(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 495 769**

(51) Int. CI.:

A61K 38/08 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2010 E 10705790 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2393505**

(54) Título: **Uso de péptidos específicos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ)**

(30) Prioridad:

05.02.2009 EP 09152181

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.09.2014

(73) Titular/es:

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE

(72) Inventor/es:

HUNDEMER, MICHAEL y
CHRISTENSEN, OLAF

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Uso de péptidos específicos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ)

La presente invención se refiere al uso de un péptido que comprende o que consiste esencialmente en un motivo de secuencia como se muestra en la SEC ID N.º: 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ). Además, la presente invención se refiere al uso de un linfocito T activado que reconoce específicamente el péptido de la presente invención o una célula presentadora de antígeno que presenta específicamente un epítope de péptido de la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ). La presente invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación *ex vivo* de un linfocito T activado de la presente invención que comprende las etapas de: a) obtener linfocitos T de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ, b) poner en contacto dichos linfocitos T con un péptido de la presente invención y c) recoger los linfocitos T activados. La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la fabricación *ex vivo* de una célula presentadora de antígeno de la presente invención que comprende las etapas de: a) obtener células presentadoras de antígeno inmaduras de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ, b) poner en contacto dichas células presentadoras de antígeno inmaduras con un péptido de la presente invención y c) recoger las células presentadoras de antígeno maduras.

La gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) y el mieloma múltiple quiescente (MMQ) son trastornos asociados a la proliferación monoclonal de células plasmáticas que pertenecen al grupo de las gammapatías monoclonales (paraproteinemias). Este grupo también se ha denominado paraproteinemias, disproteinemias, inmunoglobulinopatías, o trastornos de las células plasmáticas. Generalmente se caracterizan por la secreción de proteínas electroforéticamente e inmunológicamente homogéneas (monoclonales). Cada proteína monoclonal, la proteína M, proteína de mieloma o paraproteína consiste en dos cadenas de polipéptidos pesadas de la misma clase y subclase y dos cadenas de polipéptidos ligeras del mismo tipo. Las cadenas de polipéptidos pesadas son IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (gamma, alfa, mu, delta, épsilon), mientras que los tipos de la cadena ligera son kappa (κ) y lambda (λ). En GMSI, la proteína monoclonal es < 30 g/l y las células clonales de la médula ósea < 10 % sin pruebas de mieloma múltiple, otros trastornos proliferativos de linfocito B o amiloidosis. En MMQ, la proteína M es ≥ 30 g/l y/o las células clonales de la médula ósea ≥ 10% pero sin afectación de órganos o tejidos relacionados (ROTI) (lesión del órgano final), véase Kyle y col., 2003, British J Haem 121, 749-757; Kyle y Greipp 1980, New Engl J Med 302, 1347-1349; Kyle 1978, Am J Med 64, 814-826. Biológicamente, los pacientes con MMQ son similares a GMSI. Los pacientes clasificados con GMSI tienen un riesgo de desarrollar una enfermedad que requiere terapia y son, por tanto, monitorizados a intervalos periódicos indefinidamente para pruebas de progresión. Los pacientes con MMQ deben ser estrechamente seguidos debido a que se desarrolla mieloma múltiple sintomático en muchos de ellos. Los pacientes de cualquier trastorno no son tratados, a menos que se produzca la progresión.

El tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ) es de particular importancia debido a que pacientes de GMSI o MMQ están en riesgo de progresión en mieloma múltiple (MM), véanse Perez-Persona y col., 2007, Blood 110, 2586-2592; Kyle y Rajkumar 2007, British J Haem 139, 730-743. A pesar de los nuevos agentes terapéuticos y el desenlace clínico mejorado, el MM todavía sigue siendo una enfermedad incurable. Actualmente no está disponible medicamento para el tratamiento de GMSI y MMQ. Así, se deja que el paciente solo se monitorice y así, no puede evitarse una posible progresión del trastorno en mieloma múltiple. Además, se mostró que los parientes de pacientes que tienen GMSI presentan una elevada prevalencia de desarrollar MM, véase Landgren 2008, Blood, 2009; 0: Blood-2008-12-191676v1.

Son altamente deseables medios y procedimientos para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ), especialmente con el fin de prevenir la progresión en MM incurable pero todavía no están disponibles.

Así, el problema técnico subyacente a la presente invención puede verse como la provisión de medios y procedimientos para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ). El problema técnico se resuelve por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en el presente documento a continuación.

La presente invención se refiere al uso de un péptido que comprende o que consiste esencialmente en un motivo de secuencia como se muestra en la SEC ID N.º: 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ).

El término “péptido” como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene la SEC ID N.º: 1. Pueden identificarse dominios del péptido conservados de la presente invención por una comparación de secuencias de la secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención con secuencias de otros péptidos que se describen en los ejemplos adjuntos. Además, las variantes del péptido de la presente invención incluyen aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el

80 %, al menos 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 1. Los valores de identidad en porcentaje se calculan, preferentemente, con respecto a la región de la secuencia de aminoácidos entera. Está disponible una serie de programas basados en una variedad de algoritmos para el experto para comparar diferentes secuencias. En este contexto, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente fidedignos. Para llevar a cabo los alineamientos de secuencias van a usarse el programa PileUp (Feng & Doolittle, 1987, J Mol Evol 25, 351-360; Higgins & Sharp, 1989, Comput Appl Biosci 5, 151-153) o los programas Gap y BestFit (Needleman & Wunsch, 1970, J Mol Biol 48, 443-453; Smith & Waterman, 1981, J Mol Biol 147, 195-197), que son parte del paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711 (1991)]. Los valores de identidad de secuencias citados anteriormente en porcentaje (%) van a determinarse, preferentemente, usando el programa GAP con respecto a la región de la secuencia entera con los siguientes parámetros: peso por hueco: 50, peso por longitud: 3, coincidencias promedio: 10,000 y desapareamientos promedio: 0,000 que, a menos que se especifique de otro modo, debenn siempre usarse como parámetros estándar para los alineamientos de secuencias.

El término “que comprende”, como se usa en el presente documento, significa que el péptido puede englobar aminoácidos adicionales con respecto a aquellos específicamente mostrados en las SEC ID N.ºs: 1 a 4. El término “que consiste esencialmente” como se usa en la presente invención, se refiere a un péptido que está compuesto simplemente de los aminoácidos específicos citados en las SEC ID N.ºs: 1 a 4. El término “motivo de secuencia”, como se usa en el presente documento, se refiere a un patrón de secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N.º: 1.

La gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) es un trastorno asintomático común de las células plasmáticas con un periodo estable variable. Eventualmente puede progresar a mieloma múltiple sintomático grave y por tanto, necesita monitorización periódica. La incidencia de GMSI aumenta con la edad, afectando a aproximadamente el 3 % de la población de más de 50 años de edad y hasta el 10 % en aquellos de más de 70 años de edad. El diagnóstico de GMSI se caracteriza por la presencia de una inmunoglobulina monoclonal en suero < 30 g/l y < 10 % de células plasmáticas en médula ósea, en ausencia de lesión del órgano final relacionada con la proliferación de célula plasmática monoclonal, véase Perez-Persona y col., 2007, Blood 110, 2586-2592; Kyle y Rajkumar 2007, British J Haem 139, 730-743.

El mieloma múltiple quiescente (MMQ) también es un trastorno asintomático de células plasmáticas. Se caracteriza por la ausencia de hipercalcemia, insuficiencia renal, anemia y lesiones líticas óseas y la proteína M es ≥ 30 g/l y/o las células clónicas de la médula ósea ≥ 10 % pero sin afectación de órganos o tejidos relacionados (ROTI) (lesión del órgano final), véase Kyle y col., 2003, British J Haem 121, 749-757; Kyle y Greipp 1980, New Engl J Med 302, 1347-1349; Kyle 1978, Am J Med 64, 814-826. De nuevo, el trastorno puede progresar eventualmente a mieloma múltiple sintomático grave y por tanto, necesita monitorización periódica.

El término “tratamiento” como se usa según la presente invención, engloba la mejora de los trastornos anteriormente mencionados. Dicha mejora puede monitorizarse por los valores de parámetros clínicos que caracterizan GMSI o MMQ. Cuanto más próximos estén estos valores a los valores de un sujeto sano más mejoran o incluso se curan los trastornos, es decir menor será la probabilidad de desarrollar MM. Así, tratamiento también se refiere a la cura de GMSI o MMQ y a la prevención de la progresión de GMSI o MMQ en mieloma múltiple (MM) sintomático incurable. Como se entenderá por aquellos expertos en la técnica, dicho tratamiento no se produce necesariamente en el 100 % de los sujetos que padecen GMSI o MMQ. El término, sin embargo, requiere que una porción estadísticamente significativa de dichos sujetos pueda tratarse. Si una porción es estadísticamente significativa se puede determinar sin más dilación por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística muy conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Intervalos de confianza preferidos son al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001.

Dicho tratamiento se refiere, preferentemente, al tratamiento de sujetos que padecen GMSI, MMQ, o parientes de dichos sujetos. Dichos sujetos son, preferentemente, animales, más preferentemente mamíferos y lo más preferentemente, seres humanos. Preferentemente, dicho sujeto es positivo para HLA-A2.

El término “medicamento”, como se usa en el presente documento, se refiere, en un aspecto, a una composición farmacéutica que contiene el péptido de la presente invención como compuesto activo farmacéutico, en el que la composición farmacéutica puede usarse para terapia humana o no humana de los trastornos GMSI o MMQ en una dosis terapéuticamente eficaz. Una composición farmacéutica como se usa en el presente documento comprende el péptido biológicamente activo usado en la presente invención y en un aspecto, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. El compuesto usado en la presente invención puede formularse como sales farmacéuticamente aceptables. Sales aceptables comprenden acetato, éster metílico, HCl, sulfato, cloruro y similares.

La composición farmacéutica se administra, en un aspecto, sistémicamente. Sin embargo, la composición farmacéutica también puede administrarse también por otras vías.

El compuesto, es decir el péptido biológicamente activo, es el principio activo de la composición y se administra en un aspecto en formas de dosificación convencionales preparadas combinando el fármaco con vehículos farmacéuticos convencionales según procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezcla, granulación y compresión, o disolución de los componentes según convenga para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable vienen dados por la cantidad de principio activo con el que va a combinarse, la vía de administración y otras variables muy conocidas.

El (Los) vehículo(s) debe(n) ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de formulación y no ser perjudiciales para el receptor de la misma. El vehículo farmacéutico empleado puede incluir un sólido, un gel o un líquido. A modo de ejemplo de vehículos sólidos son lactosa, alabastro, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. A modo de ejemplo de vehículos líquidos son solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes y similares. Similarmente, el vehículo o diluyente puede incluir material de retardo del tiempo muy conocido en la técnica, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solos o con una cera. Dichos vehículos adecuados comprenden aquellos mencionados anteriormente y otros muy conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

El/Los diluyente(s) se selecciona(n) de manera que no afecten la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de tales diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. Además, la composición o formulación farmacéutica también puede incluir otros vehículos, adyuvantes, o estabilizadores no tóxicos, no terapéuticos no inmunógenos y similares.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad del compuesto que va a usarse en una composición farmacéutica que previene, mejora o trata los síntomas que acompañan a una enfermedad o afección citada en esta memoria descriptiva. La eficacia terapéutica y toxicidad del compuesto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación, DL_{50}/DE_{50}.

La pauta de dosificación se determinará por el médico adjunto y otros factores clínicos. Como es muy conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área superficial corporal, edad, el compuesto particular que va a administrarse, sexo, tiempo y vía de administración, salud general y otros fármacos que se administren simultáneamente. El progreso puede monitorizarse por evaluación periódica.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas citadas en el presente documento se administran al menos una vez con el fin de tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o afección citada en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse más de una vez.

Las composiciones farmacéuticas específicas se preparan de un modo muy conocido en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo citado en el presente documento anteriormente en mezcla o de otro modo asociado a un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para preparar aquellas composiciones farmacéuticas específicas, el (los) compuesto(s) activo(s) se mezclará(n) normalmente con un vehículo o el diluyente. Las formulaciones resultantes van a adaptarse al modo de administración. Las recomendaciones de dosificación deben indicarse en la receta o instrucciones para el usuario con el fin de anticipar los ajustes de dosis dependiendo del receptor considerado.

El medicamento usado según la presente invención puede comprender fármacos en otro aspecto de la invención, además del péptido biológicamente activo que se añade a la composición farmacéutica durante su formulación. Finalmente, debe entenderse que la formulación de una composición farmacéutica tiene lugar bajo condiciones normalizadas de GMP o similares con el fin de garantizar la calidad, seguridad farmacéutica y eficacia del medicamento.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso del péptido de la invención, en el que dicho péptido comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEC ID N.^{os}: 2, 3 o 4.

Además, la presente invención se refiere al uso de un linfocito T activado que reconoce específicamente el péptido desvelado en la presente invención como se ha definido anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ).

El término “linfocito T activado”, como se usa en la presente invención, se refiere a un linfocito que expresa un receptor de linfocitos T (TCR) que reconoce específicamente el péptido desvelado en la invención y que expresa el antígeno CD8 sobre su superficie celular (algunas veces denominado linfocito T $CD8^+$ en el presente documento más adelante).

El término “activado” como se usa en el presente documento se refiere a mecanismos específicos de activación de linfocitos T. El “modelo de dos señales” general de activación de linfocitos T se caracteriza por una primera señal proporcionada uniendo el TCR a un péptido corto presentado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre otra célula asegurando que solo se activa un linfocito T con un TCR específico para ese péptido. La célula compañera es normalmente una célula presentadora de antígeno (APC) profesional, normalmente una célula dendrítica en el caso de respuestas sin tratamiento previo, aunque linfocitos B y macrófagos pueden ser APC importantes. Los péptidos presentados a linfocitos T $CD8^+$ por las moléculas de clase I del MHC tienen 8-9 aminoácidos de longitud; los péptidos presentados a células $CD4^+$ por las moléculas de clase II del MHC son más largos, ya que los extremos de la hendidura de unión de la molécula de clase II del MHC están abiertos. La segunda y co-estimuladora señal requerida para la activación de linfocitos T implica la interacción de CD28 sobre el linfocito T con CD80 o CD86 (genes de la familia B7) sobre la célula presentadora de antígeno. La segunda señal autoriza al linfocito T a responder a un antígeno.

El reconocimiento de un péptido unido a una proteína del complejo principal de histocompatibilidad (péptido-MHC) 1 por el receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ (TCR) es necesario para la iniciación y propagación de una respuesta inmunitaria celular, además del desarrollo y mantenimiento del repertorio de linfocitos T. Los TCR se unen al péptido-MHC en un modo diagonal a ortogonal, interaccionando con elementos de tanto el péptido como el MHC.

El término “reconoce específicamente” significa que el linfocito T de la presente invención une el péptido de la presente invención mediante su TCR específico y no reacciona de forma cruzada a un grado significativo con otros péptidos en general. Sin embargo, el linfocito T debe poder reconocer el epítope de péptido en HM 1.24 (SEC ID N.º: 4), aunque el linfocito T se ha generado por un péptido de la invención que tiene otra secuencia. La unión específica, en principio, puede probarse por diversas técnicas muy conocidas que incluyen ensayo ELISpot de IFN-γ, véanse Keilholz y col., 2002, J Immunother 25, 97-138; Keilholz y col., 2006, Clin Cancer Res 12, 2346s-2352s.

Un linfocito T $CD8^+$ es, preferentemente, un linfocito T citotóxico que puede inducir muerte de células somáticas infectadas (con virus, u otros patógenos) o tumorales, o células de otro modo lesionadas o disfuncionales. La mayoría de los linfocitos T citotóxicos expresan receptores de linfocitos T (TCR) que pueden reconocer un péptido antigénico específico unido a moléculas de MHC de clase I, presentes sobre todas las células nucleadas y una glucoproteína llamada CD8, que es atraída a porciones no variables de la molécula de MHC de clase I. La afinidad entre CD8 y la molécula de MHC mantiene el linfocito T $CD8^+$ y la célula diana unidos estrechamente juntos durante la activación específica de antígeno. Los linfocitos T $CD8^+$ son reconocidos una vez se activan y se clasifican generalmente por tener una función citotóxica predefinida dentro del sistema inmunitario.

La presente invención se refiere adicionalmente al uso de una célula presentadora de antígeno (APC) que presenta específicamente un epítope peptídico para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ).

El término “célula presentadora de antígeno” (APC) como se usa según la presente invención es una célula caracterizada por mostrar antígeno extraño (péptido) complejado con complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre su superficie. La mayoría de las células en el cuerpo pueden presentar antígeno a linfocitos T $CD8^+$ mediante moléculas de clase I del MHC y así actuar de “APC”. Las APC pueden distinguirse en dos subconjuntos. Un subconjunto de APC que incluyen células dendríticas, macrófagos y linfocitos B puede activar (sensibilizar) linfocitos T sin tratamiento previo que no se han expuesto a antígeno. Estas células expresan la clase II del MHC, además de moléculas de clase I del MHC y pueden estimular linfocitos T $CD4^+$ (“colaboradores”) además de linfocitos T $CD8^+$ (“citotóxicos”). Estas APC son muy eficaces en la internalización de antígeno, bien por fagocitosis o bien por endocitosis mediada por receptor y luego en mostrar un fragmento del antígeno, unido a una molécula de MHC de clase II, sobre su membrana. El linfocito T puede reconocer e interaccionar con el complejo de antígeno-molécula de MHC de clase II sobre la membrana de la célula presentadora de antígeno. Después se produce una señal co-estimuladora adicional por la célula presentadora de antígeno, conduciendo a la activación del linfocito T. En un aspecto de la presente invención la APC como se usa en el presente documento es una célula dendrítica (CD), que tiene la variedad más amplia de presentación de antígeno. Las CD activadas son activadores de linfocitos T $CD4^+$ (“colaboradores”) especialmente potentes debido a que, como parte de su composición, expresan moléculas co-estimuladoras tales como B7. Otro subconjunto de APC no expresa constitutivamente las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad requeridas para la interacción con linfocitos T sin tratamiento previo; estas se expresan solo tras la estimulación de estas APC por ciertas citocinas tales como IFN-γ. Estas APC incluyen: fibroblastos (piel), células epiteliales tímicas, células epiteliales tiroideas, células de la glía (cerebro), células beta pancreáticas y células endoteliales vasculares. Preferentemente, sin embargo, la APC citada según la presente invención es una célula dendrítica.

Después de que las APC fagociten patógenos, normalmente migran mediante el sistema linfático a los ganglios linfáticos drenantes, en los que APC tales como células dendríticas puede interaccionar con linfocitos T. Durante la migración, las APC se someten a un procedimiento de maduración caracterizado por una pérdida de la mayoría de de su capacidad para tragar adicionalmente patógenos y por desarrollar una elevada capacidad para comunicarse con linfocitos T. Las enzimas dentro de las APC digieren el patógeno tragado en trozos más pequeños que contienen epítopes, que luego se presentan a linfocitos T usando MHC. Estos epítopes son, preferentemente, aquellos péptidos que son específicamente reconocidos mediante el TCR del linfocito T usado según la presente invención.

Así, una célula dendrítica como se usa según la presente invención, preferentemente, se refiere a una célula que se deriva de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea. Estas células progenitoras se transforman inicialmente en células dendríticas inmaduras. Estas células se caracterizan por alta actividad endocítica y bajo potencial de activación de linfocitos T. Las células dendríticas inmaduras muestrean constantemente el entorno de alrededor para patógenos tales como virus y bacterias. Esto se hace mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) tales como los receptores tipo peaje (TLR). Los TLR reconocen huellas químicas específicas encontradas en subconjuntos de patógenos. Las células dendríticas inmaduras también pueden fagocitar pequeñas cantidades de membrana de sus propias células vivas, en un proceso llamado mordisqueo. Una vez han entrado en contacto con un antígeno presentable, se activan en células dendríticas maduras y empiezan a migrar a los ganglios linfáticos. Las células dendríticas inmaduras fagocitan los patógenos y degradan sus proteínas en pequeños trozos y tras la maduración presentan esos fragmentos en su superficie celular usando moléculas del MHC. Simultáneamente, regulan por incremento receptores de la superficie celular que actúan de correceptores en la activación de los linfocitos T tales como CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y CD40 potenciando enormemente su capacidad para activar linfocitos T. También regulan por incremento CCR7, un receptor quimiotáctico que induce el desplazamiento de la célula dendrítica por la corriente sanguínea hasta el bazo o por el sistema linfático hasta un ganglio linfático. Aquí, actúan como células presentadoras de antígeno: activan linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos además de linfocitos B presentándolos a antígenos derivados del patógeno, junto con señales coestimuladoras específicas no antigénicas.

En un aspecto del uso de la presente invención, un agente terapéutico va a administrarse en combinación.

El término “agente terapéutico”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que puede tratar los trastornos citados en el presente documento anteriormente.

En un aspecto, el agente terapéutico usado en la presente invención debe administrarse en combinación con un adyuvante. Dicho adyuvante puede usarse para producir emulsiones W/O. Dicho adyuvante se basa en aceites minerales que son conocidos por provocar reacciones de inflamación local cuando se administran en combinación con antígenos específicos. En otro aspecto, dicho agente terapéutico es un trasplante de células madre *in vivo* o *in vitro* enriquecidas con linfocitos T $CD8^+$ activados (especificados en cualquier parte en esta descripción) o células presentadoras de antígeno maduras (células dendríticas, especificadas en cualquier parte en esta descripción) desveladas en la presente invención.

Agentes terapéuticos preferidos son un agente quimioterapéutico o un inmunomodulador.

Un agente quimioterapéutico como se usa según la presente invención es una sustancia química de origen natural o sintético usada para su acción específica contra enfermedad. Preferentemente, el agente quimioterapéutico está seleccionado del grupo que consiste en: bortezomib, imida (talidomida, lenalidomida), cortisona/cortisol, agentes alquilantes (melfalan, clorambucilo, ciclofosfamida), antraciclinas (doxorubicina liposómica, adriamicina), alcaloides (etopósido, vincristina). Un inmunomodulador como se usa en la presente invención se refiere a un agente químico que modifica la respuesta inmunitaria o el funcionamiento del sistema inmunitario. Hay dos subconjuntos de inmunomoduladores en base a sus efectos: inmunosupresores (por ejemplo, talidomida, lenalidomida) e inmunoestimuladores. Un inmunosupresor es una sustancia que realiza la supresión de la respuesta inmunitaria o del funcionamiento del sistema inmunitario. Los inmunoestimuladores son sustancias que incluyen fármacos y nutrientes que estimulan el sistema inmunitario induciendo la activación o aumentando la actividad de cualquiera de sus componentes. Inmunoestimuladores específicos proporcionan especificidad antigénica en respuesta inmunitaria, tal como vacunas o cualquier antígeno. Ningún inmunoestimulador específico actúa independientemente de la especificidad antigénica para aumentar la respuesta inmunitaria de otro antígeno o para estimular componentes del sistema inmunitario sin especificidad antigénica, tales como adyuvantes e inmunoestimuladores no específicos. Los inmunomoduladores preferidos se seleccionan de GM-CSF y aquellos enumerados en la Tabla 4 de los ejemplos adjuntos.

En un aspecto del uso de la presente invención, dichos inmunomoduladores se usan para inmunoterapia. La inmunoterapia como se usa según la presente invención es, en un aspecto, un inmunomodulador que comprende vacunas basadas en antígenos definidos. Puede inducirse inmunidad celular (que implica linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos) a antígenos muy definidos, específicos. Los antígenos asociados a enfermedad (AAE) definidos pueden administrarse a pacientes tanto en forma de péptidos (normalmente co-administrados con adyuvantes inmunógenos) como de ADN que codifica proteína específica (mediante virus recombinantes). Las respuestas más potentes

pueden lograrse si los péptidos inmunógenos se administran usando células presentadoras de antígeno (células dendríticas). Estas células se obtienen del paciente, o de donantes sanos, cargadas con el péptido deseado y luego se reintroducen intradérmicamente para estimular el linfocito T endógeno para responder al antígeno específico. En un aspecto de la presente invención, los péptidos desvelados en la presente invención se usan como antígenos (péptidos inmunógenos) para una inmunoterapia de los trastornos GMSI y MMQ.

Otro aspecto de la inmunoterapia según la presente invención es un trasplante de linfocitos T - o APC - alógenos. Dichos linfocitos T alógenos son los linfocitos T $CD8^+$ de la presente invención. Dichas APC son las APC maduras (como se describe en cualquier parte en esta memoria descriptiva).

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación *ex vivo* de un linfocito T activado de la presente invención que comprende las etapas de:

a) obtener linfocitos T de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ,
b) poner en contacto dichos linfocitos T con un péptido de la presente invención y
c) recoger los linfocitos T activados.

El término “muestra”, como se usa en la presente invención, se refiere a una muestra de un líquido corporal, a una muestra de células separadas o a una muestra de un tejido o un órgano. Muestras de líquidos corporales pueden obtenerse por técnicas muy conocidas e incluyen muestras de sangre, plasma, suero u orina. Pueden obtenerse muestras de tejidos u órganos de cualquier tejido u órgano por biopsia. Pueden obtenerse células separadas de los líquidos corporales o los tejidos u órganos por técnicas de separación tales como centrifugación o clasificación de células. Preferentemente, las muestras de células, tejidos u órganos se obtienen de aquellas células, tejidos u órganos que expresan, producen o reconocen específicamente los péptidos de la presente invención. En un aspecto, los linfocitos T se obtienen de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ. En otro aspecto, los linfocitos T se obtienen de una muestra de un sujeto sano.

El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente mamíferos y más preferentemente, seres humanos. Según el procedimiento de la presente invención, dicho sujeto debe sufrir de GMSI, MMQ, o ser un pariente de un sujeto tal que padece GMSI.

Poner en contacto como se usa en el presente documento, se refiere a poner al menos dos compuestos diferentes en proximidad física de manera que se permita la interacción física y/o química de dichos compuestos. Según el procedimiento de la presente invención, dichos dos compuestos diferentes son, en un aspecto, el linfocito T y el péptido (antígeno) de la presente invención. Poner en contacto como se indica en el presente documento se lleva a cabo en condiciones y durante un tiempo que es suficiente para permitir la interacción del linfocito T mediante el TCR específico y dicho péptido. Dicha interacción debe producir la activación del linfocito T. Como se expone en cualquier parte en el presente documento, dicha interacción comprende diversos tipos de unión tales como medidas indirectas y directas, no reversibles y reversibles. Condiciones adecuadas permiten la interacción específica del linfocito T y el péptido de la presente invención. Cada linfocito T es específico de un antígeno particular. Esto es muy conocido para el experto y dicha condición pueden depender del linfocito T y el péptido que va a aplicarse en el procedimiento determinado sin más dilación. Además, un tiempo que es suficiente para permitir la interacción también puede determinarse por el experto sin más dilación. Las condiciones se desvelan en los ejemplos adjuntos, más adelante.

El término “recoger”, como se usa en la presente invención se refiere a la separación de los linfocitos T activados de residuos y otras células que incluyen linfocitos T no activados. En un aspecto del procedimiento de la presente invención, dicha recogida se lleva a cabo por medio de centrifugación por densidad, por procedimientos inmunomagnéticos (sistema MACS, Miltenyi Biotech), por citometría de flujo o por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Debe entenderse que las definiciones y explicaciones de los términos hechas anteriormente se aplican cambiando lo que haya que cambiar para todos los aspectos descritos en esta memoria descriptiva a continuación excepto que se indique de otro modo.

Según el procedimiento previo de la presente invención, dichos linfocitos T activados son, preferentemente, linfocitos T $CD8^+$ hacia una célula diana que expresa el péptido desvelado en la presente invención.

La presente invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para la fabricación *ex vivo* de una célula presentadora de antígeno según se define antes en esta memoria descriptiva que comprende las etapas de:

a) obtener células presentadoras de antígeno inmaduras de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ,
b) poner en contacto dichas células presentadoras de antígeno inmaduras con un péptido desvelado en la presente invención
c) recoger las células presentadoras de antígeno maduras.

En un aspecto del procedimiento de la presente invención se obtienen APC inmaduras de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ. En otro aspecto, dichas células presentadoras de antígeno (APC) se derivan de líneas celulares. En otro aspecto, dichas células presentadoras de antígeno (APC) son de muestras de otros organismos que incluyen ratones, conejo.

En un aspecto incluso adicional, dichas células presentadoras de antígeno inmaduras pueden ser células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC). Las aAPC, según la presente invención, son un sistema que imita las interacciones fisiológicas entre linfocitos T y APC y pueden estar compuestas de un liposoma, en el que se incorporan moléculas peptídicas de clase del MHC. La composición de estas aAPC permite el libre movimiento de los complejos de MHC-péptido en la membrana artificial. Dichas aAPC cargadas con el péptido selectivo de la presente invención pueden activar linfocitos T sin tratamiento previo para que se vuelvan linfocitos T activados (linfocitos T $CD8^+$ activados) específicos para el péptido respectivo. En otro aspecto, las aAPC se preparan según otras técnicas muy conocidas, véase el documento WO 2008/045286.

En un aspecto de este procedimiento de la presente invención, dicha célula presentadora de antígeno inmadura es una célula dendrítica.

En un aspecto de este procedimiento, dicha célula presentadora de antígeno madura puede estimular linfocitos T sin tratamiento previo que se convierten luego en linfocitos T $CD8^+$ hacia una célula diana que expresa el péptido desvelado en la presente invención.

Se han descrito varios antígenos para una inmunoterapia específica contra mieloma múltiple (MM). Se identificaron epítopes de linfocitos T dentro de la región variable de la inmunoglobulina de MM. Sin embargo, los ensayos de vacunación con la inmunoglobulina tumoral fracasaron en demostrar beneficio clínico significativo en pacientes con MM. Debido a la presente invención está disponible una inmunoterapia contra GMSI y MMQ para tratar estos trastornos actualmente sin tratar y así prevenir una posible progresión en MM.

Las figuras muestran:

Figura 1: Reactividad cruzada de linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26-35}$*A27L y específicos de HM1.$24_{aa22-30}$ con células diana pulsadas con HM1.$24_{aa22-30}$ o Melan-$A_{aa26-35}$*$_{A27L}$ linfocitos T $CD8^+$ de HLA-$A2^+$ HD se incubaron durante 7 días con CD cargadas con HM1.$24_{aa22-30}$ (LLLGIGILV) o Melan-$A_{aa26-35}$*$_{A27L}$ (ELAGIGILTV) diferenciadas *in vitro* autólogas. Después de 7 y 14 días los linfocitos T se alimentaron con células T2 cargadas con péptido irradiado. Después de 21 días se realizaron ensayos ELISpot específicos de IFN-γ usando bien células T2 cargadas con HM1.$24_{aa22-30}$, o bien células T2 cargadas con Melan-$A_{aa26-35}$*$_{A27L}$ como células diana. Las células T2 cargadas con HM1.$24_{aa171-179}$ se usaron como control. Los resultados representativos de 3 donantes diferentes se representan en la Figura 1A. Otro análisis para el donante P con relaciones de efector/diana variables medidas con un microscopio asistido por ordenador se muestra en la Figura 1B (■ - células T2 pulsadas con HM1.$24_{aa22-30}$; ● células T2 pulsadas con Melan-$A_{aa26-35*A27L}$; ▲ - células T2 pulsadas con el péptido de control HM1.$24_{aa171-179}$; se presentan el número de puntos específicos de IFN-γ).

Figura 2: Actividad de linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26-35*A27L}$ contra dianas pulsadas con HM1.$24_{aa22-30}$ y líneas de células derivadas de MM

Figura 2A: Se incubaron linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26-35*A27L}$ con HM1.$24_{aa22-30}$ (■) o células T2 pulsadas con Melan-$A_{aa26-35*A27L}$ (●) como células diana en relaciones de efector / diana variables. Las células T2 pulsadas con el péptido TLVTVSSAS (derivado de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobina) se usaron como control negativo (A). La figura muestra los resultados de un ensayo de liberación de ^{51}Cromo con la lisis específica en %.

Figura 2B: Se incubaron linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26-35*A27L}$ con HMCL HLA-$A2^+$ U266 (●) o la línea de células linfoblastoides B IM-9 (■) en relaciones de efector / diana que oscilan de 0,125 a 1. La línea celular de carcinoma de mama HLA-$A2^+$ MCF-7 se usó como control (A). Los resultados de un ensayo ELISpot específico de IFN-γ con el número medio de puntos específicos de IFN-γ se muestran en la Figura 3.

Figura 3: Citotoxicidad de linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26-35*A27L}$ contra líneas celulares derivadas de MM. La citotoxicidad de linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26-35*A27L}$ contra HMCL HLA-$A2^+$ U266 y XG-1, o la línea de células linfoblastoides B IM-9, se analizó con un ensayo de liberación de ^{51}Cromo. La línea celular de carcinoma de mama HLA-$A2^+$ MCF-7 se usó como control. La lisis específica se representa en el diagrama en % (A - ■ U266, ▲ MCF-7; B - ■ XG-1, ▲ MCF-7; C - ■ IM-9, ▲ MCF-7).

Figura 4: Expansión *in vitro* de linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26\text{-}35*A27L}$ de pacientes con MM y lisis de células tumorales de MM autólogas

Figura 4A: Se expandieron linfocitos T $CD8^+$ específicos de Melan-$A_{aa26\text{-}35*A27L}$ *in vitro* fuera de la sangre de un paciente con MM HLA-$A2^+$ (paciente 10) durante un periodo de 36 días. Se hizo un análisis de citometría de flujo usando tetrámeros de HLA-A*0201 marcados con ELAGIGILTV PE en el día 36.

Figura 4B: En el día 28 se realizó un ensayo ELISpot específico de IFN-γ usando células T2 pulsadas con péptidos (paciente 10) y la línea de células linfoblastoides B como dianas (B).

Figura 4C: Se expandieron linfocitos T $CD8^+$ específicos de análogo de Melan-A *in vitro* fuera de la sangre de 3 pacientes con MM HLA-$A2^+$ (paciente 1, 2, 3) durante un periodo de 36 días. En el día 28 se realizó un ensayo ELISpot específico de IFN-γ usando células T2 pulsadas con péptidos como células diana (C), la relación de efector : diana fue 0,2 (barra negra: linfocitos T $CD8^+$ Melan-$A_{aa26\text{-}35*A27L}$ + T2 $HM1.24_{aa22\text{-}30}$; barra blanca: linfocitos T $CD8^+$ Melan-$A_{aa26\text{-}35*A27L}$ + T2 $HM1.24_{aa171\text{-}179}$).

Figura 4D: Se expandieron linfocitos T $CD8^+$ específicos de análogo de Melan-A *in vitro* a partir de pacientes con MM HLA-$A2^+$ (paciente 5, 6, 7, 8, 9). Se purificaron células de MM autólogas fuera de un aspirado de médula ósea por purificación inmunomagnética posterior usando microperlas recubiertas con anti-CD138. La citotoxicidad de linfocitos T $CD8^+$ específicos de análogo de Melan-A contra las células de la médula ósea $CD138^+$ se analizó con un ensayo de liberación de ^{51}Cromo. La línea celular de carcinoma de mama HLA-$A2^+$ MCF-7 se usó como control negativo. La relación de efector : diana fue 2,5 : 1 o 10 : 1.

Los siguientes ejemplos ilustran simplemente la invención y no deben interpretarse, en absoluto, como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1:

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de los péptidos

SEC ID N.º	Secuencia de aminoácidos	Sinónimo
1	XXXGIGILXV	Consenso
2	ELAGIGILTV	(análogo de MART-1)
3	EAAGIGILTV	(MART-1)
4	LLLGIGILV	(HM1.24)

Ejemplo 2:

Materiales y procedimientos

Líneas celulares

HMCL U266, la línea de células linfoblastoides B EBV^+ IM-9 y HLA-A2 que expresa la línea de células híbridas linfoblastoides T-B T2 se mantuvieron en RPMI-1640, 10 % de SBF, L-glutamina y penicilina/estreptomicina [Invitrogen, Karlsruhe, Alemania]. HMCL XG-1 se cultivó con IL-6 (10 ng/ml [R&D Systems, Abingdon, Oxon, Reino Unido]) como se ha descrito (29). La línea de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 se cultivó con aminoácidos no esenciales MEM, piruvato de sodio 1 mM y 10 µg/ml de insulina bovina. Los genotipos de HLA de estas líneas celulares se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Genotipos de HLA de la línea de células linfoblastoides B IM-9, HMCL U266 y XG-1 y la línea de células de adenocarcinoma de mama MCF-7.

Línea celular	***HLA-A****	***HLA-B****	***HLA-Cw****	***HLA-DRB1****
IM-9	02, -	49,56	01,07	01,04
U266	02 , 03	07 , 40 (60)	03 , 07	03,15
XG-1	02 , 29	40 (61), 44	02 , 16	07 , 15
MCF-7	02 , -	18,44	0501, -	03 , 15

Células de MM primarias

Se purificaron células de MM $CD138^+$ de aspirados de médula ósea de pacientes con MM como se ha descrito después de dar el consentimiento informado por escrito (15). Este procedimiento de estudio fue autorizado por el comité ético local. Brevemente, células de la médula ósea se separaron por centrifugación en gradiente de densidad [Biochrom, Berlín, Alemania]. Se incubaron células mononucleares con microperlas recubiertas con anti-CD138 [Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania] y se clasificaron usando un clasificador de células magnético

automatizado [autoMACS, Miltenyi Biotech]. La pureza de las células de MM $CD138^+$ enriquecidas se evaluó por citometría de flujo (mediana, 92 %; intervalo, 81 % al 99,8 %). Los datos de los pacientes se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Datos de 8 pacientes con MM y 1 paciente con GMSI.

Número de paciente	***Sexo***	***Edad (años)***	***Proteína monoclonal***	***Estadio (Salmon y Durie)***	***Estado***
1	m	58	IgGλ	III A	durante quimioterapia
2	m	71	IgGλ	III A	recaída
3	m	65	IgGκ	III A	recaída
5	m	41	IgGκ	III A	remisión
6	m	56	IgGλ	GMSI	recientemente
7	f	56	IgAκ	IIIA	recién diagnosticado
8	f	52	IgGλ	IIIA	recién diagnosticado
9	m	68	IgAκ	IIIA	recién diagnosticado
10	m	58	IgG□	IIIA	durante quimioterapia

Síntesis de péptidos

Los péptidos $HM1.24_{aa22\text{-}30}$ (LLLGIGILV), análogo de Melan-$A_{aa26\text{-}35*A27L}$ (ELAGIGILTV), $HM1.24_{aa171\text{-}179}$ (VLLGLSALL) y TLVTVSSAS (derivado de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana y usado como un control) se sintetizaron usando procedimientos convencionales [DKFZ, Heidelberg, Alemania].

Diferenciación in vitro de CD

Se generaron CD *in vitro* según el protocolo publicado por Jonuleit y col., (10).

Células mononucleares (CMN) para la expansión in vitro de linfocitos T específicos de péptido

CMN de $HLA\text{-}A2^+$ HD [Departamento de Inmunología del Trasplante, Universidad de Heidelberg, Alemania] y pacientes con MM (Tabla 3) se purificaron de sangre periférica completa usando centrifugación por densidad en Ficoll-Paque [Biochrom, Berlín, Alemania]. Se realizó tipado de HLA convencional usando técnicas serológicas, además de reacción en cadena de la polimerasa basada en cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) [Departamento de Inmunología del Trasplante, Universidad de Heidelberg, Alemania].

Expansión in vitro de linfocitos T específicos de péptido con CD autólogas y células T2

La generación de linfocitos T específicos de péptido se realizó según un protocolo publicado por Blanchet y col., (1). Se purificaron linfocitos T $CD8^+$ usando microperlas de CD8 (sistema MACS [Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania]). 2×10^5 CD pulsadas con péptidos se incubaron con 10^6 linfocitos T $CD8^+$ en RPMI1640 con L-glutamina y penicilina/estreptomicina, complementado con 5 % de suero AB humano [PAA], IL-2 (50 U/ml [Chiron, Múnich, Alemania]) e IL-7 (10 ng/ml [R&D Systems]). Después de 7 días se realizaron refuerzos con células T2 pulsadas con 10 µg/ml de péptido durante 2 h. Los refuerzos se repitieron 2 veces.

Ensayo de ELISpot de IFN-γ

$2{,}5 \times 10^4$ células T2 diana /pocillo se incubaron durante 48 h con linfocitos T en una placa de nitrocelulosa [Millipore, Eschbom, Alemania] recubierta con anticuerpo anti-IFN-γ [Mabtech-AB, Nacka, Suecia]. Las células T2 se preincubaron con péptidos durante 2 h (10 µg/ml). Después de la detección con anticuerpos anti-citocina biotinilados [Mabtech AB, Nacka, Suecia] y de conjugación con avidina-fosfatasa alcalina [Sigma, Deisenhofen, Alemania] se añadió el sustrato BCIP/NBT [Sigma, Deisenhofen, Alemania]. Los puntos se analizaron usando un microscopio controlado por ordenador [Zeiss-Vision, Eching, Alemania].

Ensayo de liberación de ^{51}Cromo

Dos $\times 10^4$ células diana marcadas con ^{51}Cr /pocillo se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Cuatro horas después de añadir las células efectoras, se recogieron 75 µl de sobrenadante. La liberación espontánea y máxima de ^{51}Cr se determinó en presencia de medio o 2 % de TritonX-100 (control positivo). La lisis específica para una muestra individual (liberación específica) se calculó del siguiente modo: (liberación específica - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea) x100 = % de lisis específica.

Tinción del tetrámero ELA GIGIL TV

Se tiñeron linfocitos T con el tetrámero HLA-A*0201 marcado con ELAGIGILTV PE [Beckman Coulter, Marsella, Francia] y anticuerpos anti-CD8 conjugados con FITC [Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania] según las

recomendaciones del fabricante. La fluorescencia se analizó con un dispositivo FACScan según las instrucciones del fabricante

Ejemplo 3:

Resultados

Reactividad cruzada de linfocitos T específicos de análogo de Melan-A con péptido HM1.24$_{aa22-30}$.

Se expandieron linfocitos T específicos de análogo de Melan-A (Melan-A$_{aa26-35*A27L}$ [ELAGIGILTV]) además de linfocitos T específicos de HM1.24$_{aa22-30}$ de la sangre de HLA-A2^{+} HD. Después de 3 semanas, los cultivos contuvieron hasta el 46 % de linfocitos T específicos de análogo de Melan-A como se ensayó por el marcado de tetrámeros de análogos de Melan-A (datos no mostrados). Los resultados de ensayos ELISpot específicos de IFN-γ con 3 HD representativos se ilustran en la Figura 1A (relación E/D 2,5/1). Se usaron células T2 cargadas con péptido como células diana. El péptido irrelevante HM1.24$_{aa171-179}$ (VLLGLSALL) se usó como un control negativo. Se detectó una fuerte activación de linfocitos T específicos de análogo de Melan-A por células T2 pulsadas con HM1.24$_{aa22-30}$. Viceversa, linfocitos T específicos de HM1.24$_{aa22-30}$ se activaron por células T2 pulsadas con análogo de Melan-A. El péptido HM1.24$_{aa171-179}$ (VLLGLSALL) que no comparte homología con Melan-A no activó ni los linfocitos T específicos de análogo de Melan-A ni los linfocitos T específicos de HM1.24$_{aa22-30}$. La Figura 1B muestra el número de puntos de IFN-γ en linfocitos T específicos de HM1.24$_{aa22-30}$ o linfocitos T específicos de análogo de Melan-A activados por números graduados de células T2 pulsadas con HM1.24$_{aa22-30}$, análogo de Melan-A o péptidos de control. Se detectó una producción de IFN-γ específica en comparación con el péptido de control con una relación de efector / diana de 0,125/1. La citotoxicidad de linfocitos T específicos de análogo de Melan-A contra células diana cargadas con HM1.24$_{aa22-30}$ se estudió con un ensayo de liberación de ^{51}Cromo. Los linfocitos T específicos de análogo de Melan-A$_{aa26-35*A27L}$ lisaron células T2 pulsadas con HM1.24$_{aa22-30}$, a diferencia de células T2 pulsadas con el péptido de control (Figura 2 A).

Linfocitos T específicos de análogo de Melan-A se activan por HMCL

Se usaron HMCL HLA-A2^{+} U266 y XG-1 y la línea de células linfoblastoides B IM-9 como células diana. Usando micromatrices Affymetrix, los autores de la presente invención encontraron que el gen *Melan-A* no se expresó (llamada ausente de Affymetrix) en 64/64 de células de MM primarias y 20/20 HMCL, que incluyen U266 y XG-1. Datos derivados de una base de datos públicamente disponible muestran que el gen *Melan-A* no se expresa en tejidos epiteliales (22). Por el contrario, el gen HM1.24 se expresó en todas las células de MM primarias y HMCL (7). La producción de IFN-γ se desencadenó eficazmente en linfocitos T específicos de Melan-A$_{aa26-35*A27L}$ por HMCL U266 y la línea de células linfoblastoides B IM-9 a diferencia de la línea de carcinoma de mama MCF-7 Melan-A^{-} HM1.24^{-} HLA-A2^{+} (Figura 2B). En los ensayos de liberación de ^{51}Cromo, linfocitos T específicos de análogo de Melan-A pudieron destruir eficazmente HMCL U266 (Figura 3A) y XG-1 (Figura 3C), además de la línea de células linfoblastoides B IM-9 (Figura 3B), a diferencia de las células MCF-7. Así, linfocitos T específicos de análogo de Melan-A obtenidos de HD pueden destruir eficazmente células T2 pulsadas con HM1.24$_{aa22-30}$ además de HMCL HLA-A2^{+}.

Actividad in vitro de linfocitos T específicos de análogo de Melan-A de pacientes con MM contra células de MM autólogas.

Linfocitos T específicos de análogo de Melan-A podrían expandirse eficazmente a partir de la sangre periférica de pacientes con MM HLA-A2^{+}. La Figura 4A muestra un resultado utilizando sangre periférica del paciente con MM HLA-A2^{+} n.º: 10. Después de 6 semanas de reestimulación *in vitro*, el 17 % de los linfocitos T TCR^{+} ELAGIGILTV se detectaron en el cultivo celular usando tinción con el tetrámero HLA-A*0201 marcado con PE (Figura 4A). Linfocitos T específicos de análogo de Melan-A de este paciente produjeron IFN-γ cuando se activaron por células T2 pulsadas con análogo de Melan-A o con HM1.24$_{aa22-30}$ (Figura 4B). Los linfocitos T específicos de análogo de Melan-A también pudieron expandirse eficazmente por CD pulsadas con ELAGIGILTV y activadas por células T2 pulsadas con ELAGIGILTV (mostradas en el ensayo ELISpot de IFN-γ) en pacientes con MM n.^{os}: 1 y 3 (Figura 4C). Con el fin de evaluar la citotoxicidad de linfocitos T específicos de análogo de Melan-A (Melan-A$_{aa26-35*A27L}$ [ELAGIGILTV]) contra células de MM autólogas podrían realizarse ensayos de liberación de ^{51}Cromo para los pacientes n.^{os}: 1 - 9 (para características de pacientes, véase la Tabla 3). Los linfocitos T específicos de análogo de Melan-A podrían lisar eficazmente células de MM purificadas de médula ósea autólogas *in vitro* para los pacientes n.^{os}: 5, 6, 7, 8 y 9. Las células de carcinoma de mama MCF-7 HLA-A2^{+} usadas como un control no se lisaron específicamente (Figura 4D).

Ejemplo 4:

Tabla 4: Inmunomoduladores preferidos.

Clasificación*	Agente	Categoría de agente
1	IL-15	Factor de crecimiento de linfocitos T
2	Anti-PD1 y/o anti-B7-H1 (PD-1L)	*Inhibidor del bloqueo del punto de regulación de linfocitos T
3	IL-12	Adyuvante de vacuna
4	Anti-CD40 y/o CD40L	Estimulador de células presentadoras de antígeno
5	IL-7	Factor de crecimiento de linfocitos T
6	CpG	Adyuvante de vacuna
7	1MT	Inhibidor de enzimas
8	Anti-CD137 (anti-4-1 BB)	Estimulador de linfocitos T
9	Anti-TGF-β	Inhibidor de la señalización
10	Receptor anti-IL-10 o anti-IL-10	Inhibidor de la supresión
11	Flt3 L	Factor de crecimiento de células dendríticas / adyuvante de vacuna
12	Receptor de TNF inducido por anti-glucocorticoide (GITR)	Estimulador de linfocitos T
13	Adenovirus CCL21	Quimiocina atrayente de linfocitos T
14	MPL	Adyuvante de vacuna
15	Polyl:C y/o PolylCLC	Adyuvante de vacuna
16	Anti-OX40	Estimulador de linfocitos T
17	Anti-B7-H4	Inhibidor del bloqueo del punto de regulación de linfocitos T
18	Resiquimod y/o 852A	Adyuvante de vacuna
19	LIGHT y/o vector LIGHT	Estimulador de linfocitos T
20	Gen 3 de activación anti-linfocitos (LAG-3)	Inhibidor del bloqueo del punto de regulación de linfocitos T
*Anti-CTLA-4, un inhibidor del bloqueo del punto de regulación de linfocitos T, se consideró de valor extremadamente alto pero no se incluyó en la lista, ya que está siendo producido por dos empresas y es probable que sea autorizado por la FDA dentro de un futuro predecible.		

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universitätsklinikum Heidelberg

<120> Uso de péptidos específicos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ)

<130> UH66085PC

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido (consenso)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Gly Ile Gly Ile Leu Xaa Val
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> péptido (análogo de MART-1)

<400> 2

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido (MART-1)

<400> 3

Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido (HM1.24)

<400> 4

Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val
1 5

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un péptido que comprende o que consiste esencialmente en un motivo de secuencia como se muestra en la SEC ID N.º: 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ).

2.- El uso de la reivindicación 1, en el que dicho péptido comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos como se muestra en una cualquiera de las SEC ID N.ºs: 2, 3 o 4.

3.- Uso de un linfocito T activado que reconoce específicamente el péptido según se define en la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ).

4.- Uso de una célula presentadora de antígeno que presenta específicamente un epítope de péptido según se define en la reivindicación 1 o 2 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) o de mieloma múltiple quiescente (MMQ).

5.- El uso de la reivindicación 4, en el que dicha célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

6.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un agente terapéutico va a administrarse en combinación.

7.- El uso de la reivindicación 6, en el que dicho agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o un inmunomodulador.

8.- Un procedimiento para la fabricación *ex vivo* de un linfocito T activado según se define en la reivindicación 3 que comprende las etapas de:

a) obtener linfocitos T de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ,
b) poner en contacto dichos linfocitos T con un péptido según se define en la reivindicación 1 o 2 y
c) recoger los linfocitos T activados.

9.- El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dichos linfocitos T activados son linfocitos T $CD8^+$ hacia una célula diana que expresa el péptido según se define en la reivindicación 1 o 2.

10.- Un procedimiento para la fabricación *ex vivo* de una célula presentadora de antígeno según se define en las reivindicaciones 4 y 5 que comprende las etapas de:

a) obtener células presentadoras de antígeno inmaduras de una muestra de un sujeto que padece GMSI o MMQ,
b) poner en contacto dichas células presentadoras de antígeno inmaduras con un péptido según se define en la reivindicación 1 o 2 y
c) recoger las células presentadoras de antígeno maduras.

11.- El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha célula presentadora de antígeno madura puede estimular linfocitos T sin tratamiento previo que se convierten entonces en linfocitos T $CD8^+$ hacia una célula diana que expresa el péptido según se define en las reivindicaciones 1 o 2.

12.- El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha célula presentadora de antígeno inmadura es una célula dendrítica.

Fig.: 1A

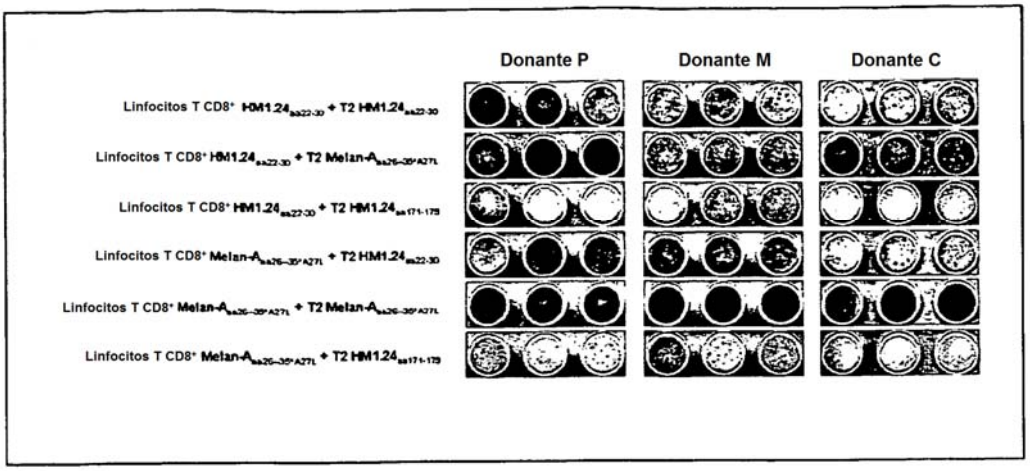

Donante P
Donante M
Donante C
Linfocitos T CD8+ HM1.24aa22-30 + T2 HM1.24aa22-30
Linfocitos T CD8+ HM1.24aa22-30 + T2 Melan-Aaa26-35*A27L
Linfocitos T CD8+ HM1.24aa22-30 + T2 HM1.24aa171-179
Linfocitos T CD8+ Melan-Aaa26-35*A27L + T2 HM1.24aa22-30
Linfocitos T CD8+ Melan-Aaa26-35*A27L + T2 Melan-Aaa26-35*A27L
Linfocitos T CD8+ Melan-Aaa26-35*A27L + T2 HM1.24aa171-179

Fig.: 1B

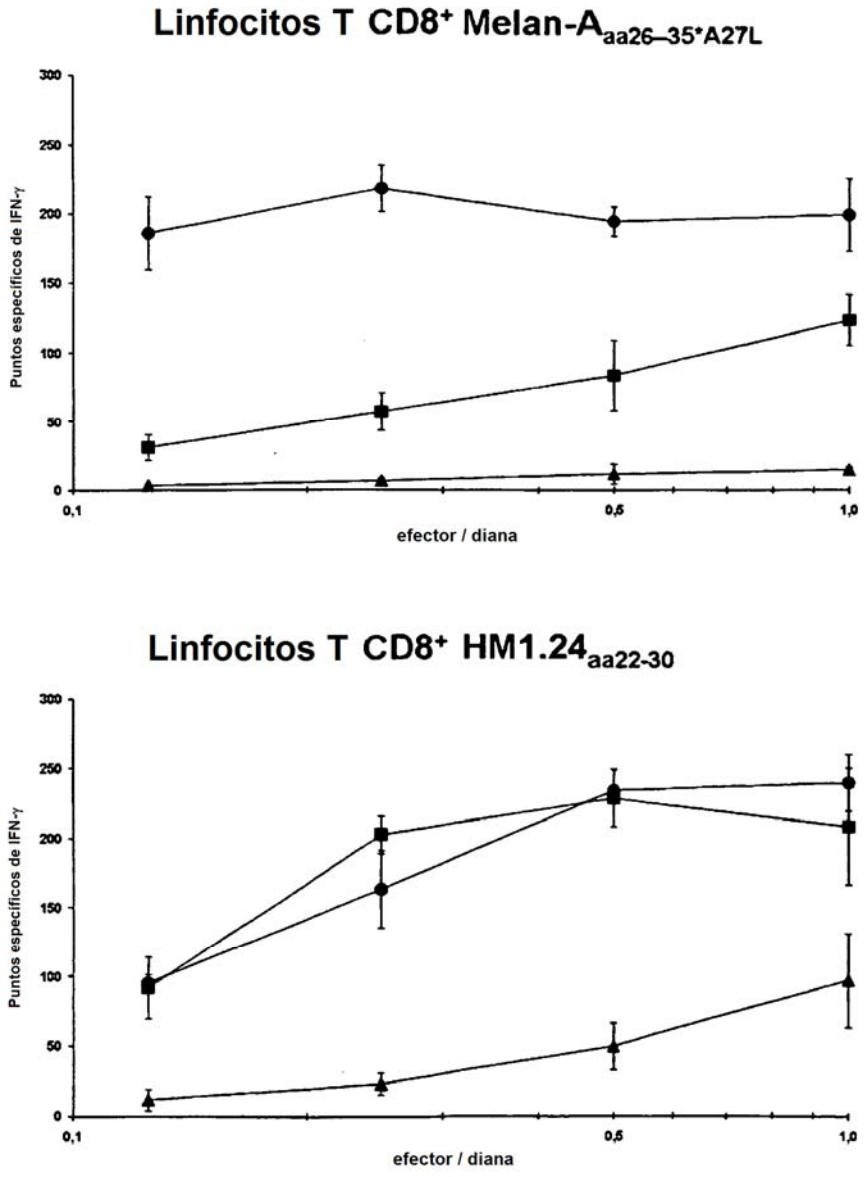

Linfocitos T CD8+ Melan-Aaa26–35*A27L
Puntos específicos de IFN-γ
300
250
200
150
100
50
0
0,1
0,5
1,0
efector / diana
Linfocitos T CD8+ HM1.24aa22-30
Puntos específicos de IFN-γ
300
250
200
150
100
50
0
0,1
0,5
1,0
efector / diana

Fig.: 2

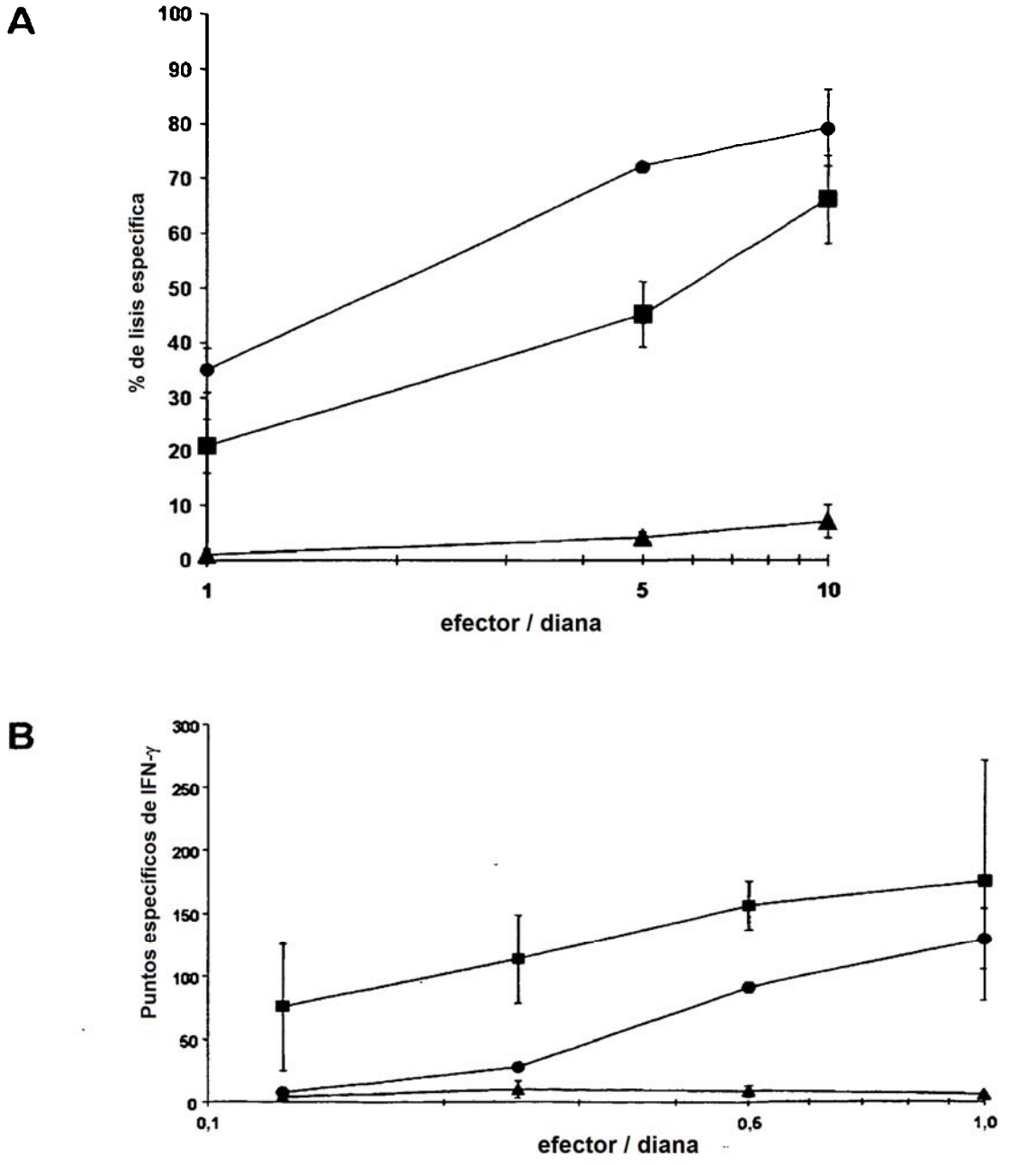
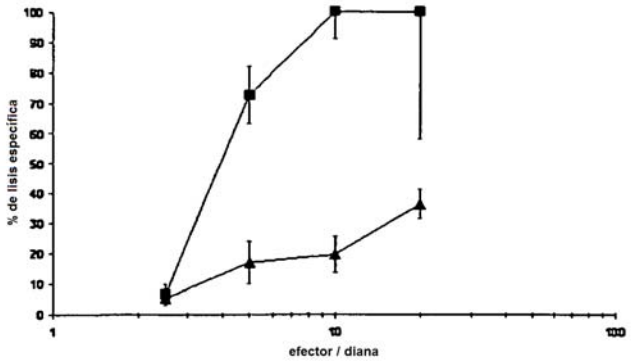
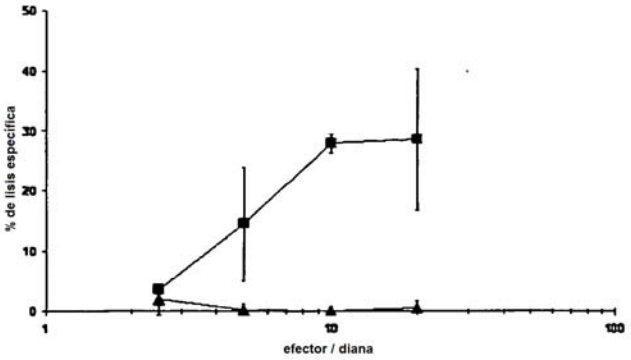

A
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% de lisis especifica
1
5
10
efector / diana
B
300
250
200
150
100
50
0
Puntos especificos de IFN-γ
0,1
0,5
1,0
efector / diana

Fig.: 3

A


% de lisis especifica
efector / diana

B


% de lisis especifica
efector / diana

C

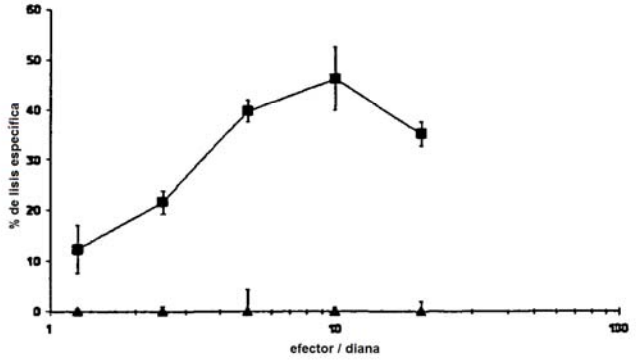
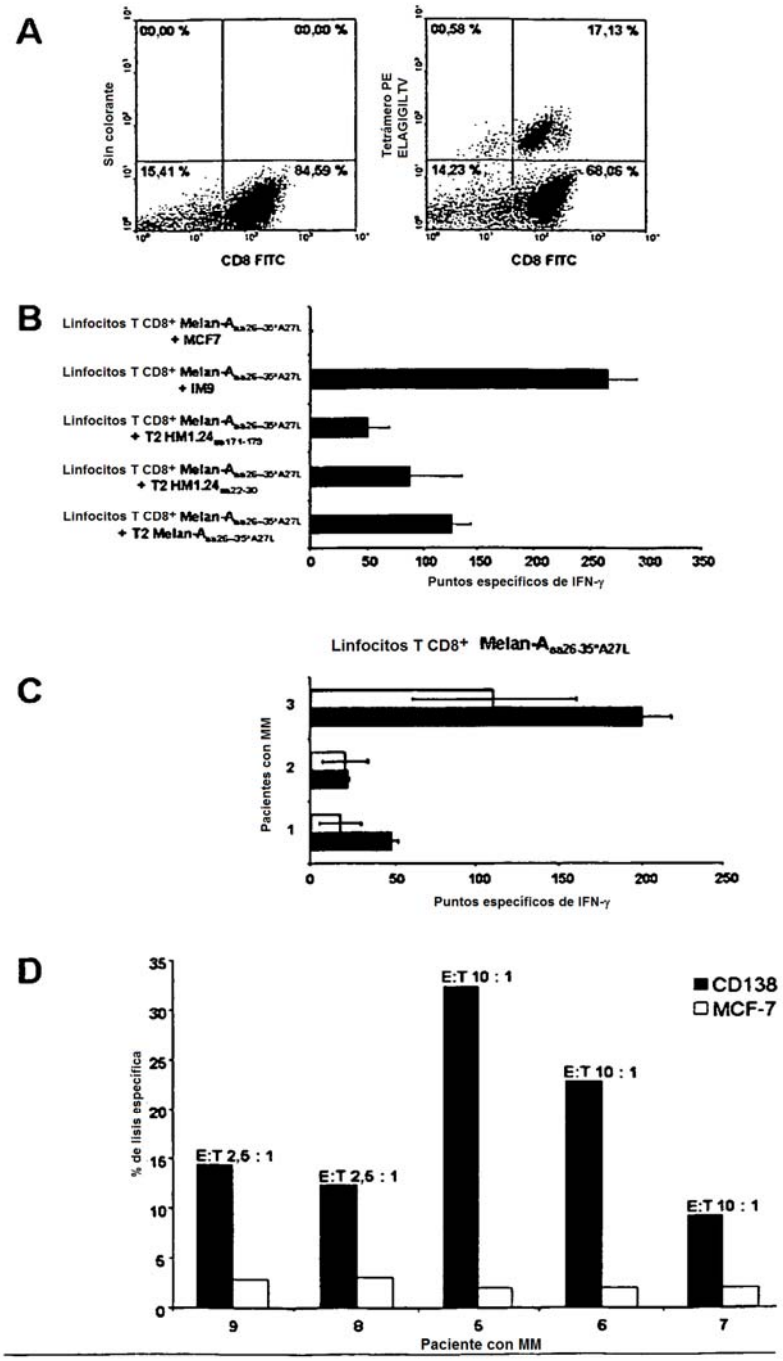

% de lisis especifica
efector / diana

Fig.: 4


A
00,00 %
00,00 %
15,41 %
84,59 %
Sin colorante
CD8 FITC
00,58 %
17,13 %
14,23 %
68,06 %
Tetrámero PE ELAGIGILTV
CD8 FITC
B
Linfocitos T CD8+ Melan-A aa26-35*A27L + MCF7
Linfocitos T CD8+ Melan-A aa26-35*A27L + IM9
Linfocitos T CD8+ Melan-A aa26-35*A27L + T2 HM1.24 aa171-179
Linfocitos T CD8+ Melan-A aa26-35*A27L + T2 HM1.24 aa22-30
Linfocitos T CD8+ Melan-A aa26-35*A27L + T2 Melan-A aa26-35*A27L
0 50 100 150 200 250 300 350
Puntos específicos de IFN-γ
C
Linfocitos T CD8+ Melan-A aa26-35*A27L
Pacientes con MM
3
2
1
0 50 100 150 200 250
Puntos específicos de IFN-γ
D
% de lisis específica
0 5 10 15 20 25 30 35
E:T 2,5 : 1
E:T 2,5 : 1
E:T 10 : 1
E:T 10 : 1
E:T 10 : 1
CD138
MCF-7
9 8 6 6 7
Paciente con MM