Cys
 1 5
 <210> 268
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 268
 Gly His Leu Val Cys Ala Glu Cys Ala
 1 5
 <210> 269
 25 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 269
 His Leu Val Cys Ala Glu Cys Ala Pro
 1 5
 30 <210> 270
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 270
 Leu Val Cys Ala Glu Cys Ala Pro Gly
 1 5

<210> 271
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 271
 Val Cys Ala Glu Cys Ala Pro Gly Leu
 1 5

<210> 272
 10 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 272
 Cys Ala Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gln
 1 5

15 <210> 273
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 273
 Ala Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gln Leu
 20 1 5

<210> 274
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 274
 Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gln Leu Cys
 1 5

<210> 275
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 275
 Cys Ala Pro Gly Leu Gln Leu Cys Pro
 1 5

<210> 276

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 276

Ala Pro Gly Leu Gln Leu Cys Pro Ile
1 5

<210> 277

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 277

Pro Gly Leu Gln Leu Cys Pro Ile Cys
1 5

<210> 278

<211> 9

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 278

Gly Leu Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg
1 5

<210> 279

20 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 279

Leu Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala
1 5

25 <210> 280

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 280

30 Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro
1 5

<210> 281

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 281

Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val
1 5

<210> 282

5 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 282

Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val Arg
1 5

10 <210> 283

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 283

Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val Arg Ser
1 5

15 <210> 284

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 284

Ile Cys Arg Ala Pro Val Arg Ser Arg
1 5

<210> 285

<211> 9

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 285

Cys Arg Ala Pro Val Arg Ser Arg Val
1 5

<210> 286

<211> 9

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 286

Arg Ala Pro Val Arg Ser Arg Val Arg
 1 5
 <210> 287
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 287
 Ala Pro Val Arg Ser Arg Val Arg Thr
 1 5
 <210> 288
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 288
 Pro Val Arg Ser Arg Val Arg Thr Phe
 1 5
 <210> 289
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 289
 Val Arg Ser Arg Val Arg Thr Phe Leu
 1 5
 20 <210> 290
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 290
 Arg Ser Arg Val Arg Thr Phe Leu Ser
 25 1 5
 <210> 291
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 291
 Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu
 1 5 10
 <210> 292
 <211> 11

ES 2 415 336 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 292
 Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His
 1 5 10
 5 <210> 293
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 293
 Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg
 10 1 5 10
 <210> 294
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 294
 Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg Gly
 1 5 10
 <210> 295
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 295
 Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg Gly Pro
 1 5 10
 <210> 296
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 296
 Met Gly Pro Lys Asp Ser Ala Lys Cys Leu His Arg Gly Pro Gln
 1 5 10 15
 <210> 297
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 297

Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys Val
 1 5 10
 <210> 298
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 298
 Gln Leu Cys Pro Ile Cys Arg Ala Pro Val
 1 5 10
 <210> 299
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 299
 Arg Leu Ala Ser Phe Tyr Asp Trp Pro Leu
 1 5 10
 <210> 300
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 300
 Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe Val
 1 5 10
 20 <210> 301
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 301
 Val Leu Glu Pro Pro Gly Ala Arg Asp Val
 25 1 5 10
 <210> 302
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 302
 Pro Leu Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu
 1 5 10
 <210> 303
 <211> 10

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 303
 Ser Glu Glu Leu Arg Leu Ala Ser Phe Tyr
 1 5 10
 5 <210> 304
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 304
 Val Gln Glu Thr His Ser Gln Leu Leu Gly
 10 1 5 10
 <210> 305
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 305
 Thr Ala Glu Val Pro Pro Glu Leu Leu Ala
 1 5 10
 <210> 306
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 306
 Gln Asp Lys Val Arg Cys Phe Phe Cys Tyr
 1 5 10
 <210> 307
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 307
 Lys Val Cys Leu Asp Arg Ala Val Ser Ile
 1 5 10
 <210> 308
 30 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 308

Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys
 1 5 10
 <210> 309
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 309
 Phe Leu Leu Arg Ser Lys Gly Arg Asp Phe
 1 5 10
 <210> 310
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 310
 Glu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Phe Phe His
 1 5 10
 <210> 311
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 311
 Cys Leu Asp Arg Ala Val Ser Ile Val Phe
 1 5 10
 20 <210> 312
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 312
 Ile Leu Gly Gln Leu Arg Pro Leu Thr Glu
 25 1 5 10
 <210> 313
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 313
 Phe Cys Tyr Gly Gly Leu Gln Ser Trp Lys
 1 5 10
 <210> 314

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 314

5 Ala Phe Pro Gly Met Gly Ser Glu Glu Leu
1 5 10

<210> 315

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 315

Gly Pro Arg Ser Leu Gly Ser Pro Val Leu
1 5 10

<210> 316

<211> 10

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 316

Val Arg Cys Phe Phe Cys Tyr Gly Gly Leu
1 5 10

<210> 317

<211> 10

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 317

Arg Arg Leu Gln Glu Glu Arg Thr Cys Lys
1 5 10

<210> 318

25 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 318

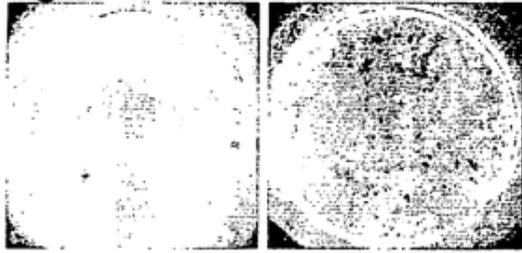
Glu Arg Thr Cys Lys Val Cys Leu Asp Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Fragmento de polipéptido que provoca una respuesta de células T y que comprende un péptido, que consiste en al menos 9 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP y se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) RLQEERTCK (SEQ ID NO: 245),
 - (ii) RLQEERTCKV (SEQ ID NO: 297),
 - 5 (iii) QLCPICRAPV (SEQ ID NO: 298),
 - (iv) VLEPPGARDV (SEQ ID NO: 301);
 consistiendo dicho fragmento de polipéptido como máximo en 15 aminoácidos consecutivos.
2. Fragmento de polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de polipéptido
 - (a) tiene un valor de C_{50} inferior a 1000, midiéndose dicho valor como la concentración (μM) del fragmento de polipéptido requerida para la mitad de la unión máxima a una molécula de clase I de CMH,
 - (b) provoca una respuesta de células T que tiene más de 50 puntos específicos para péptido por 10^5 células medida en un ensayo ELISPOT realizado tras estimulación previa *in vitro*; o que tiene más de 50 puntos específicos para péptido por 10^6 células medidos en un ensayo ELISPOT realizado (i) sin estimulación previa *in vitro*; o (ii) usando PBL de un individuo que no se ha sometido a terapia inmunitaria contra una enfermedad neoplásica, o
 - (c) puede activar el crecimiento de células T *in vitro* de modo que pueden recogerse más de 10^5 CTL específicos para antígeno tras cuatro ciclos de estimulación comenzando con 10^4 PBMC.
3. Fragmento de polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho valor de C_{50} es inferior a 100.
4. Fragmento de polipéptido según la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho valor de C_{50} es inferior a 31.
- 20 5. Fragmento de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 2 - 4, en el que dicho valor de C_{50} es inferior a 5.
6. Fragmento de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, consistiendo dicho fragmento de polipéptido como máximo en 10 aminoácidos consecutivos.
- 25 7. Método *ex vivo* de selección de un péptido que comprende un fragmento de ML-IAP para su uso en una composición de vacuna, comprendiendo dicho método las etapas de
 - (i) proporcionar un fragmento de polipéptido que comprende un péptido que consiste en al menos 9 residuos de aminoácido consecutivos de ML-IAP (SEQ ID NO: 1) seleccionado del grupo que consiste en: RLQEERTCK (SEQ ID NO: 245), QILGQLRPL (SEQ ID NO: 55), LTAEVPPPEL (SEQ ID NO: 100), GMGSEELRL (SEQ ID NO: 84), ELPTPRREV (SEQ ID NO: 200), RLQEERTCKV (SEQ ID NO: 297), QLCPICRAPV (SEQ ID NO: 298), LLSKGRDFV (SEQ ID NO: 300), VLEPPGARDV (SEQ ID NO: 301) y PLTAEVPPPEL (SEQ ID NO: 302), en el que dicho fragmento de polipéptido consiste como máximo en 15 aminoácidos,
 - (ii) someter a prueba respuestas de células T específicas contra fragmentos de ML-IAP mediante un ensayo ELISPOT, usando linfocitos de sangre periférica (PBL) aislados derivados de un individuo que no se ha inmunizado previamente con ML-IAP o un fragmento del mismo, y
 - 35 (iii) seleccionar fragmentos de ML-IAP en los que dicha respuesta de células T corresponde a, o es mejor que, un criterio de selección predeterminado.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicho criterio de selección predeterminado es más de 50 puntos específicos para péptido por 10^6 células en dicho ensayo ELISPOT.
9. Fragmento de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como medicamento.
- 40 10. Fragmento de polipéptido según la reivindicación 9, para su uso como medicamento para el tratamiento de enfermedad autoinmunitaria o cáncer mediado por o relacionado con ML-IAP.
11. Composición de vacuna que comprende al menos un fragmento de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, junto con un portador y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 45 12. Composición de vacuna según la reivindicación 11, que comprende un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en Montanide ISA- 51 y QS-21.

13. Composición de vacuna según la reivindicación 11, que comprende células dendríticas como portador.
14. Composición de vacuna según la reivindicación 11, que comprende más de un fragmento de polipéptido diferente, seleccionándose dicho fragmento de polipéptido del grupo que se especifica en la reivindicación 1.
- 5 15. Composición de vacuna según la reivindicación 12, que comprende al menos dos fragmentos de polipéptido diferentes, seleccionándose dicho fragmento de polipéptido del grupo que se especifica en la reivindicación 1, pudiendo cada uno asociarse con una molécula de HLA diferente seleccionada del grupo que consiste en HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A24, HLA-B7, HLA-B27 y HLA-B44.
- 10 16. Composición farmacéutica que comprende una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 11-15 y un medicamento anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico o inmunoterápico.
17. Kit de partes que comprende (i) una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 11 - 15 y (ii) un medicamento anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterápico o inmunoterápico.
- 15 18. Uso de uno o más fragmentos de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, o una composición de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 11 - 15, o una composición farmacéutica según la reivindicación 16, o un kit de partes según la reivindicación 17, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o cáncer mediado por o relacionado con ML-IAP en un individuo.
19. Uso según la reivindicación 18, en el que al menos uno de dichos fragmentos de polipéptido se limita a una molécula de HLA presente en dicho individuo.
- 20 20. Uso según la reivindicación 18 ó 19, en el que dicho individuo no se ha sometido anteriormente a terapia inmunitaria contra una enfermedad neoplásica.
21. Anticuerpo que puede reconocer específicamente un fragmento de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6.
- 25 22. Método para activar y expandir células T específicas para ML-IAP o fragmentos del mismo que comprende las etapas de cultivar conjuntamente células T y uno o más fragmentos de polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
23. Método según la reivindicación 22, comprendiendo el método
- (a) generar y cargar células dendríticas (DC) derivadas de monocitos con dicho(s) fragmento(s) de polipéptido y cultivar conjuntamente dichas DC y monocitos de sangre periférica (PBMC) que comprenden células T,
- 30 o
- (b) generar células de *Drosophila melanogaster* que expresan una o más moléculas de HLA diferentes, cargar dichas células de *Drosophila melanogaster* con dicho(s) fragmento(s) de polipéptido y cultivar conjuntamente dichas células de *Drosophila* con monocitos de sangre periférica (PBMC) que comprenden células T o células T purificadas a partir de PBMC.
- 35 24. Uso de células T específicas para ML-IAP obtenidas mediante el método según la reivindicación 22 ó 23, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o cáncer.

Figura 1A



Sin péptido

MLIAP₂₈₀

Figura 1B



Sin péptido

MLIAP₂₈₀

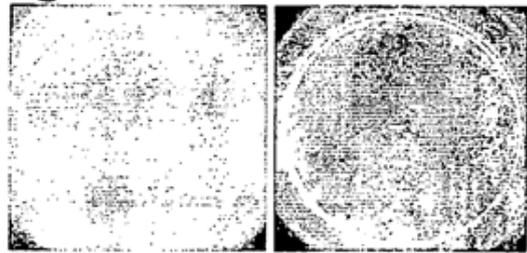
Figura 1C



Sin péptido

MLIAP₂₈₀

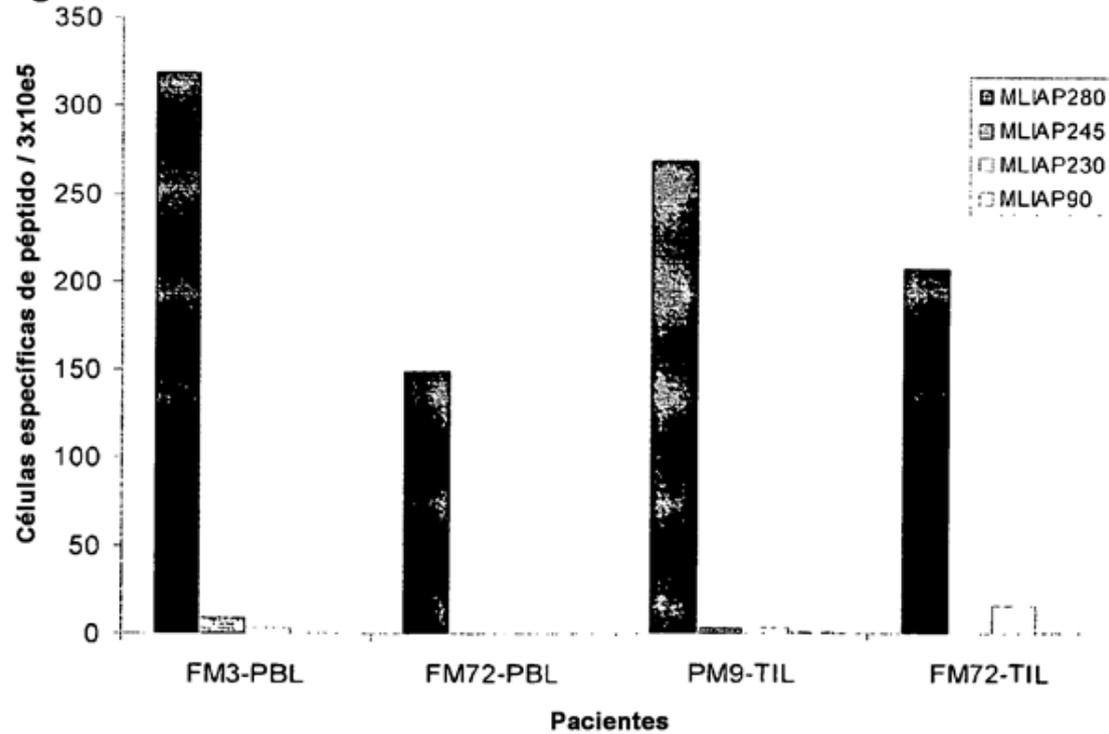
Figura 1C



Sin péptido

MLIAP₂₈₀

Figura 1D



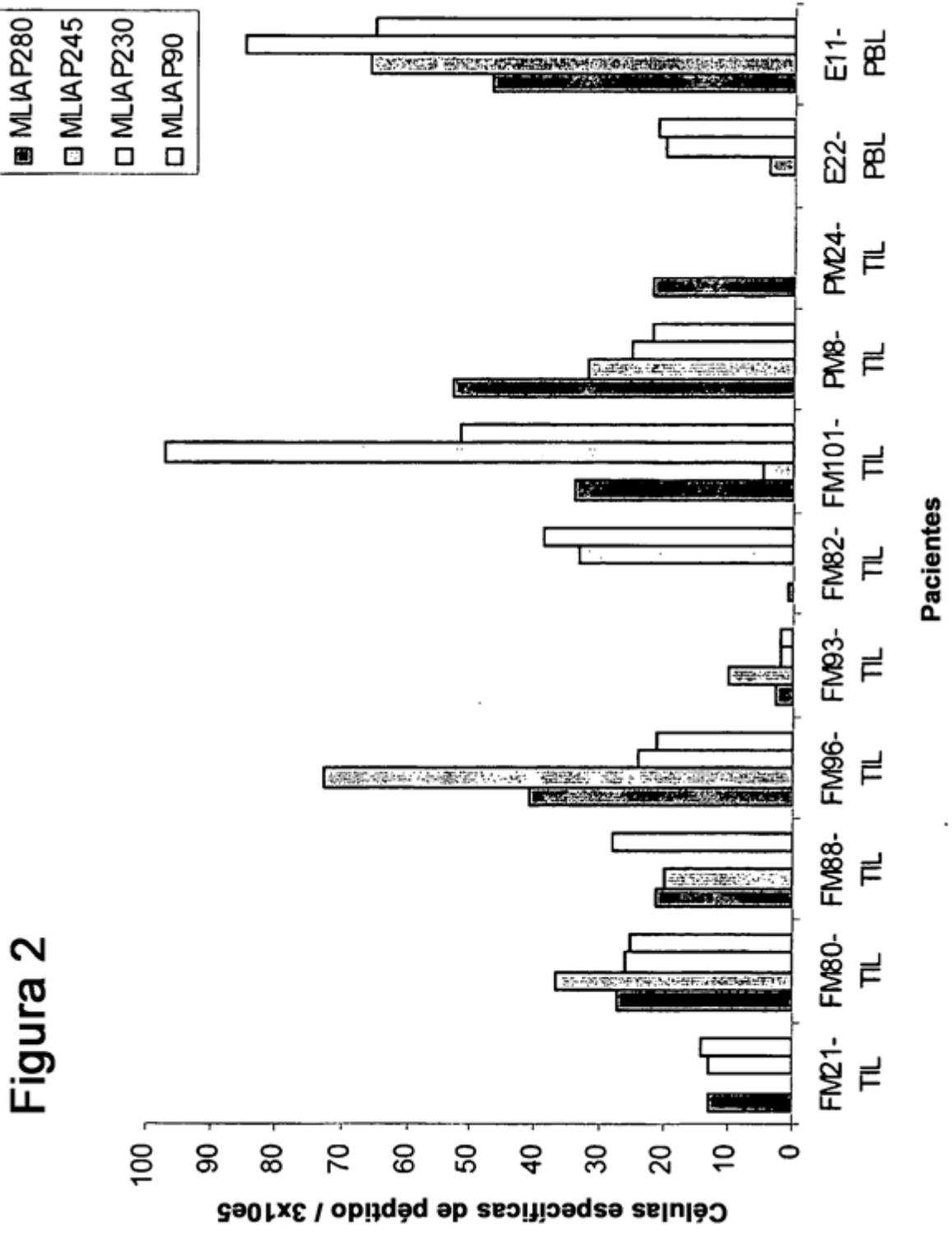


Figura 3

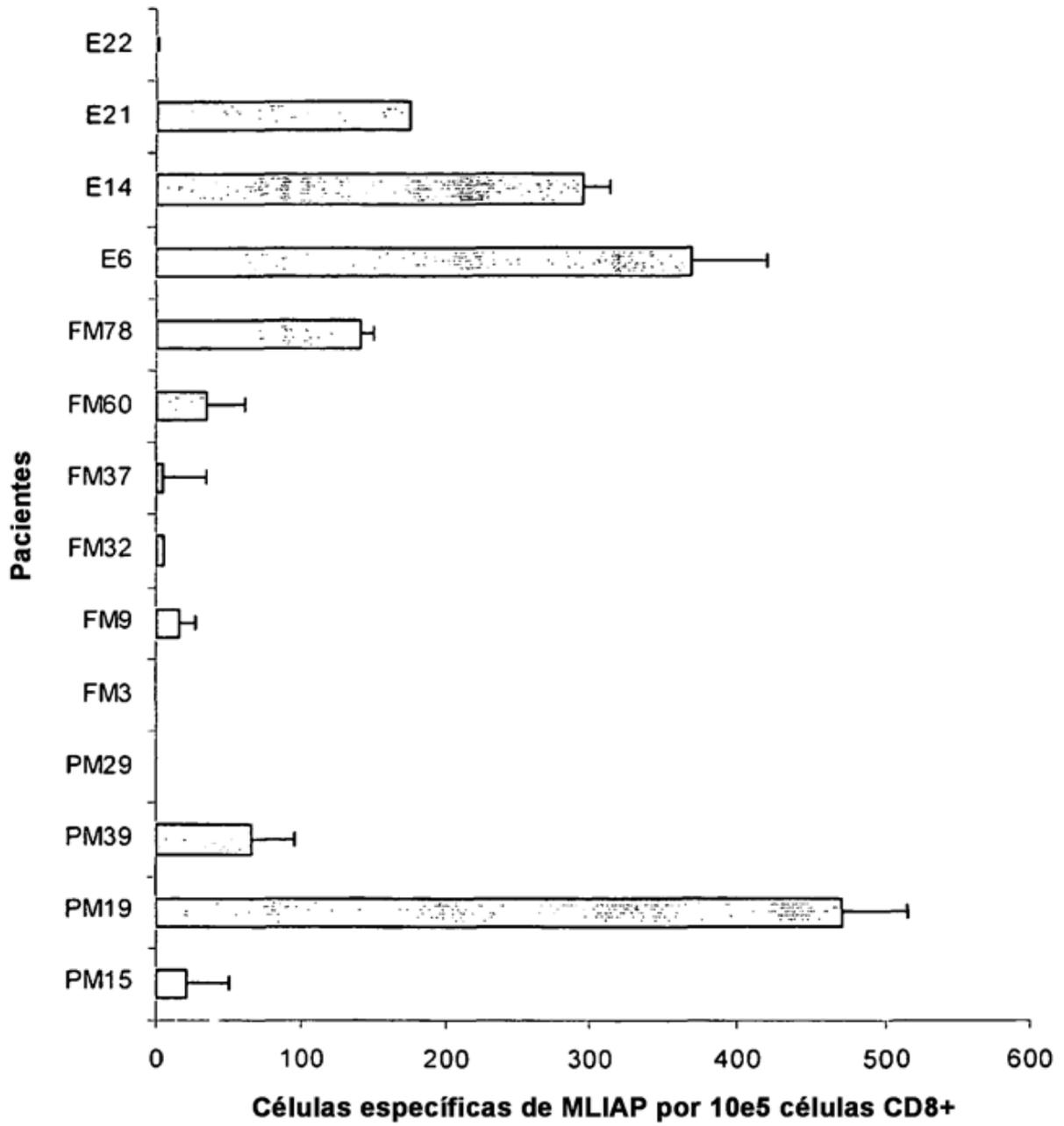


Figura 4

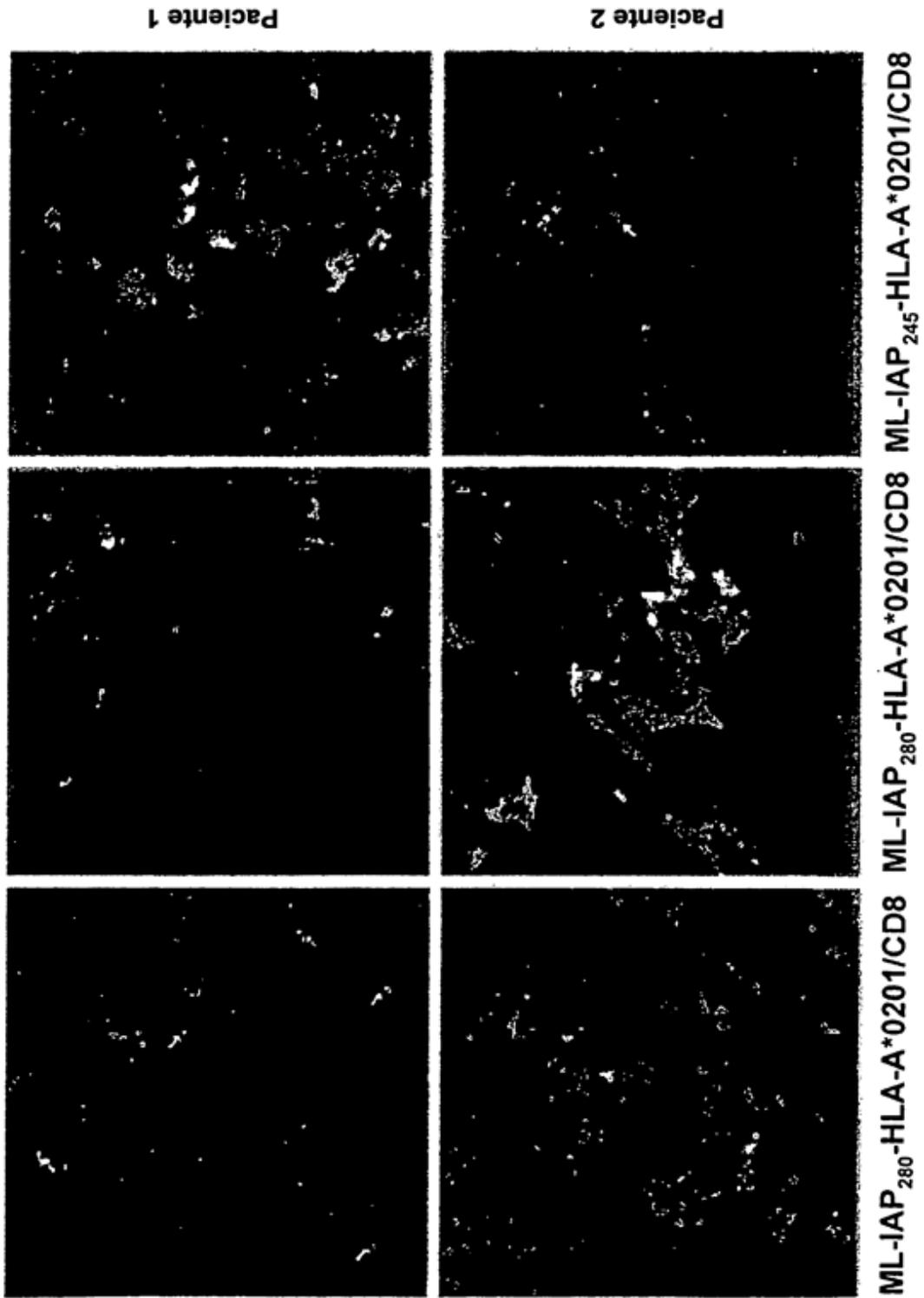


Figura 5A

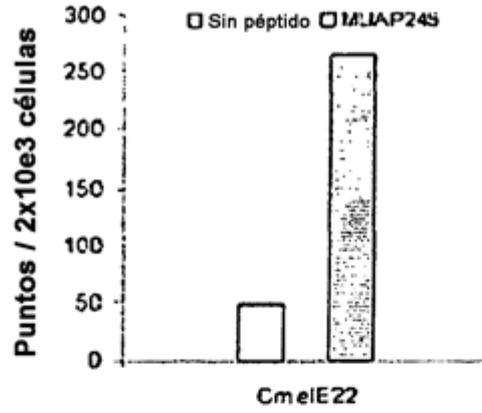


Figura 5B

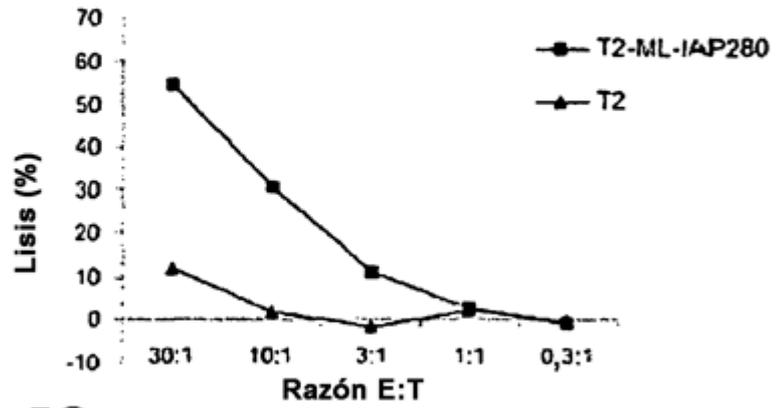


Figura 5C

