

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 815**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 08785107 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2183361**

54 Título: **Nueva inmunoterapia contra tumores neuronales y cerebrales**

30 Prioridad:

27.07.2007 EP 07014797

31.07.2007 US 953161 P

27.03.2008 EP 08005889

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

24.08.2015

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
PAUL-EHRLICH-STRASSE 15
72076 TÜBINGEN, DE**

72 Inventor/es:

**SCHOOR, OLIVER;
HILF, NORBERT;
WEINSCHENK, TONI;
TRAUTWEIN, CLAUDIA;
WALTER, STEFFEN y
SINGH, HARPREET**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 543 815 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

Nueva inmunoterapia contra tumores neuronales y cerebrales

La presente invención se refiere a péptidos, ácidos nucleicos y células destinados a la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención se refiere asimismo a epítomos peptídicos para linfocitos T citotóxicos (CTL) asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales. La presente invención se refiere a secuencias peptídicas derivadas de moléculas HLA de clase I de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales.

10 **Antecedentes de la invención**

Los gliomas son tumores cerebrales originados en las células gliales del sistema nervioso. Las células gliales, llamadas por lo común neuroglía o simplemente glía, son células no neuronales que proporcionan soporte y nutrición, mantienen la homeostasia, forman la mielina e intervienen en la transmisión de señales en el sistema nervioso. Los dos tipos más importantes de glioma son el astrocitoma y el oligodendroglioma, llamados así por el tipo de célula glial que los origina, esto es, astrocitos y oligodendrocitos. En el grupo de los astrocitomas se encuentra el glioblastoma multiforme (denominado en lo sucesivo glioblastoma) que es el tumor cerebral maligno más frecuente en adultos pues supone alrededor del 40% de los tumores cerebrales malignos y alrededor del 50% de los gliomas (CBTRUS, 2006). El glioblastoma invade con agresividad el sistema nervioso central y entre todos los gliomas es el que ostenta el nivel más alto de malignidad (grado IV). Pese a los avances en el tratamiento logrados merced a las mejoras en las técnicas de neuroimagen, la microcirugía y las opciones terapéuticas como la temozolomida o la radiación, el glioblastoma sigue siendo incurable (Macdonald, 2001; Burton and Prados, 2000; Prados and Levin, 2000). La tasa de letalidad de este tumor cerebral es muy alta: la esperanza de vida media oscila entre 9 y 12 meses desde el diagnóstico. La tasa de supervivencia a 5 años entre 1986 y 1990 era del 8,0%. Hasta la fecha, la supervivencia cinco años después del tratamiento agresivo que incluye la resección macroscópica del tumor sigue siendo inferior al 10% (Burton and Prados, 2000; Nieder et al., 2000; Napolitano et al., 1999; Dazzi et al., 2000). A tenor de lo anterior queda patente la necesidad de nuevos métodos terapéuticos eficaces.

El grado de indiferenciación de las células tumorales del glioblastoma es el más elevado de todos los tumores cerebrales, lo que explica su alto potencial de migración y proliferación y su elevada invasividad y, por ende, su pronóstico funesto. Los glioblastomas provocan la muerte por el crecimiento rápido, agresivo e infiltrante que demuestran en el cerebro. El crecimiento infiltrante es el responsable del carácter inoperable de estos tumores. Los glioblastomas también son relativamente resistentes a la radioterapia y la quimioterapia, por lo que la recurrencia postratamiento es elevada. Además, la respuesta inmunitaria contra las células neoplásicas resulta claramente ineficaz a la hora de lograr su erradicación total después de la resección y la radioterapia (Roth and Weller, 1999; Dix et al., 1999; Sablotzki et al., 2000).

El glioblastoma se clasifica en primario (*de novo*) y secundario dependiendo de las diferencias en el mecanismo génico de la transformación maligna que experimentan los astrocitos indiferenciados o las células precursoras gliales. El glioblastoma secundario afecta a personas jóvenes menores de 45 años. A lo largo de 4 o 5 años, en promedio, el glioblastoma secundario evoluciona de un astrocitoma de bajo grado a un astrocitoma indiferenciado. Por el contrario, el glioblastoma primario afecta sobre todo a personas más mayores, con una media de edad de 55 años. Por norma general, el glioblastoma primario aparece como un glioblastoma fulminante caracterizado por la progresión del tumor en 3 meses desde el estado sin anomalías clínicas ni patológicas (Pathology and Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, Francia, 2000)).

El glioblastoma migra a lo largo de los nervios mielinizados y se disemina ampliamente por el sistema nervioso central. En la mayoría de casos el tratamiento quirúrgico sólo consigue un efecto terapéutico limitado (Neurol. Med. Chir. (Tokio) 34, 91-94, 1994; Neurol. Med. Chir. (Tokio) 33, 425-458, 1993; Neuropathology 17, 186-188, 1997) (Macdonald, 2001; Prados and Levin, 2000).

Las células del glioma maligno eluden la detección del sistema inmunitario del anfitrión mediante la producción de agentes inmunodepresores que alteran la proliferación de los linfocitos T y la producción por parte de estos de la citocina inmunoestimulante IL-2 (Dix et al., 1999).

Las neoplasias intracraneales pueden surgir en cualquiera de las estructuras o tipos celulares del SNC: encéfalo, meninges, glándula pituitaria, cráneo, e incluso tejido embrionario residual. La incidencia anual total de tumores cerebrales primarios en Estados Unidos es de 14 casos por 100.000. Los tumores cerebrales primarios más frecuentes son los meningiomas, que representan el 27% de los tumores cerebrales primarios, y los glioblastomas, que suponen otro 23% (los glioblastomas suponen el 40% de los tumores cerebrales malignos en los adultos). Muchos de esos tumores son agresivos y presentan un alto grado. En la población pediátrica los tumores cerebrales primarios son los tumores sólidos más frecuentes y la segunda causa de muerte por cáncer después de la leucemia.

A día de hoy prosigue la búsqueda de un tratamiento eficaz contra el glioblastoma. Para combatir tales células neoplásicas se está estudiando la inmunoterapia, o el tratamiento basado en el reclutamiento del sistema

inmunitario. Los primeros resultados alentadores se obtuvieron en estudios inmunoterapéuticos en humanos, en el curso de los cuales se pudieron generar respuestas de CTL específicas de antígeno que prolongaron la mediana del tiempo de supervivencia respecto al tratamiento estándar con una toxicidad mínima (Heimberger et al., 2006).

- 5 La presente solicitud pretende resolver un problema ofreciendo una nueva opción terapéutica eficaz y segura contra los tumores cerebrales que además mejora el bienestar de los pacientes porque prescinde del uso de agentes quimioterapéuticos o de otro tipo que pueden causar efectos secundarios graves.

Breve descripción del principio de la invención

Todos los términos utilizados en la presente memoria se definen del modo indicado a continuación a menos que se indique lo contrario.

- 10 El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen normalmente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener de 8 a 14 aminoácidos de longitud.

- 15 El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítipo o epítipos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 14, aproximadamente.

- 20 El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantengan los epítipos adecuados. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a moléculas proteicas de más de unos 30 residuos de longitud.

- 25 Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los CTL. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los CTL.

- 30 Un «epítipo» de linfocito T es una molécula peptídica corta que se une a una molécula MHC de clase I o II y que subsiguientemente es reconocida por un linfocito T. Los epítipos de linfocito T que se unen a las moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos. Los epítipos de linfocitos T que se unen a las moléculas MHC de clase II suelen tener una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos. En el caso de los epítipos que se unen a las moléculas MHC de clase II, el mismo epítipo de linfocito T puede compartir un segmento central común pero diferir en la longitud de las secuencias flanqueantes situadas en los extremos carboxi y amino-terminales debido al hecho de que los extremos de la molécula peptídica no quedan encastrados en la estructura de la hendidura de unión al péptido de la molécula MHC de clase II como sí lo están en la hendidura homónima de la molécula MHC de clase I.

- 35 Tres son los *locus* genéticos que codifican las moléculas MHC de clase I: HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A1, HLA-A2 y HLA-A11 son ejemplos de distintas moléculas MHC de clase I que se pueden expresar a partir de esos *locus*.

- 40 En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto ADN monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia. El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

- 45 La región codificante puede formar parte de un gen normal, mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

El término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

- 50 La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas de la presente invención se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y de oligonucleótidos cortos de enlace, o a partir de una serie de oligonucleótidos, con el fin de proporcionar un gen sintético capaz de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

El término «producto de expresión» define al polipéptido o a la proteína que es el producto natural de la traducción del gen y cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y, por tanto, que codifican el mismo aminoácido o aminoácidos.

5 El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia codificante, define una porción de ácido nucleico que no comprende la región codificante completa, cuyo producto de expresión retiene esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante completa.

10 El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en la forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de ADN mayor, que deriva de ADN aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, sin materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes corriente abajo (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

15 El término «cebador» define una secuencia corta de ácidos nucleicos que puede aparearse con una cadena de ADN y que proporciona un extremo 3'OH libre en el que una polimerasa de ADN puede comenzar la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

20 El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción.

25 El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si es separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrán formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrán formar parte de una composición, y seguir estando aislados en dicho vector o composición puesto que estos no forman parte de su entorno natural.

30 Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

40 Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

45 El término «fragmento activo» define un fragmento que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunogénica) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de CTL en el animal receptor, como el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de CTL *in vitro*.

50 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Esto significa que cualquiera de esos fragmentos, necesariamente y como parte de su secuencia de aminoácidos, contendrá un segmento, fragmento o porción que es sustancialmente idéntica, si no lo es exactamente, a una secuencia de las SEQ ID n. ° 1 a 11, que corresponde a la estructura natural, o a las proteínas «precursoras» de las SEQ ID n. ° 1 a 11. Utilizados en relación con los polinucleótidos, dichos términos se refieren a

los productos generados por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

5 Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje idéntico» en alusión a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

10 Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje idéntico», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad porcentual} = 100 [I - (C/R)]$$

donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde

15 (I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
 (II) cada hueco (*gap*) de la secuencia de referencia y
 (III) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia;

20 y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

25 Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad porcentual, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda la identidad porcentual mínima especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que la identidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

30 Los péptidos originales descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrofóbico que es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, si una leucina se reemplaza por isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

35 Las sustituciones conservadoras se definen como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

45 Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares pero diferenciado de alguna manera en el tamaño, como en el reemplazo de un residuo de isoleucina por alanina. Los reemplazos muy poco o nada conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por otro polar, o incluso por uno de carácter básico. Estas sustituciones «radicales» no se pueden descartar, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien pueden provocar efectos inesperados imposibles de predecir de otra forma a partir de principios químicos simples.

50 Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir polipéptidos inmunógenos e inmunogénicos de acuerdo con la presente descripción.

55 Si se descubre que las sustituciones en más de una posición resultan en un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más abajo, entonces las combinaciones de dichas

sustituciones se probarán para determinar si las sustituciones combinadas provocan efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán hasta 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas, preferiblemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido; la secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido; o la desgranulación. En el caso de los linfocitos T cooperadores restringidos a MHC de clase II, las funciones efectoras pueden ser la secreción inducida por péptido de citocinas, preferiblemente de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4, IL-5, IL-10 o IL-2, o la desgranulación inducida por péptido. Las posibles funciones efectoras de los CTL y de los linfocitos T cooperadores no se limitan a esta lista.

En función de los ensayos de citotoxicidad, un epítipo se considera sustancialmente idéntico al péptido de referencia si al menos posee el 10% de la actividad antigénica del péptido de referencia, definida ésta por la capacidad del péptido sustituido para reconstituir el epítipo reconocido por un CTL en comparación con el péptido de referencia. Así pues, cuando se compara la actividad lítica en el segmento lineal de las curvas efector:diana con concentraciones equimolares de los péptidos de referencia y sustituido, el porcentaje de muerte selectiva observado en las células diana incubadas con el péptido sustituido debe ser igual al del péptido de referencia en un cociente efector:diana que no sea más de 10 veces mayor que el cociente efector:diana correspondiente al péptido de referencia con el que se hace la comparación.

Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido de las SEQ ID N. ° 1 a 11 se prueben contra los péptidos sustituidos, la concentración de péptido a la cual los péptidos sustituidos consiguen la mitad del aumento máximo de la lisis respecto al valor de fondo es como máximo de alrededor de 1 mM, preferiblemente como máximo de alrededor de 1 µM, más preferiblemente como máximo de alrededor de 1 nM, y aún más preferentemente como máximo de alrededor de 100 pM, y más preferentemente como máximo de alrededor de 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por los CTL de más de un individuo, de al menos dos, y más preferiblemente de tres individuos.

Así pues, los epítopos pueden ser idénticos a los epítopos específicos de tumor o asociados a tumor naturales o pueden incluir epítopos que difieran como máximo en 4 residuos del péptido de referencia, siempre que conserven básicamente la misma actividad antigénica.

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha abierto la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para desencadenar una respuesta inmunitaria que es específica contra los antígenos expresados en la superficie de células tumorales y que a través de este mecanismo de acción sea capaz de inducir la regresión, paralice o frene el crecimiento del tumor. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer (Cheever et al., 1993; Zeh, III et al., 1999). A partir del análisis de 415 especímenes de pacientes aquejados de cáncer colorrectal, Galon et al. fueron capaces de demostrar que el tipo, la densidad y la localización de las células inmunitarias en el tejido tumoral son realmente mejores predictores de la supervivencia del paciente que la ampliamente utilizada estadificación TNM de los tumores (Galon et al., 2006). En particular los linfocitos T CD8-positivos (T-CD8⁺), que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRiPS) (Schubert et al., 2000), desempeñan un importante papel en esta respuesta. En la bibliografía también se describen péptidos provenientes de proteínas sometidas a procesos de empalme (*splicing*). Las moléculas MHC de la especie humana también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: moléculas de MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas. Las moléculas MHC están compuestas por una cadena pesada alfa y beta-2-microglobulina (receptores de MHC de clase I) o por una cadena alfa y una cadena beta (receptores de MHC de clase II). La conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos. Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos resultantes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRiP y péptidos más grandes. Las moléculas de MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan predominantemente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después son procesadas por las mismas (Cresswell, 1994). Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos

portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos (Wang and Livingstone, 2003; Sun and Bevan, 2003; Shedlock and Shen, 2003). Por esta razón, la identificación de epítomos derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) que sean reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos reviste suma importancia para el desarrollo de medicamentos que estimulen una respuesta inmunitaria antitumoral (Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto con sorpresa que las células tumorales expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel et al., 2006).

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores sin el concurso de las células efectoras CTL (los linfocitos T CD8-positivos) a través de la inhibición de la angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ) (Qin and Blankenstein, 2000). Además se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden contrarrestar la progresión tumoral mediante la inducción de respuestas de anticuerpos al reconocer péptidos de antígenos asociados a tumor presentados por moléculas HLA de clase II (Kennedy et al., 2003). A diferencia de lo que sucede con los péptidos asociados a tumor reconocidos por moléculas HLA de clase I, hasta la fecha el número descrito de ligandos de clase II derivados de antígenos asociados a tumor (AAT) es pequeño (www.cancerimmunity.org, www.syfpeithi.de).

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células del sistema inmunitario (Mach et al., 1996), la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel et al. descubrieron hace poco varios epítomos de MHC de clase II en tumores (WO 2007/028574, EP 1760088 B1; (Dengjel et al., 2006).

Para que un péptido desencadene una respuesta inmunitaria celular, debe unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclaje») en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo cada alelo MHC posee un «motivo de unión» que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión (Rammensee et al., 1997).

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores TCR específicos.

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados y, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están regulados al alza en las células del tumor correspondiente.

La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores comprende los siguientes grupos principales (Novellino et al., 2005):

1. Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase (van der Bruggen et al., 1991), que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatoцитos/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y por tanto se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

2. Antígenos de diferenciación: Estos TAA están presentes tanto en los tumores como en el tejido normal del que deriva el tumor; la mayoría se encuentran en melanomas y en melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-A/MART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

3. TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítomos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y

desencadene la respuesta antitumoral. Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

4. Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.). Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo.

5. TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítomos nuevos en tumores como MUC1 o fenómenos como el ayuste de proteínas durante la degradación que en algunos casos pueden ser específicos de tumor (Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004).

6. Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como parte de un tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una célula tumoral a causa de su función, por ejemplo, porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerequisite para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítomo en particular.

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados, entre otros, en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales (Lemmel et al., 2004; Weinschenk et al., 2002).

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»). Las funciones efectoras habituales de los linfocitos T incluyen la secreción de interferón-gamma, perforina y granzimas.

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo T_{H1} apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los CTL CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + epítomo peptídico) o por los linfocitos T cooperadores CD4 positivos

(ligando: moléculas de MHC de clase II + epítipo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

La WO 2005/116051 da a conocer péptidos inmunogénicos de diverso origen, incluido el PTPRZ1 que se une a un alelo diferente.

- 5 Mulholland Paul J et al: "Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme" CELL CYCLE Abril de 2006, vol. 5, n. ° 7, páginas 783-791, dan a conocer que PTRPZ1 aparece amplificado con frecuencia en el glioblastoma. La US 2002-146370 da a conocer que la proteína tirosina fosfatasa zeta es una diana biomolecular en el tratamiento y la visualización de tumores cerebrales.

10 Por tanto, la presente invención tiene como uno de sus objetos proporcionar nuevas secuencias de aminoácidos de péptidos que son capaces de unirse a complejos MHC.

Breve descripción de las figuras

15 Las Fig. 1a y b muestran los espectros resultantes de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas ESI que identifican los péptidos asociados a tumor (TUMAP) PTP-001 de la muestra de glioblastoma GB1006 y el PTP-002 de la muestra de glioblastoma GB6003 que se presentaron de un modo restringido a MHC de clase I.

La Fig. 2 expone el perfil de expresión del ARNm del gen PTPRZ1 que codifica los péptidos asociados a glioblastoma mostrados en la Tabla 1. La expresión de este gen es nula o muy baja en los tejidos normales pero es muy elevada en las muestras de glioblastoma (GB1006T a GB1011T; NCH359T y NCH361T).

20 La Figura 3 expone un ejemplo representativo de los linfocitos T CD8+ específicos para PTP-002 en un donante sano HLA-A*0201 tras la estimulación *in vitro* con PTP-002 tal y como se ha determinado con el análisis por citometría de flujo. Los linfocitos T CD8+ se aislaron de PBMC humanas de donantes sanos y sensibilizadas *in vitro* con «células presentadoras de antígeno artificiales» (aAPC) molecularmente definidas cargadas con moléculas co-estimuladoras y A*0201/PTP-002 (diagrama izquierdo) o un péptido A*0201 irrelevante (diagrama derecho) (Walter et al., 2003). Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción de los tetrámeros peptídicos PTP-002 y de los tetrámeros peptídicos irrelevantes. Las células se seleccionaron entre la población de linfocitos CD8+; los porcentajes indicados representan la frecuencia de células positivas para cada tetrámero en dicha población.

30 La Figura 4 muestra las afinidades de péptidos de la invención hacia el HLA-A*0201. Las constantes de disociación (K_D) de los péptidos HLA de clase I y del péptido marcador viral HBV-001 se midieron con una prueba ELISA (véase el Ejemplo 4).

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona péptidos que son útiles para el tratamiento del glioblastoma. Con técnicas de espectrometría de masas se ha demostrado directamente la presentación natural por moléculas HLA de estos péptidos en muestras de glioblastoma humano primario (véanse el ejemplo 1 y la figura 1). El gen originario del cual derivan diez de esos péptidos –PTPRZ1– está muy sobreexpresado en el glioblastoma en comparación con los tejidos normales (véase ejemplo 2y figura 2) lo cual demuestra el alto grado de asociación con el tumor de los mismos, es decir, que esos péptidos son presentados abundantemente en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales. El gen originario del cual deriva el undécimo péptido –CHI3L2– fue identificado inicialmente en los condrocitos. Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T destruyen las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, p. ej. células tumorales de glioblastoma que presentan péptidos derivados del PTPRZ1 o del CHI3L2. Varios péptidos de la presente invención han demostrado ser capaces de estimular las respuestas de los linfocitos T (véanse el ejemplo 3 y la figura 3). Así pues, los péptidos de la presente invención son útiles para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (p. ej. péptidos alargados, proteínas o ácido nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los péptidos diana de la presente invención no son presentados en los tejidos normales, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

55 Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para el diagnóstico. Dado que muchos de los péptidos son generados por el glioblastoma y se ha determinado que dichos péptidos no están presentes en tejidos normales, dichos péptidos pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los TUMAP reivindicados en biopsias de tejido puede ayudar al anatomopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos TUMAP mediante anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al anatomopatólogo de que el tejido es maligno o está inflamado o enfermo. La presencia de grupos de TUMAP puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

- 5 La detección de los TUMAP en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se prevé que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de TUMAP indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.
- 10 Los TUMAP pueden ser utilizados para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las respuestas de los linfocitos T o las respuestas de anticuerpos contra el TUMAP o el TUMAP unido a moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden ser utilizadas como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, como, por ejemplo, la vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia de linfocitos de donantes. En el ámbito de la terapia génica, las respuestas de los linfocitos contra los TUMAP pueden tenerse en cuenta para la evaluación de efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo, con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.
- 15
- 20 Los TUMAP pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/TUMAP. Estos pueden ser utilizados como terapia, para dirigir toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos.
- 25 Además se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

La Tabla 1 muestra los péptidos dados a conocer, la SEQ ID N. ° 3 corresponde a la presente invención, sus respectivas SEQ ID N. °, los alelos HLA a los que se unen cada uno de ellos y las proteínas originarias de las que pueden surgir dichos péptidos.

Tabla 1: Péptidos dados a conocer

SEQ ID N. °	Código del péptido	Secuencia	Alelos HLA	Proteína(s) originaria(s)
1	PTP-001	ALTTLMHQL	A*0205	PTPRZ1
2	PTP-002	FLYKVLISL	A*02	PTPRZ1
3	PTP-003	AIIDGVESV	A*02	PTPRZ1
4	PTP-004	FLLPDTDGL	A*02	PTPRZ1
5	PTP-005	KVFIAGIPTV	A*02	PTPRZ1
6	PTP-006	QQSDYSAAL	A*02#	PTPRZ1
7	PTP-007	TQDDYVLEV	A*02#	PTPRZ1, PTPRG
8	PTP-008	QHEGTVNIF	B*38	PTPRZ1
9	PTP-009	SVFGDDNKALSK	No determinado	PTPRZ1
10	PTP-010	EIGWSYTGALNQKN	HLA-DR	PTPRZ1
11	CHI-001	SLWAGVVVL	A*02	CHI3L2
# probablemente subtipo A*205				

30

Sorprendentemente, la SEQ ID N. ° 2 también se ha encontrado presente en el carcinoma adenoescamoso primario (un tipo de cáncer de pulmón) y por tanto también puede ser utilizada para tratar dicho tipo de cáncer de acuerdo con la susodicha descripción.

Proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, Zeta1 (PTPRZ1, PTP-ξ)

El PTPRZ1 es un miembro de la familia de las proteínas tirosina fosfatasa de tipo receptor y codifica una proteína de membrana de un solo paso de tipo 1 dotada de dos dominios citoplasmáticos de tirosina fosfatasa, un dominio alfa-anhidrasa carbónica y un dominio de fibronectina de tipo III (Wu et al., 2006), en el cáncer de mama (Perez-Pinera et al., 2007), en los oligodendrocitos remielinizantes de las lesiones de la esclerosis múltiple (Harroch et al., 2002), y en células renales embrionarias humanas en condiciones hipóxicas (Wang et al., 2005).

Tanto la proteína como el transcrito aparecen sobreexpresados en las células del glioblastoma, hecho que promueve su migración haptotáctica (Lu et al., 2005). Asimismo, el PTRPZ1 aparece con frecuencia amplificado a nivel del ADN genómico en el glioblastoma (Mulholland et al., 2006).

Kaplan y cols. clonaron 3 genes de la PTP de tipo receptor humana, entre ellos el PTP- γ (Kaplan et al., 1990). Se ha demostrado que un alelo PTPG se pierde en 3 de 5 estirpes celulares de carcinoma renal y en 5 de una decena de muestras de carcinoma pulmonar analizadas. El ARNm de la PTP- γ se ha hallado expresado en estirpes de células renales y pulmonares pero no en varias estirpes hematopoyéticas analizadas. Así pues, el gen PTP- γ parece tener características que hacen pensar en él como en un gen supresor de tumores en el carcinoma renal y el de pulmón. Gebbink et cols. aislaron un ADNc de ratón de 5,7 kb, que codifica un 'nuevo' miembro de la familia de las proteínas-fosfatasas de tirosina de receptor, llamado RPTP μ (Gebbink et al., 1991). El ADNc predijo una proteína de 1432 aminoácidos (sin incluir el péptido señal) con una masa molecular calculada de 161. 636 Da. Además, clonaron el homólogo humano, cuya cadena de aminoácidos presentaba una homología del 98,7% con la proteína de ratón. La proteína de ratón predicha consistía en una región extracelular de 722 aminoácidos, que albergaba 13 posibles sitios de N-glucosilación, un solo dominio transmembrana, y una parte intracelular de 688 aminoácidos que contiene dos repeticiones en tándem homólogas a los dominios catalíticos de otras fosfatasas de tirosina. El análisis por electrotransferencia de ARN reveló un solo transcrito que abundaba sobre todo en el pulmón pero también estaba presente, aunque en cantidades mucho menores, en el cerebro y en el corazón. El gen PTP μ humano se asignó al cromosoma 18pter-q11 a raíz del análisis por transferencia Southern de clones híbridos de células somáticas humanas y de ratón.

El ADNc de la PTP- ϵ fue aislado por Krueger y cols. (Krueger et al., 1990). La proteína de 700 aminoácidos tiene un dominio extracelular corto y dos dominios intracelulares PTPasa repetidos en tándem. En el cerebro y en el testículo de ratón se han registrado altos niveles de transcripción de PTP- ϵ . Ambas isoformas de la PTP- ϵ —la isoforma de tipo receptor y transmembrana y la otra más corta, la citoplasmática— parecen proceder de un mismo gen a través de promotores y exones 5-prima alternativos.

Barnea y cols. (Barnea et al., 1993) clonaron los ADNc del gen PTP- γ humano y de ratón (designado PTP- γ por dicho grupo de investigación) a partir de genotecas de ADNc del cerebro y analizaron sus secuencias polipeptídicas predichas. Las secuencias humana (1445 aminoácidos) y de ratón (1442 aminoácidos) comparten una identidad del 95% en cuanto a secuencia de aminoácidos y predicen un dominio extracelular putativo, un solo dominio transmembrana y una región citoplasmática dotada de dos dominios catalíticos fosfatasa de tirosina en tándem. El dominio extracelular contiene un segmento de 266 aminoácidos que son muy similares a la enzima anhidrasa carbónica dotada de cinc (MIM 114800), lo cual sugiere que la PTP- γ y la PTP- ξ (PTPRZ1) representan una subfamilia de 25 fosfatasas de tirosina de receptor. El gen de la PTP- γ tiene 30 exones y un tamaño aproximado de 780 kb. Es mucho más grande que los demás genes de las PTP de receptor, pues el gen CD45 (MIM 151460) ronda las 100 kb y los demás son más pequeños aún.

Otra fosfatasa de tirosina de tipo receptor, la proteína-fosfatasa de tirosina zeta (PTPRZ1) [también llamada PTP- ξ , HPTP-ZETA, HPTPZ, RPTP-BETA(β) o RPTPB] fue aislada en forma de secuencia de ADNc por dos grupos de investigación a inicios de la década de 1990. Levy y cols. (Levy et al., 1993) aislaron clones de ADNc de una genoteca de expresión de ARNm del tronco encefálico de lactante humano, y dedujeron la secuencia completa de aminoácidos de una gran proteína fosfatasa de tirosina de tipo receptor que contenía 2307 aminoácidos.

Levy descubrió que la proteína, designada por ellos como PTP β (PTPRZ1), es una proteína transmembrana con dos dominios PTPasa citoplasmáticos y un dominio extracelular de 1616 aminoácidos. A semejanza de la PTP- γ (MIM 176886), los 266 residuos N-terminales del dominio extracelular presentan un gran similitud con los de las anhidrasas carbónicas (véase MIM 114880). El gen humano que codifica la PTPRZ1 ha sido localizado en el cromosoma 7q31. 3-q32 mediante hibridación *in situ* cromosómica (Ariyama et al., 1995). El análisis por electrotransferencia Northern ha demostrado que la PTP-zeta solo se expresa en el sistema nervioso central humano. Por medio de la hibridación *in situ* (Levy et al., 1993) localizaron la expresión en diferentes regiones del cerebro humano adulto, tales como la capa de neuronas de Purkinje del cerebelo, el giro dentado y la capa subependimaria del asta anterior del ventrículo lateral. Levy afirmó que esta era la primera fosfatasa de tirosina de mamífero cuya expresión estaba circunscrita al sistema nervioso. Además, los altos niveles de expresión en el cerebro embrionario de ratón indicaban un papel importante en el desarrollo del SNC.

Así pues, la familia de proteínas de receptores con actividad PTP ha sido caracterizada como una familia bastante diversa de receptores de membrana y de isoformas no unidas a membrana, que tienen en común una estructura dotada de un dominio citosólico PTPasa. Aunque su expresión en los tejidos fetales y embrionarios parece indicar un papel en la biología del desarrollo para estas proteínas, su cometido biológico en la salud y en la enfermedad no se conoce totalmente.

La patente de EE. UU. 6. 455. 026 señala a PTP- ξ (PTPRZ1) como una diana para el tratamiento y la visualización de tumores cerebrales. La solicitud aportaba métodos y reactivos para reconocer específicamente células tumorales cerebrales con fines terapéuticos y de diagnóstico por la imagen. Proporcionaba compuestos y composiciones basadas en la afinidad por la PTP- ξ que eran útiles para tratar tumores cerebrales en pacientes, recayendo en general dichas composiciones y compuestos en dos grupos: Compuestos conjugados que se unen a la PTP- ξ y que dotados de una fracción citotóxica inhiben el crecimiento de las células tumorales; y composiciones con compuestos que se unen a la PTP- ξ , en los que la fracción de unión a la PTP- ξ altera la función normal de ésta en la célula tumoral, inhibiendo su crecimiento.

En un primer grupo, se proporcionan compuestos conjugados que se unen a la PTP- ξ con efectos terapéuticos. Estos compuestos tienen la fórmula general $\alpha(P_z)C$, en la cual $\alpha(P_z)$ era una o varias fracciones que se unen específicamente a la proteína-fosfatasa de tirosina humana ξ , y la C representaba una o varias fracciones citotóxicas. En formas de realización preferidas (reveladas para todos los grupos) se daba a conocer que $\alpha(P_z)$ era un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En un segundo grupo se proporcionaban compuestos terapéuticos que se unían a PTP- ξ y que alteraban la función normal de la PTP- ξ en las células tumorales cerebrales inhibiendo su crecimiento. Estos compuestos terapéuticos que se unen al PTPRZ1 tenían la fórmula general $\alpha(P_z)$, siendo $\alpha(P_z)$ una o varias fracciones que se unen específicamente a la proteína fosfatasa de tirosina humana ξ , y en que la unión de $\alpha(P_z)$ altera la función de la proteína-fosfatasa de tirosina humana ξ .

La patente de EE. UU. 7. 060. 275 B2 da a conocer variantes de empalme del PTPRZ1, vectores que incluyen esas variantes y antígenos contra diversas variantes.

Quitinasa 3-Like 2 (CHI3L2)

La CHI3L2 se descubrió inicialmente en condrocitos. Se ha descrito frecuentemente como un antígeno diana en la artritis reumatoide. No se ha descubierto ninguna relación relevante de la CHI3L2 con el cáncer. La proteína quitinasa 3-like ha sido implicada en la estimulación de la proliferación de las células del tejido conectivo humano, como, por ejemplo, los fibroblastos, a través de la activación de la vía de señalización mediada por la PKB y la vía de la cinasa regulada por señales extracelulares (Recklies AD, White C, Ling H; The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways; Biochem J. 2002; 365:119-126). En ratón las proteínas quitinasa 3-like se han hallado muy reguladas al alza en modelos de cáncer gástrico inducido por *Helicobacter* (Takaishi S, Wang TC; Gene expression profiling in a mouse model of Helicobacter-induced gastric cancer; Cancer Sci. 2007 (3): 284-293).

En ningún ámbito de la técnica se ha considerado el uso de péptidos que se unen al MHC derivados de la PTPRZ1 o de la CHI3L2 como principios activos farmacéuticos para el tratamiento de tumores cerebrales.

En un primer aspecto de la misma, la presente invención proporciona un péptido seleccionado del grupo formado por: a) un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID n. °3, y b) un péptido acorde con a), en el que uno o dos de los residuos de aminoácidos están alterados de modo que el aminoácido A de la posición 1 es sustituido por I, L, F, K, M, Y o V, el aminoácido I de la posición 2 es sustituido por M, o L, el aminoácido I de la posición 3 es sustituido por A, Y, F, P, M, S o R, el aminoácido D de la posición 4 es sustituido por E, G, P o T, el aminoácido G de la posición 5 es sustituido por I, K, Y, N, F o V, el aminoácido V de la posición 6 es sustituido por I, L o T, el aminoácido E de la posición 7 es sustituido por A, Y o H, el aminoácido S de la posición 8 es sustituido por K o E, y el aminoácido V de la posición 9 es sustituido por L, en que dicho péptido mantiene la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en que dicho péptido es capaz de estimular los linfocitos T CD8.

Los péptidos de la invención tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. Las secuencias que se comparan en la presente memoria pueden tener una adición o delección (por ejemplo, un hueco o similar) en la alineación óptima de las dos secuencias. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo, (Nucleic Acid Res. , 1994, 22(22): 4673 4680). También se puede usar software para el análisis de secuencias comúnmente disponible, en concreto, Vector NTI, GENETYX y BLAST, o herramientas de análisis facilitadas por bases de datos públicas, como las que se pueden hallar, por ejemplo, en <http://dragon.bio.purdue.edu/bioinfolinks/>.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Fong et al., 2001b) (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

ES 2 543 815 T3

Aquellos residuos de aminoácidos que no contribuyen sustancialmente a las interacciones con el receptor del linfocito T pueden ser modificados sustituyéndolos por otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no suprima la unión al MHC pertinente.

Tabla 2: Variantes y motivos de los péptidos acordes con las SEQ ID n. ° 1 a 10

PTP-001		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		A	L	T	T	L	M	H	Q	L
	Variantes		V		P	E	V	I	H	Y	
			Y		F	D	L	V	V		
					I	K	I	L			
					M	N		A			
						P					
		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PTP-002	Código del péptido		F	L	Y	K	V	I	L	S	L
	Variantes			M							L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y	S	
			F		F	D	Y	T	H		
			K		P	T	N				
			M		M		G				
			Y		S		F				
			V		R		V				
						K	H				
PTP-003		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		A	I	I	D	G	V	E	S	V
	Variantes			M							L
				L							L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				

ES 2 543 815 T3

(Continuación)

PTP-001		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
			V		R						
PTP-004		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		F	L	L	P	D	T	D	G	L
	Variantes			M							L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	D	K	L	Y	S	
			K		F	T	Y		H		
			M		P		N				
			Y		M		G				
			V		S		F				
					R		V				
						K	H				
PTP-005		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		K	V	F	A	G	I	P	T	V
	Variantes			M							L
				L							L
						E				K	
			I		A	G	I		A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		P	T	Y	T	H		
			M		M		N				
			Y		S		F				
							V				
PTP-006		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		Q	Q	S	D	Y	S	A	A	L
	Variantes		V		P	E	V	I	H	Y	
			Y		F	K	L	V	V		
					I	N	I	L			
					M	P		A			

(Continuación)

PTP-001		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PTP-007		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		T	Q	D	D	Y	V	L	E	V
	Variantes		V		P	E	V	I	H	Y	L
			Y		F	K	L	V	V		
					I	N	I	L			
					M	P		A			
PTP-008		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		Q	H	E	G	T	V	N	I	F
	Variantes				D						
			I			E	M	V	Y	K	
						P	V	I	V	Y	
						L	A	T	N	N	
						E	R	K		R	
						G	N				
						L	H				
						K					
						S					

Es sabido que los péptidos que son presentados por MHC de clase II están compuestos por una «secuencia central» dotada de un secuencia de aminoácidos que se ajusta a cierto motivo específico del alelo de HLA y, opcionalmente, de extensiones N- y/o C-terminales que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, que se consideran irrelevantes para la interacción del péptido y todos o una parte de los clones de linfocitos T que reconocen la contrapartida natural). Las extensiones N- y/o C-terminales pueden, por ejemplo, tener entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, respectivamente. Estos péptidos se pueden utilizar directamente para cargar las moléculas MHC de clase II o bien la secuencia se puede clonar en vectores de acuerdo con la descripción ofrecida abajo en la presente memoria. Dado que estos péptidos constituyen el producto final del procesamiento de péptidos más grandes en el interior de la célula, también pueden utilizarse péptidos más largos. Los péptidos descritos pueden tener cualquier tamaño, pero normalmente suelen tener un peso molecular inferior a 100.000, preferiblemente inferior a 50.000, más preferiblemente inferior a 10.000 y normalmente unos 5.000. En cuanto al número de residuos de aminoácidos, los péptidos descritos pueden tener menos de 1.000 residuos, preferiblemente menos de 500 residuos, más preferiblemente menos de 100, más preferiblemente menos de 100 y aún más preferiblemente entre 30 y 8 residuos. En consecuencia, los datos a conocer son péptidos y variantes de los mismos en que dicho péptido o variante tiene una longitud total de entre 8 y 100, preferiblemente entre 8 y 30, y más preferiblemente entre 8 y 16 aminoácidos, esto es, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos.

En consecuencia, las variantes naturales o artificiales que estimulan la reacción cruzada de los linfocitos T con un péptido de la invención son a menudo variantes de longitud.

Si un péptido que es más largo de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos se utiliza directamente para unirse a una molécula MHC de clase II, es preferible que los residuos que flanquean la región de unión a HLA central sean residuos que no afecten sustancialmente a la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula MHC de clase II o presentar el péptido al linfocito T (cooperador). No obstante, como se ha indicado arriba, se apreciará que es posible usar péptidos más grandes, p. ej., los codificados por un polipéptido, ya que estos péptidos más grandes pueden ser fragmentados por células presentadoras de antígeno adecuadas.

También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 10 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítomo real. Se prefiere que los residuos que flanquean el epítomo de interés sean residuos que no afecten sustancialmente a la digestión proteolítica necesaria para exponer el epítomo durante el procesamiento.

5 Por supuesto, el péptido conforme a la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.

10 La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC puede ser analizada mediante métodos conocidos en la técnica, como, por ejemplo, los descritos en la bibliografía para diferentes alelos de MHC de clase II (p. ej., (Vogt et al., 1994; Malcherek et al., 1994; Manici et al., 1999; Hammer et al., 1995; Tompkins et al., 1993; Boyton et al., 1998)).

En una forma de realización preferida de la invención el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID n. ° 3.

15 En una forma de realización de la presente invención, el péptido es parte de una proteína de fusión que comprende los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497 (Strubin, M. et al 1984).

Ejemplos de péptidos son aquellos en que el péptido es seleccionado entre péptidos dotados de un subtipo de HLA específico y que son capaces de estimular linfocitos CD8, y en que dicho péptido comprende el motivo de aminoácidos de anclaje específico mostrado a continuación en la tabla 2a.

Tabla 2a Subtipos HLA y motivos de anclaje de los péptidos

Péptido	Subtipo HLA		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A*0205	Código del péptido		A	L	T	T	L	M	H	Q	L
		Motivo de anclaje		x	L	x	x	x	x	x	x	L
2	A*02	Código del péptido		F	L	Y	K	V	I	L	S	L
		Motivo de anclaje		x	L	x	x	x	x	x	x	L
3	A*02	Código del péptido		A	I	I	D	G	V	E	S	V
		Motivo de anclaje		x	I	x	x	x	x	x	x	V
4	A*02	Código del péptido		F	L	L	P	D	T	D	G	L
		Motivo de anclaje		x	L	x	x	x	x	x	x	L
5	A*02	Código del péptido		K	V	F	A	G	I	P	T	V
		Motivo de anclaje		x	V	x	x	x	x	x	x	V
6	A*02 (probable-mente subtipo A*205)	Código del péptido		Q	Q	S	D	Y	S	A	A	L
		Motivo de anclaje		x	Q	x	x	x	x	x	x	L
7	A*02 (probable-mente subtipo A*205)	Código del péptido		T	Q	D	D	Y	V	L	E	V
		Motivo de anclaje		x	Q	x	x	x	x	x	x	V
8	B*38	Código del péptido		Q	H	E	G	T	V	N	I	F
		Motivo de anclaje		x	H	E	x	x	x	x	x	F
x	A*02	Motivo de anclaje general para los péptidos		x	L/I/V	x	x	x	x	x	x	L/V

20

Además el péptido puede ser modificado aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas de MHC con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria más potente. Los métodos para conseguir esa optimización de

una secuencia peptídica son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o enlaces no peptídicos.

5 En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como, por ejemplo, los descritos por Meziere et al. (1997) *J. Immunol.* 159, 3230-3237. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere y cols. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para la unión al MHC y las respuestas de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

10 Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH₂-NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La patente de Estados Unidos 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH₃.

15 Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej., el grupo hidrofóbico t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

20 Adicionalmente, los péptidos descritos pueden ser sintetizados de tal modo que se altere su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el D-isómero de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido en lugar del L-isómero habitual. Y aún más, al menos uno de los residuos de aminoácidos de los péptidos de la descripción puede ser sustituido por uno de los consabidos residuos de aminoácidos no naturales. Alteraciones como éstas pueden servir para aumentar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la capacidad de unión de los péptidos descritos.

25 De manera similar, un péptido o variante descritos pueden ser modificados químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos, por ejemplo, en R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido per fórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al capítulo 15 de *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

30 En resumen, la modificación de, p. ej., los residuos arginilos de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilgloxal, 2,3-butanodiona, y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal con residuos de arginina. La cisteína se puede modificar sin la modificación simultánea de otros sitios nucleofílicos como sucede con la lisina y la histidina. Así pues, para la modificación de la cisteína hay disponible un gran número de reactivos. Las páginas web de empresas como Sigma-Aldrich ([http://www. sigma-aldrich. com](http://www.sigma-aldrich.com)) ofrecen información sobre reactivos concretos.

35 La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro.

40 El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico.

45 Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal.

50 La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α-amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etileno)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas.

55 Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T.

Los residuos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede consumir con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

En estudios recientes sobre la modificación del triptófano se han empleado N-bromosuccinimida, 2-hidroxi-5-nitrobenzilbromuro o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-escatol).

- 5 La modificación de proteínas terapéuticas y péptidos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

10 Un péptido que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámida, como muestra Lu et al. (1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibencidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloloiletilendiamina (entrelazante) y acriloisarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase, por ejemplo, Bruckdorfer et al. 2004 y las referencias citadas en la misma).

35 El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que, con la liofilización de la fase acuosa, proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general, por ejemplo, de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

40 La purificación puede llevarse a cabo mediante una sola o una combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando, p. ej., la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

45 El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

50 Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido) que codifica un péptido de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ACN, ARN o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones, siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la invención.

55 Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo, a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros complementarios para insertarlo en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Otro método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores son los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen ligadores sintéticos comerciales que contienen diversas dianas para las endonucleasas de restricción que facilitan varios proveedores como International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE. UU.

5 Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen (Saiki et al (1988)). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo, diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

10 El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las reveladas en las patentes de EE. UU. n.º 4. 440. 859, 4. 530. 901, 4. 582. 800, 4. 677. 063, 4. 678. 751, 15 4. 704. 362, 4. 710. 463, 4. 757. 006, 4. 766. 075 y 4. 810. 648.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención se puede unir con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

20 En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como, por ejemplo, de resistencia a antibióticos.

30 Otra alternativa consiste en incorporar el gen de ese rasgo seleccionable en otro vector con el que se cotransforma la célula hospedadora.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la invención se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas reveladas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

35 Son muchos los sistemas de expresión conocidos, como bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), hongos filamentosos (género *Aspergillus*, etc.), células vegetales, animales o de insectos. Preferiblemente el sistema consistirá en células de mamífero, como las células CHO disponibles de la ATCC Cell Biology Collection.

40 Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE. UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, 45 pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo, de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción, y marcaje de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, *c-myc* o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

50 La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En estirpes celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del ADN en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden 55 contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la β -lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de

cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos ANTI-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procarionota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procarionotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como, por ejemplo, las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc. , Bethesda, MD, EE. UU. , y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N. ° ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California 92037, EE. UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas, por ejemplo, en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols", Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas en la materia.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consume con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procarionotas, véanse, por ejemplo, Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. El método de Beggs (1978) Nature 275,104-109 también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc. , Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan un constructo de ADN de la presente invención, se pueden identificar con técnicas bien conocidas, como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la invención son útiles para la preparación de péptidos de la invención, por ejemplo, las células bacterianas, de levadura e insecto. Con todo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar células presentadoras de antígeno como las células dendríticas para expresar los péptidos de la invención de tal forma que puedan ser cargados en las moléculas MHC oportunas. Así pues, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la invención.

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) son en la actualidad objeto de investigación como tratamiento contra el cáncer de próstata (Sipuleucel-T) (Small EJ et al 2006; Rini et al 2006).

Se describe un método para la producción de un péptido o de su variante, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido puede ser preparado para la inyección por vía intravenosa (i. v.), subcutánea (s. c.), intradérmica (i. d.), intraperitoneal (i. p.) o intramuscular (i. m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s. c. , i. d. , i. p. , i. m. e i. v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen i. d. , i. m. , s. c. , i. p. e i. v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado en ensayos anteriores (Brunsvig et al 2006; Staehler et al 2007).

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo dicho método la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de linfocitos T con moléculas MHC humanas de clase I o II cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

- 5 Cuando se esté utilizando como antígeno un epítipo de MHC de clase II, los linfocitos T serán linfocitos cooperadores CD4-positivos, preferiblemente del tipo T_{H1}. Las moléculas MHC de clase II se pueden expresar en la superficie de cualquier célula adecuada. Preferiblemente la célula no debe expresar de forma natural moléculas MHC de clase II (de ser así, la célula tendrá que ser transfectada para que exprese dicha molécula). Si, en cambio, la célula expresa de forma natural moléculas MHC de clase II es preferible que sea defectuosa en los mecanismos de procesamiento o presentación de antígenos. De ese modo será posible que la célula que expresa la molécula MHC de clase II quede completamente cargada con el antígeno peptídico escogido antes de activar el linfocito T.
- 10 La célula presentadora de antígeno (o célula estimuladora) normalmente presenta moléculas de MHC de clase II en su superficie y preferiblemente es básicamente incapaz de cargar dicha molécula de MHC de clase II con el antígeno seleccionado. La molécula de MHC de clase II puede cargarse fácilmente *in vitro* con el antígeno seleccionado.
- 15 Preferiblemente, la célula de mamífero carece del transportador de péptidos TAP o bien este se presenta en un nivel reducido o funciona defectuosamente. Las células adecuadas que carecen del transportador de péptidos TAP incluyen las células T2, RMA-S y de *Drosophila*. TAP es el transportador relacionado con el procesamiento de los antígenos.
- 20 La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE. UU. con el n.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* denominada línea 2 de Schneider está disponible en la ATCC con el n.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Karre et al. 1985.
- 25 Preferentemente, dicha célula hospedadora no expresa sustancialmente moléculas MHC de clase I antes de la transfección. También es preferible que la célula estimuladora exprese una molécula importante que proporcione una señal coestimuladora para los linfocitos T, como B7. 1, B7. 2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.
- Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga la SEQ ID n.º 3.
- 30 Existen otros métodos para generar CTL *in vitro*. Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples et al. (1995) y Kawakami et al. (1992) emplean linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al. (1995) recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los CTL. Jochmus et al. (1997) describen la producción de CTL autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. Hill et al. (1995) y Jerome et al (1993) emplean linfocitos B para la producción de CTL autólogos. Asimismo, para la preparación de CTL autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido, o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. 2003 describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC), que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección. En este estudio, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidéz alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo, citocinas, como la interleucina-12.
- 35 40 45 Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras, células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta et al (1994), que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).
- 50 Los linfocitos T activados que están dirigidos contra los péptidos de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T activados obtenibles por los susodichos métodos de la invención.
- Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3.
- 55 Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interactuando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo, uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la

- invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administran al paciente pueden proceder de él mismo y ser activados del modo antes descrito, es decir, son linfocitos T autólogos. Otra alternativa consiste en que los linfocitos T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por "individuo sano" los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse mediante análisis.
- En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD8-positivos pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales circundantes al tumor (células tumorales) (que en ocasiones también expresan MHC de clase II; (Dengjel et al., 2006)).
- Los linfocitos T se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también describe un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.
- Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen está reprimido en el tejido del que deriva el tumor pero en cambio se expresa en éste. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.
- Los linfocitos T se pueden obtener por métodos conocidos en la materia, como, por ejemplo, los antes descritos.
- Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos y se pueden encontrar, por ejemplo, en (Rosenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1988; Dudley et al., 2002; Yee et al., 2002; Dudley et al., 2005); revisados en (Gattinoni et al., 2006) y (Morgan et al., 2006).
- Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, vector de expresión, célula, CTL activado, receptor de linfocito T o el ácido nucleico que lo codifique es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención puede ser utilizada como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede ser utilizada sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o con cualquier molécula o moléculas conocidas.
- Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma *i. d.*, *i. m.*, *s. c.*, *i. p.* e *i. v.*, o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser esencialmente puro o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o puede ser utilizado en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o ser administrado con un sistema de liberación adecuado como, por ejemplo, liposomas.
- El péptido también se puede conjugar con un portador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véanse WO WO95/18145 y Longenecker et al (1993)). El péptido también se puede etiquetar, o formar proteínas de fusión o moléculas híbridas, entre otros. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los CTL CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8, el compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos estimuladores de los CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.
- En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 15 y más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I y/o II.
- El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ACN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede consultar una revisión general, por ejemplo, en Pascolo S. 2006; Stan R. 2006, o A Mahdavi 2006. Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunales, retrovirus, herpesvirus, virus adenoasociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos

catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la "pistola génica", también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo, con un epítipo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

5 El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej., respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax[®], AS15, BCG, CP-870. 893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA[®]), ImuFact IMP321, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune[®], LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel[®], micropartículas de PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribi, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. . ej., MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Dupuis M et al 1998; Allison 1998). También se pueden usar citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej., el TNF- α), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras de antígeno de los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. n. ° 5. 849. 589) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej., la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos T_{H1} y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta T_{H1} provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta T_{H2} . Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg et al. 2006). La patente de EE. UU. n. ° 6. 406. 705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen, sin limitación, CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y AmpliGen, ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmuoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4 y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación. Los adyuvantes preferidos son dSLIM, interferones alfa o beta, CpG7909, IC31, ALDARA (Imiquimod), PeviTér, ARN, tadalafilo, temozolomida y JuvImmune.

55 La presente invención proporciona un medicamento útil para el tratamiento del cáncer cerebral. El cáncer puede ser no metastásico o metastásico, en particular puede ser un astrocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor neuroepitelial disembrionárico, oligodendrogliomas, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomas mixtos, oligoastrocitomas, meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma, teratoma, gangliogliomas, gangliocitoma, gangliocitoma central, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), meduloblastoma, meduloepitelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, ependimoblastoma, tumores del parénquima pineal, pineocitoma, pineoblastoma, tumores de células ependimales, tumores del plexo coroideo, tumores neuroepiteliales de origen incierto, gliomatosis cerebri, astroblastoma y glioblastoma.

Dado que los péptidos de la invención se han aislado del glioblastoma, el medicamento de la invención debe ser utilizado preferentemente para tratar el glioblastoma o el carcinoma adenoescamoso.

5 Se describe un equipo que comprende: (a) un envase que contiene una composición farmacéutica como la descrita arriba, en forma de solución o liofilizada; (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o una solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y (c) opcionalmente, instrucciones para (I) el uso de la solución o (II) reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada. El equipo puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (VII) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

10 Los equipos comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un envase adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej., viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el equipo y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar además que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

15 El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej., de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El equipo puede comprender además un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

20 Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

25 Los equipos descritos pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención acompañado o no de otros componentes (p. ej., otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

30 Preferiblemente, los equipos descritos incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej., GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénesis, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

35 El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente equipo.

40 La presente formulación puede ser toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

45 A continuación se describirá la presente invención con los ejemplos siguientes que muestran las formas de realización preferidas de la misma a título ilustrativo, sin que con ello se pretenda limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Identificación de péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentados en la superficie celular

Muestras de tejido

Las muestras de tejido sano y tumoral fueron facilitadas por el Hôpital Cantonal Universitaire de Genève (Oncología médica, Laboratorio de inmunología tumoral) y la Neurochirurgische Universitäts-Klinik Heidelberg (Laboratorio de biología molecular). Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk, K. , 1991; Seeger, F. H. T. , 1999) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7. 2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarsa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

Detección de los TUMAP mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ESI (ESI-LCMS)

Método uno:

Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente de ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 5 µm (Dionex). El solvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El solvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80%/agua. El pH de los dos solventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15% al 60% de B en 90 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema fraccionamiento. Para la introducción en la fuente de micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. A continuación se reveló la identidad de las secuencias peptídicas mediante espectrometría de masas (ESI-LCMS/MS) con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica.

Método dos:

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema Acquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente de micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo operar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia del TUMAP identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica. Las Figuras 1a y b muestran espectros de ejemplo de varios TUMAP asociados a MHC de clase I obtenidos de tejido tumoral.

Ejemplo 2

Perfiles de expresión de genes que codifican péptidos

No todos los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas MHC son adecuados para la inmunoterapia, porque la mayoría de ellos proceden de proteínas celulares normales que se expresan en multitud de tipos de células. Muy pocos de esos péptidos están asociados a tumores y probablemente sean capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual derivan. A fin de descubrirlos y de minimizar el riesgo de que la vacuna genere autoinmunidad los inventores se centraron en los péptidos derivados de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

El péptido ideal sería el derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que derivaban de genes dotados con un perfil de expresión similar al ideal los

péptidos identificados se asignaron a las proteínas y después a los genes originarios y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

Fuentes de ARN y preparación

- 5 Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por dos centros clínicos (véase Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y después se purificaron con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 10 El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Ámsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, CA, EE. UU.). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. Cuatro voluntarios sanos donaron sangre de la que se extrajeron los leucocitos.
- 15 La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico Lab Chip Kit (Agilent)

Experimentos con micromatrices

- 20 El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix (http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx). En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A
- 25 y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes preprogramados en todos los parámetros. Para la normalización
- 30 se utilizaron 100 genes constitutivos (*Housekeeping*) suministrados por Affymetrix (http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx). Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de la señal dados por el software y la muestra normal se ajustó de forma arbitraria en 1,0.

- 35 El perfil de expresión del gen del que derivan todos los péptidos (PTPRZ1) muestra una elevada expresión en el tejido tumoral del glioblastoma, mientras que el gen no se expresa o lo hace muy poco en los tejidos normales (Fig. 2).

Ejemplo 3

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I

Sensibilización *in vitro* de los linfocitos T CD8+

- 40 Para llevar a cabo las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con un complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, los inventores aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocíticas HLA-A*02+ frescas por medio de un medio de separación en gradiente de densidad ordinario (PAA, Cölbe, Alemania). Las capas leucocíticas procedían del Katharinenhospital de Stuttgart. Las PBMC aisladas se incubaron hasta el día siguiente con medio para linfocitos T (TCM) para la sensibilización humana *in vitro*. El medio consistía en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con suero
- 45 AB humano termoinactivado al 10% (PAA, Cölbe, Alemania), penicilina 100 U/ml/estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Verviers, Bélgica), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Neustadt, Alemania) y gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Los linfocitos CD8+ se aislaron con un kit de selección positiva MACS para CD8+ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8+ obtenidos se incubaron hasta su uso en TCM suplementado con IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Chiron, Munich, Alemania). La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros (Walter et al., 2003) con pequeñas modificaciones. En suma, con el método descrito por (Altman et al., 1996) se sintetizaron moléculas recombinantes y biotiniladas de HLA-A*0201 desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada. El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humana (Jung et al., 1987) se biotiniló
- 55 químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,60 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los complejos pMHC usados como controles positivo y

negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 modificado) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800.000 microperlas/200 μ l en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng de pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad) o de 2 ng del relevante más 200 ng de MHC irrelevante (genoteca de pMHC) (microperlas de baja densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 microperlas recubiertas y lavadas en 200 μ l de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, se llevarán a cabo análisis tetraméricos de los tetrámeros de MHC fluorescentes (producidos del modo descrito por (Altman et al., 1996) más anticuerpo CD8-FITC del clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) en un citómetro LSR II FACSCalibur (BD). Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis tetramérico se hizo con el programa FCS Express (De Novo Software). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ tetrámero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetrámero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetrámero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

En la Figura 3 se expone una tinción representativa que muestra la generación de estirpes de linfocitos T específicas para PTP-002 y PTP-001. Los resultados también se resumen a continuación en la tabla 3, junto con un resultado similar para la CHI-001.

Tabla 3: Inmunogenicidad *in vitro* de péptidos, PTP-003 es de la invención

Antígeno	Inmunogenicidad detectada	Donantes positivos / donantes analizados	Pocillos positivos / pocillos analizados
PTP-001	sí	6 / 6 (100%)	33 / 96 (34%)
PTP-002	sí	3 / 4 (50%)	9 / 48 (17%)
PTP-003	sí	2 / 4 (50%)	8 / 48 (17%)
PTP-004	sí	2 / 4 (50%)	2 / 48 (4%)
PTP-005	sí	4 / 4 (100%)	24 / 48 (50%)
CHI-001	sí	4 / 4 (100%)	39 / 62 (63%)

Aquí se resumen los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por los inventores y por el solicitante *immatics*, que muestran el porcentaje de donantes analizados y de pocillos que han resultado positivos. Los resultados mostrados han sido obtenidos con la estimulación de linfocitos CD8+ con microperlas de alta densidad. La variabilidad de los lotes de suero humano puede influir mucho en los resultados de las pruebas de inmunogenicidad, por lo que solo se evaluaron los ensayos en que se usó un único lote de suero.

30 Ejemplo 4

Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I a HLA-A*0201

El objetivo del análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos de HLA de clase I PTP-001, PTP-002, PTP-003, PTP-004 y PTP-005 hacia la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A*0201. Las afinidades de todos los péptidos hacia HLA-A*0201 resultaron comparables con las del consabido péptido control HBV-001, situándose las constantes de disociación (K_D) en el intervalo de 0,02 a 1,6 nM.

Principio de la prueba

Los complejos estables de HLA/péptido constan de tres moléculas: cadena pesada de HLA, beta-2 microglobulina (b2m) y el ligando peptídico. La actividad de las moléculas de cadena pesada recombinantes y desnaturalizadas del HLA-A*0201 solas se puede conservar convirtiéndolas en equivalentes funcionales de «moléculas HLA-A*0201 vacías». Cuando se diluyen en un tampón acuoso que contiene b2m y un péptido adecuado, estas moléculas se pliegan con rapidez y con eficacia de un modo que depende totalmente del péptido. La disponibilidad de estas moléculas se utiliza en un ensayo ELISA para medir la afinidad de la interacción entre el péptido y la molécula HLA de clase I (Sylvester-Hvid et al., 2002).

Moléculas recombinantes y purificadas de HLA-A*0201 se incubaron con b2m y dosis escalonadas del péptido de interés. La cantidad de complejos de HLA plegados de novo/péptido se determinó con un ELISA cuantitativo. Las constantes de disociación (valores K_D) se calcularon con una curva patrón trazada con disoluciones de un complejo HLA/péptido de calibración.

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 4. Cuanto más bajo es el valor de K_D mayor es la afinidad hacia el HLA-A*0201. Las afinidades de todos los péptidos hacia HLA-A*0201 resultaron comparables con las del consabido péptido control HBV-001, situándose las constantes de disociación (K_D) en el intervalo de 0,02 a 1,6 nM.

Lista de referencias citadas

- Allison AC 1998; The mode of action of immunological adjuvants; *Dev Biol Stand.*; 92:3-11
- 10 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, Heyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
- Appay V, Speiser DE, Rufer N, Reynard S, Barbey C, Cerottini JC, Leyvraz S, Pinilla C, Romero P (2006). Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide. *Eur. J Immunol.* 36, 1805-1814.
- 15 Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K, Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995). Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 52-54.
- Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, Honegger AM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K, . (1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* 13, 1497-1506.
- 20 Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM (1998). Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice. *Int. Immunol.* 10, 1765-1776.
- 25 Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F.(2004) From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future *Curr Pharm Biotechnol.* Feb; 5(1):29-43
- Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G (2006); Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; *Cancer Immunol Immunother.*; 55(12):1553-1564
- 30 Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol* 1, 459-468.
- CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006. Ref Type: Internet Communication
- Cheever MA, Chen W, Disis ML, Takahashi M, Peace DJ (1993). T-cell immunity to oncogenic proteins including mutated ras and chimeric bcr-abl. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 690, 101-112.
- 35 Colombetti S, Basso V, Mueller DL, Mondino A (2006). Prolonged TCR/CD28 engagement drives IL-2-independent T cell clonal expansion through signaling mediated by the mammalian target of rapamycin. *J Immunol.* 176, 2730-2738.
- Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- 40 Dazzi C, Cariello A, Giannini M, Del DM, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De GU, Marangolo M (2000). A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.
- Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic S (2006). Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 12, 4163-4170.
- 45 Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE,
- 50

- Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- 5 Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 23, 2346-2357.
- Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM (1998); Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; *Cell Immunol.*; 186(1):18-27
- 10 Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. & Rammensee, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296 (1991)
- Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG (2001a). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J. Immunol.* 166, 4254-4259.
- 15 Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001b). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8809-8814.
- Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996 (6):414-418
- 20 Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964.
- Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393.
- 25 Gebbink MF, van E, I, Hateboer G, Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA, Moolenaar WH (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.* 290, 123-130.
- Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2003). Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8862-8867.
- 30 Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp. Med* 181, 1847-1855.
- Hanada K, Yewdell JW, Yang JC (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.
- 35 Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002). A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* 32, 411-414.
- Heimberger AB, Hussain SF, Aldape K, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, Sampson JH. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529. 6-20-2006.
- Hill et al (1995) *J. Exp. Med.* 181, 2221-2228
- Jerome et al (1993) *J. Immunol.* 151, 1654-1662
- 45 Jochmus et al (1997) *J. Gen. Virol.* 78, 1689-1695
- Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.
- Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7000-7004.
- 50

- Karre and Ljunggren (1985) *J. Exp. Med.* 162, 1745
- Kawakami et al (1992) *J. Immunol.* 148, 638-643
- Kennedy RC, Shearer MH, Watts AM, Bright RK (2003). CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 63, 1040-1045.
- 5 Kobayashi H, Omiya R, Ruiz M, Huarte E, Sarobe P, Lasarte JJ, Herraiz M, Sangro B, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Celis E (2002). Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 8, 3219-3225.
- Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation 2006, *Nature Reviews, Drug Discovery*, 5, JUNE, 471-484
- 10 Krueger NX, Streuli M, Saito H (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 9, 3241-3252.
- Lemmel C, Weik S, Eberle U, Dengjel J, Kratt T, Becker HD, Rammensee HG, Stevanovic S (2004). Differential quantitative analysis of MHC ligands by mass spectrometry using stable isotope labeling. *Nat. Biotechnol.* 22, 450-454.
- 15 Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, . (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol. Chem.* 268, 10573-10581.
- Longenecker et al (1993) *Ann. NY Acad. Sci.* 690,276-291
- Lu et al (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433
- 20 Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J, Dia EQ, Yoshimoto K, Wang MY, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS (2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem.* 280, 26953-26964.
- Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.
- Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996). Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 301-331.
- 25 A Mahdavi and BJ Monk Recent advances in human papillomavirus vaccines *Curr Oncol Rep* 2006, 6, 465-472.
- Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A (1994). Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands. *J Immunol.* 153, 1141-1149.
- 30 Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP (1999). Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp. Med* 189, 871-876.
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science.*
- 35 Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C, Gorman P, Sasieni P, Adams J, Jones TA, Babbage JW, Vatcheva R, Ichimura K, East P, Poulikas C, Collins VP, Carter NP, Tomlinson IP, Sheer D (2006). Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle* 5, 783-791.
- Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. (1984) The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity *EMBO J.* 3 (4), 869-872.
- 40 Napolitano M, Keime-Guibert F, Monjour A, Lafitte C, Ameri A, Cornu P, Broet P, Delattre JY (1999). Treatment of supratentorial glioblastoma multiforme with radiotherapy and a combination of BCNU and tamoxifen: a phase II study. *J Neurooncol.* 45, 229-235.
- 45 Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.
- Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 187-207.

- Pascolo S. 2006: Vaccination with messenger RNA *Methods Mol Med*, 127; 23-40
- Peoples et al (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92,432-436
- 5 Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O, Menendez-Rodriguez P, Mortimer J, Chang Y, Astudillo A, Deuel TF (2007). The receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP)beta/zeta is expressed in different subtypes of human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 5-10.
- Plebanski et al (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 1783-1787
- Porta et al (1994) *Virology* 202, 449-955
- Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol* 27, 1-10.
- 10 Qin Z, Blankenstein T (2000). CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 12, 677-686.
- Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T (2003). A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res.* 63, 4095-4100.
- 15 Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- 20 Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ (2006); Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provence) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; *Cancer.*; 107(1):67-74)
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, . (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 316, 889-897.
- 25 Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, . (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J Med* 319, 1676-1680.
- Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 481-506.
- 30 Sablotzki A, Ebel H, Muhling J, Dehne MG, Nopens H, Giesselmann H, Hempelmann G (2000). Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 82-87.
- Saiki et al (1988) *Science* 239,487-491
- 35 Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM. (2006); Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; *J Clin Oncol.*; 24(19):3089-3094
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- 40 Seeger,F.H. et al. 1999 The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49, 571-576.
- Shedlock DJ, Shen H (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- 45 Singh-Jasuja H, Emmerich NP, Rammensee HG (2004). The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 187-195.
- M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief (2008); An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, ASCO meeting 2007; Abstract No 3017

- R. Stan, JD Wolchok and AD Cohen DNA vaccines against cancer *Hematol Oncol Clin North Am* 2006, 3; 613-636
- Sun JC, Bevan MJ (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.
- 5 Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferre H, Lauemoller SL, Wolf XA, Lamberth K, Nissen MH, Pedersen LO, Buus S (2002). Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction. *Tissue Antigens* 59, 251-258.
- Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE (1993). A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins. *J Immunol. Methods* 163, 209-216.
- 10 van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den EB, Knuth A, Boon T (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
- Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der BP, Boon T, Van Den Eynde BJ (2004). An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 304, 587-590.
- 15 Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R (1994). Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol.* 153, 1665-1673.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.
- 20 Wang JC, Livingstone AM (2003). Cutting edge: CD4+ T cell help can be essential for primary CD8+ T cell responses in vivo. *J Immunol.* 171, 6339-6343.
- Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R (2005). Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65, 3299-3306.
- 25 Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, Obermayr F, Walter S, Schoor O, Kurek R, Loeser W, Bichler KH, Wernet D, Stevanovic S, Rammensee HG (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62, 5818-5827.
- Wu CW, !Lost Data, Li AF, Chi CW, Lin WC (2006). Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer Lett.* 242, 95-103.
- 30 Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16168-16173.
- 35 Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J (1997). Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 57, 4570-4577.
- Zeh HJ, III, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC (1999). High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol.* 162, 989-994.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Nueva inmunoterapia contra tumores neuronales y cerebrales

<130> FB22516

5 <160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Thr Thr Leu Met His Gln Leu
1 5

<210> 2

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Leu Tyr Lys Val Ile Leu Ser Leu
1 5

<210> 3

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ile Ile Asp Gly Val Glu Ser Val
1 5

25 <210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Leu Pro Asp Thr Asp Gly Leu
1 5

30 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 5

Lys Val Phe Ala Gly Ile Pro Thr Val
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 543 815 T3

Gln Gln Ser Asp Tyr Ser Ala Ala Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 7

Thr Gln Asp Asp Tyr Val Leu Glu Val
1 5

<210> 8
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Thr Gln Asp Asp Tyr Val Leu Glu Val
1 5

<210> 9
15 <211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

Ser Val Phe Gly Asp Asp Asn Lys Ala Leu Ser Lys
1 5 10

<210> 10
20 <211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Glu Ile Gly Trp Ser Tyr Thr Gly Ala Leu Asn Gln Lys Asn
25 1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 11

Ser Leu Trp Ala Gly Val Val Val Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Péptido seleccionado del grupo siguiente
 - a) Péptido consistente en la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID N.º 3, y
 - b) Péptido acorde con a), en el que uno o dos de los residuos de aminoácidos están alterados de modo que
 - el aminoácido A de la posición 1 es sustituido por I, L, F, K, M, Y o V,
 - el aminoácido I de la posición 2 es sustituido por M, o L,
 - el aminoácido I de la posición 3 es sustituido por A, Y, F, P, M, S o R,
 - el aminoácido D de la posición 4 es sustituido por E, G, P o T,
 - el aminoácido G de la posición 5 es sustituido por I, K, Y, N, F o V,
 - el aminoácido V de la posición 6 es sustituido por I, L o T,
 - el aminoácido E de la posición 7 es sustituido por A, Y o H,
 - el aminoácido S de la posición 8 es sustituido por K o E, y
 - el aminoácido V de la posición 9 es sustituido por L,
 en que dicho péptido mantiene la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I, y en que dicho péptido es capaz de estimular los linfocitos T CD8.
2. Péptido conforme a la reivindicación 1, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos entre aminoácidos del mismo.
3. Péptido acorde con la reivindicación 1 o 2, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.
4. Ácido nucleico, que codifica un péptido de conformidad con las reivindicaciones 1 a 3, o un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico.
5. Péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 4 para la utilización en medicina.
6. Célula hospedadora que no es una célula madre embrionaria humana, que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión de conformidad con la reivindicación 4.
7. La célula hospedadora acorde con la reivindicación 6, en dicha célula hospedadora es una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno.
8. Método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, el cual comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno o un constructo artificial que imite a una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno un péptido conforme a la reivindicación 1.
9. Péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 4, o la célula acorde con la reivindicación 6 o 7 para el uso en el tratamiento del cáncer cerebral.
10. Vacuna que comprende el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para el uso en el tratamiento del cáncer cerebral.
11. La vacuna acorde con la reivindicación 10 para el uso acorde con la reivindicación 10, en que dicho cáncer se selecciona entre astrocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor neuroepitelial disembrionario, oligodendrogliomas, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomas mixtos, oligoastrocitomas, meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma, teratoma, gangliogliomas, gangliocitoma, gangliocitoma central, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), meduloblastoma, meduloepitelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, ependimoblastoma, tumores del parénquima pineal, pineocitoma, pineoblastoma, tumores de células ependimales, tumores del plexo coroideo, tumores neuroepiteliales de origen incierto, gliomatosis cerebri, astroblastoma y glioblastoma.
12. Uso de un péptido acorde con la reivindicación 1 o 2 para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra el complejo MHC/péptido.

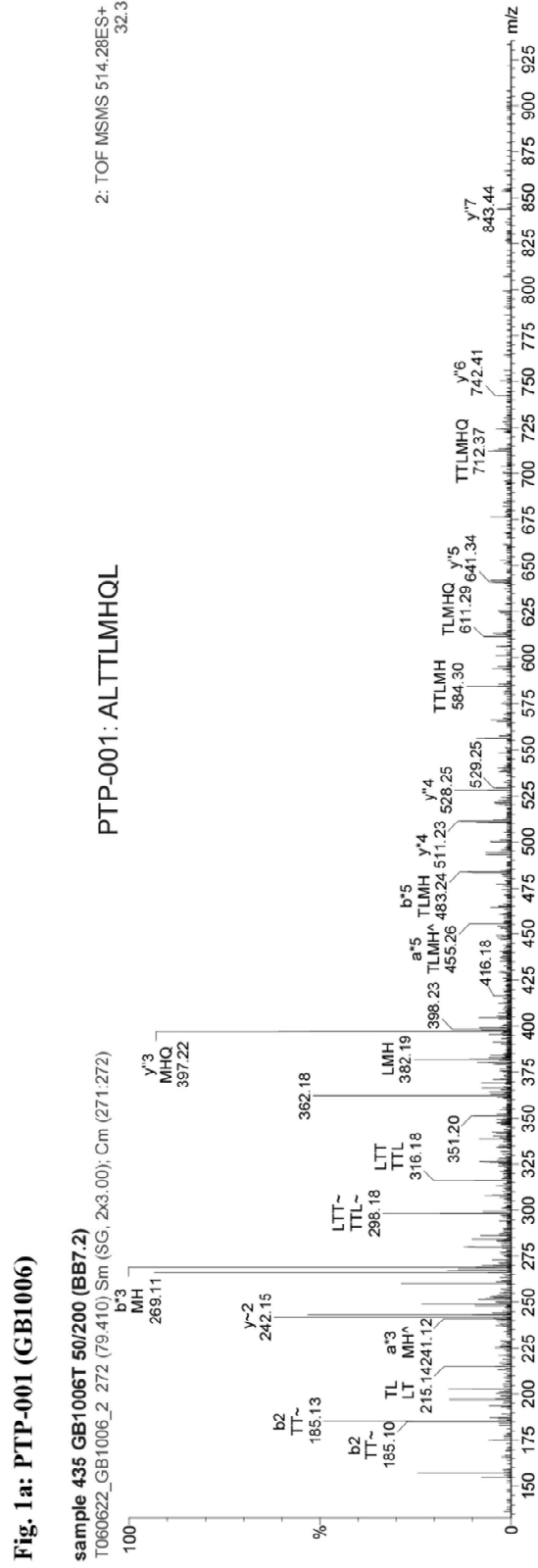


Fig. 1b: PTP-002 (GB6003)

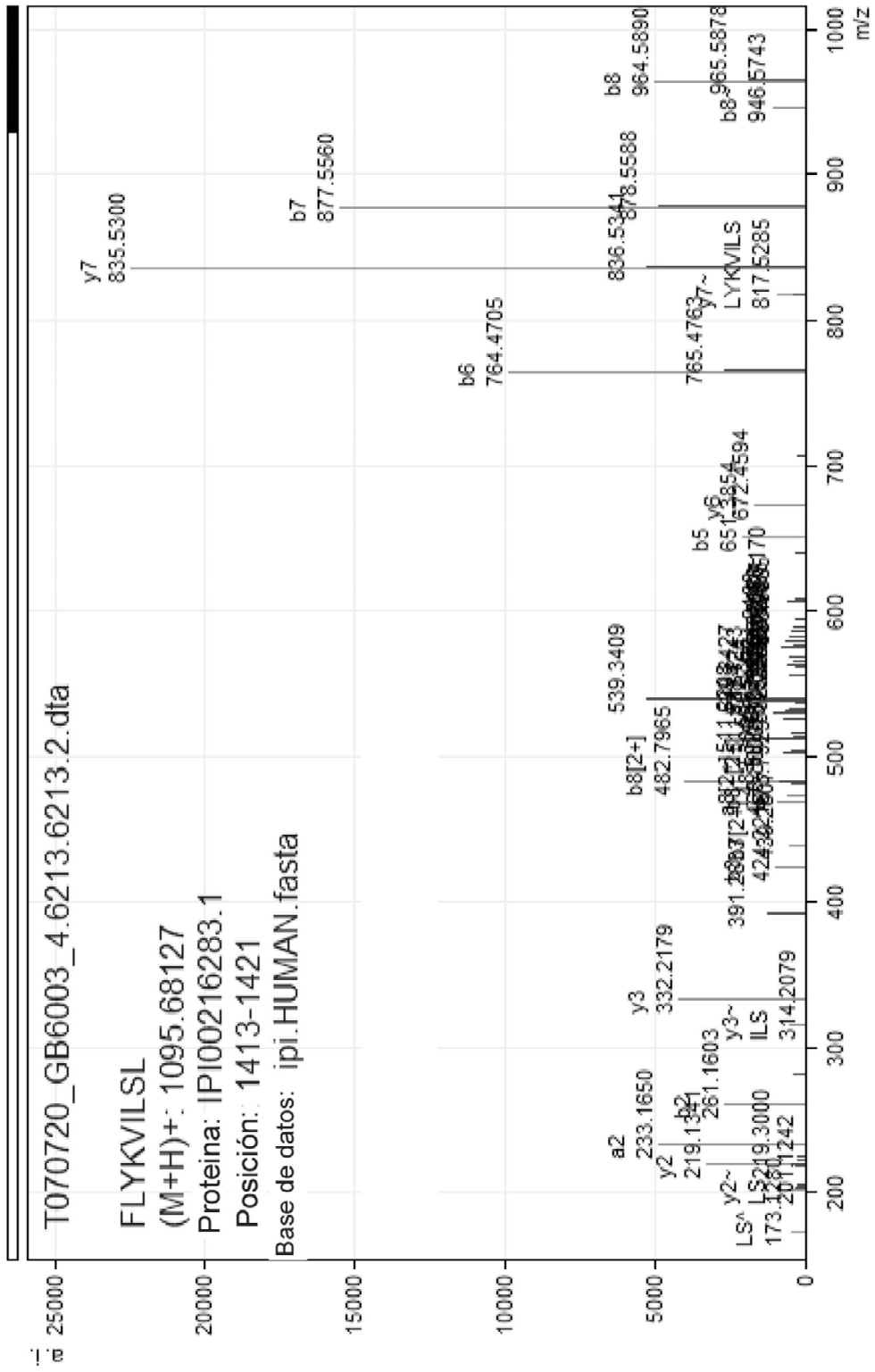


Fig. 2: Perfil de expresión del ARNm de PTPRZ1

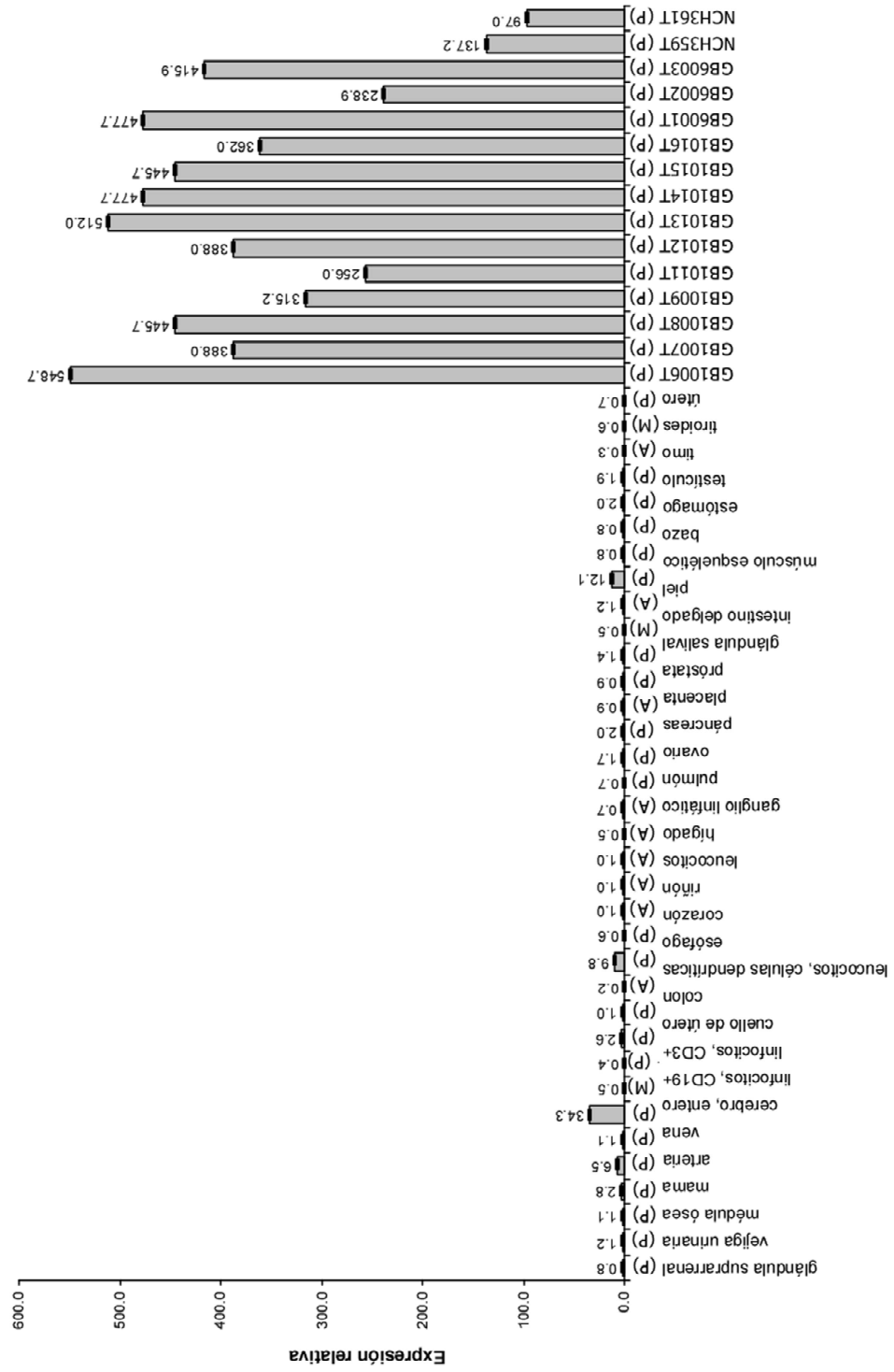


Fig. 3

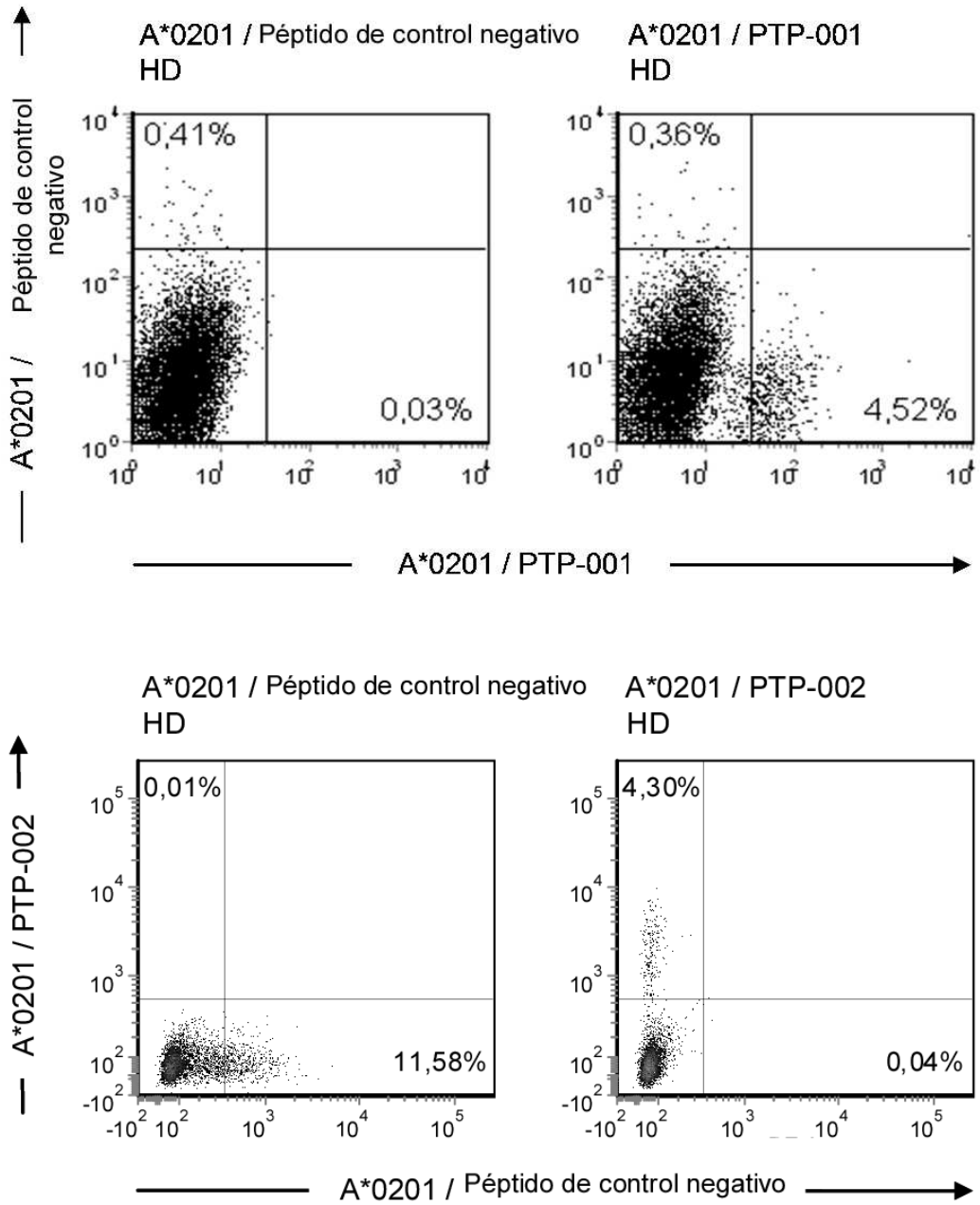


Figura 4

