

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 088**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 09745570 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2291395**

54 Título: **Nuevos y potentes péptidos del MHC de clase II derivados de la survivina**

30 Prioridad:

14.05.2008 EP 08008944

14.05.2008 US 53182 P

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

22.10.2015

73 Titular/es:

IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)

Paul-Ehrlich-Strasse 15

72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:

STEVANOVIC, STEFAN;

GOUTTEFANGES, CÉCILE;

RAMMENSEE, HANS-GEORG;

WEINSCHENK, TONI y

LEWANDROWSKI, PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 549 088 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

Nuevos y potentes péptidos del MHC de clase II derivados de la survivina.

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 y derivados de la survivina, 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 específicamente a una nueva secuencia peptídica derivada de moléculas HLA de clase II de células tumorales humanas que puede ser utilizada en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales.

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 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 mortalidad causada por este tumor cerebral es muy alta: la esperanza de vida media se sitúa entre 9 y 12 meses desde el diagnóstico. La supervivencia a 5 años durante el periodo de observación comprendido entre 1986 y 1990 fue del 8,0%. Hasta la fecha, la supervivencia a cinco años después del tratamiento radical 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 en el tratamiento del glioblastoma los obtuvo Northwest Therapeutics con «DCVax Brain» 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).

Carcinoma colorrectal

Según la Sociedad Americana contra el Cáncer (*American Cancer Society*), el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más habitual en Estados Unidos puesto que afecta a más de 175.000 nuevos pacientes cada año. En Estados Unidos, Japón, Francia, Alemania, Italia, España y Reino Unido el número de pacientes afectados supera los 480.000. Ello lo convierte en una de las principales causas de muerte por cáncer en los países industrializados. La supervivencia relativa a 1 y 5 años de los enfermos de cáncer colorrectal asciende al 84% y el 64%. Pasados los cinco años, la supervivencia sigue descendiendo hasta el 57% al cabo de diez años del diagnóstico. Cuando el cáncer colorrectal se detecta en un estadio inicial y localizado la supervivencia a 5 años es del 90%, pero sólo el 39% de los casos se detectan en ese estadio, principalmente por el escaso alcance de los programas de detección sistemática. Cuando el cáncer alcanza dimensiones regionales y afecta ya a órganos adyacentes o ganglios linfáticos la supervivencia a 5 años disminuye hasta el 68%. Y en el caso de las personas con metástasis a distancia la supervivencia a 5 años vista se reduce al 10%.

Las investigaciones sugieren que el cáncer colorrectal tiene su origen en la interacción entre factores hereditarios y ambientales. En la mayor parte de los casos los pólipos adenomatosos parecen ser los precursores de los tumores colorrectales, aunque el proceso de transición puede durar muchos años. El principal factor de riesgo del cáncer colorrectal es la edad, ya que el 90% de los casos se diagnostican a partir de los 50 años. Otros factores de riesgo referidos por la *American Cancer Society* son el consumo de alcohol, la alimentación rica en grasas o carnes rojas y una ingesta insuficiente de frutas y verduras. La incidencia sigue aumentando especialmente en zonas como Japón, donde como posibles causas se barajan la adopción de la alimentación de estilo occidental, con la ingesta excesiva de grasas y carne y la reducción del consumo de fibra. Con todo, la incidencia no aumenta al mismo ritmo que en el pasado, lo cual se atribuye al aumento de las exploraciones preventivas y a la extirpación de los pólipos que de lo contrario se habrían convertido en tumores malignos.

A semejanza de la mayoría de los tumores sólidos el tratamiento de primera línea consiste en cirugía, aunque sus ventajas siguen estando limitadas a los pacientes en fase inicial y una parte importante de los casos se diagnostica cuando la enfermedad ya se encuentra en fases avanzadas. El tratamiento de referencia contra el cáncer colorrectal avanzado consiste en regímenes de quimioterapia basados en el fluorouracilo. Los protocolos denominados FOLFOX (leucovorina/5-FU más oxaliplatino en infusión) y FOLFIRI (irinotecán y leucovorina en bolo y 5-FU en infusión continua) constituyen la mayor parte de tales regímenes.

La introducción de los citotóxicos de tercera generación como el irinotecán y el oxaliplatino ha renovado las esperanzas de lograr mayor eficacia, pero el pronóstico sigue siendo relativamente malo y el índice de supervivencia suele rondar generalmente los 20 meses cuando la enfermedad es metastásica. Por tanto, sigue existiendo una importante necesidad de mejorar los resultados contra la enfermedad.

Recientemente ha aparecido una nueva generación de medicamentos, agentes dirigidos contra moléculas, como por ejemplo Avastin (bevacizumab) y Erbitux (cetuximab), y cerca de 40 compuestos contra diferentes estadios del cáncer colorrectal se hallan en las últimas etapas de desarrollo clínico. Las combinaciones de varios de estos compuestos aumentan las posibles opciones de tratamiento que cabe esperar en el futuro. La gran mayoría de las sustancias se encuentran en la fase II de desarrollo clínico, siendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) la diana de la mayor parte de ellos, puesto que alrededor del 80% de los pacientes afectados por el cáncer colorrectal presentan regulada al alza la expresión de dicho receptor.

En la actualidad se están efectuando ensayos clínicos con pacientes en estadio II que combinan la quimioterapia con los anticuerpos monoclonales (AcM) recientemente autorizados (cetuximab + irinotecán o FOLFOX4; bevacizumab en monoterapia o con FOLFOX4). Se prevén periodos de observación de tres o cuatro años para disponer de resultados estadísticamente significativos de dichos ensayos.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) que actualmente se utilizan en oncología ofrecen en general buenas garantías de no interferir con la inmunoterapia activa. De hecho, existen datos preclínicos y clínicos (GABRILOVICH 1999) que apuntan a que la disminución del VEGF (lograda por el bevacizumab) contribuye de forma positiva a la activación de los linfocitos T por parte de las células dendríticas (Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, Nixon AB, Lyerly HK, Clay T, Morse MA. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. 2008 Jan 10.).

Carcinoma de próstata y otros tumores

Con una cifra estimada de 27.050 fallecimientos en 2007, el cáncer de próstata es la principal causa de muerte por cáncer en varones. Aunque los índices de deceso se han reducido entre la población blanca y afroamericana desde

principios de los 90, el nivel registrado entre los varones afroamericanos duplica con creces el de los hombres de raza blanca. El cáncer de próstata es el más diagnosticado en los varones. Por motivos que siguen sin estar claros, la incidencia es significativamente mayor entre los varones afroamericanos que entre los de raza blanca. La incidencia del cáncer de próstata ha cambiado notablemente durante los últimos 20 años: experimentó un rápido incremento entre 1988 y 1992 para reducirse drásticamente entre 1992 y 1995 y volvió a repuntar ligeramente desde 1995. Estas tendencias reflejan en gran parte el aumento de los programas de detección del cáncer de próstata mediante el análisis sanguíneo del antígeno específico de la próstata (PSA). El moderado incremento de la incidencia acaecido durante la última década probablemente pueda atribuirse a la generalización del reconocimiento preventivo del PSA entre los varones menores de 65 años. La incidencia del cáncer de próstata se ha estabilizado entre los mayores de 65 años. Los índices marcaron su máximo entre los hombres de raza blanca en 1992 (237,6 por cada 100.000 varones) y en 1993 entre los varones afroamericanos (342,8 por cada 100.000 varones).

El tratamiento del cáncer de próstata puede implicar la espera en observación, cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, hormonoterapia o cierta combinación de los anteriores. La mejor opción depende de la fase de la enfermedad, de la escala Gleason y del nivel de PSA. Otros factores importantes incluyen la edad del varón, el estado general de salud y su actitud frente a los posibles tratamientos y los posibles efectos secundarios. Puesto que todos los tratamientos pueden provocar importantes efectos secundarios, como por ejemplo disfunción eréctil e incontinencia urinaria, los debates sobre dichos tratamientos suelen centrarse en equilibrar los objetivos de la terapia y las posibles alteraciones en el estilo de vida.

Cuando el cáncer se ha extendido fuera de la glándula prostática, las opciones de tratamiento cambian significativamente, por lo que la mayor parte de los médicos que tratan el cáncer de próstata utiliza una serie de nomogramas para pronosticar la probabilidad de la propagación. Los tratamientos consistentes en la espera en observación, HIFU, radioterapia, criocirugía y cirugía suelen ofrecerse a los varones cuyo cáncer permanece confinado en la próstata. La terapia hormonal y la quimioterapia suelen reservarse para los casos en que la enfermedad se ha extendido fuera de la próstata, aunque hay excepciones: la radioterapia puede utilizarse para algunos tumores avanzados y la terapia hormonal se emplea para algunos tumores en fase inicial. La crioterapia, la terapia hormonal y la quimioterapia también pueden ofrecerse si el tratamiento inicial falla y el cáncer avanza.

En un número importante de pacientes con carcinoma de próstata que son sometidos a prostatectomía radical por la sospecha clínica de que el crecimiento sigue limitado al órgano, el análisis histológico confirmatorio de la preparación quirúrgica revela que el tumor está extendido a nivel local y se propaga fuera de los límites del órgano. Estos pacientes presentan un elevado riesgo de recidiva local precoz, normalmente detectable por un incremento de los niveles de PSA que se traduce en una recaída bioquímica. Las opciones terapéuticas en esta situación incluyen la radioterapia externa y la ablación hormonal. No obstante, el valor de estos enfoques terapéuticos, especialmente en lo que concierne a prolongar la supervivencia del paciente a largo plazo, no deben considerarse como probados. Además, deben tenerse en cuenta posibles complicaciones asociadas con el tratamiento, como, por ejemplo, el desarrollo de estenosis uretral (radioterapia), la pérdida de libido y la impotencia, el riesgo de reducción de las sales cálcicas del esqueleto que puede acarrear o agravar la osteoporosis y el notable incremento del riesgo de fracturas óseas patológicas (ablación hormonal).

Más del 90% de los casos de cáncer de próstata se descubren en los estadios local y regional. El índice de supervivencia relativa a 5 años de los pacientes diagnosticados en dichos estadios se aproxima al 100%. Durante los últimos 25 años, el índice de supervivencia a 5 años de todos los estadios combinados ha pasado del 69% a casi el 90%. Según los datos más recientes, la supervivencia relativa a 10 años es del 93%, mientras que a los 15 años es del 77%. Las espectaculares mejoras de la supervivencia, especialmente a 5 años, son atribuibles en parte a la mayor precocidad de los diagnósticos y a las mejoras del tratamiento. Con todo, la supervivencia desciende notablemente cuando el cáncer se ha extendido a otros tejidos y órganos.

Cáncer de pulmón

Se calcula que en 2007 se diagnosticarán 210.000 nuevos casos en Estados Unidos, cifra que supone en torno al 15% de los diagnósticos de cáncer. La incidencia está cayendo notablemente entre los hombres, desde un máximo de 102 casos por cada 100.000 varones en 1984 hasta 78,5 en 2003. En las mujeres está estabilizándose tras un largo período de incremento. Clínicamente el cáncer de pulmón se divide, a efectos de tratamiento, en dos grupos: el carcinoma microcítico de pulmón (13%) y el no microcítico (87%).

El cáncer de pulmón aúna la mayor parte de fallecimientos relacionados con el cáncer, tanto en hombres como en mujeres. Se estima que en 2007 se producirán 160.390 fallecimientos, que representan alrededor del 29% del total de muertes por cáncer. Desde 1987, cada año han fallecido más mujeres a causa del cáncer de pulmón que del cáncer de mama. La tasa de mortalidad en la población masculina ha seguido cayendo notablemente entre 1991 y 2003, a un ritmo aproximado del 1,9% por año. La mortalidad por cáncer de pulmón entre las mujeres está estabilizándose, tras haber experimentado un aumento incesante durante varias décadas. Estas tendencias en la mortalidad por cáncer de pulmón reflejan el descenso del tabaquismo durante los últimos 30 años.

Las opciones de tratamiento vienen determinadas por el tipo (microcítico o no) y la fase del cáncer, e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias biológicas dirigidas, como bevacizumab (Avastin®) y erlotinib (Tarceva®). La cirugía suele ser el tratamiento de elección para los cánceres localizados. Algunos estudios recientes

5 indican que la tasa de supervivencia del cáncer de pulmón no microcítico en fase inicial mejora si se aplica quimioterapia tras la cirugía. Como la enfermedad acostumbra a estar extendida cuando se descubre, suele recurrirse a la radioterapia y la quimioterapia, a veces en combinación con la cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento elegido habitualmente para el carcinoma microcítico de pulmón. Con este régimen un alto porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es duradera.

10 El índice de supervivencia relativa para el cáncer de pulmón después de 1 año se ha incrementado ligeramente desde el 37% en 1975-1979 hasta el 42% en 2002, en gran medida gracias a las mejoras en las técnicas quirúrgicas y las terapias combinadas. No obstante, el índice combinado de supervivencia a 5 años para todos los estadios es tan solo del 16%. El índice de supervivencia es del 49% en los casos que son detectados cuando la enfermedad aún está localizada. Pero solo el 16% de los cánceres de pulmón se diagnostica en este estadio inicial.

Tabla 1: Estimación de los nuevos casos de cáncer y fallecimientos según el sexo en Estados Unidos en 2007 (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures, 2007. Atlanta: American Cancer Society, 2007.) Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.)

Localización	Estimación de nuevos casos			Estimación de fallecimientos		
	Ambos sexos	Varones	Mujeres	Ambos sexos	Varones	Mujeres
Glioma y cerebro	20.500	11.170	9.330	12.740	7.150	5.590
Mama	180.510	2. 030	178.480	40.910	450	40.460
Próstata	218.890	218 890		27.050	27.050	
Esófago	15.560	12.130	3.430	13.940	10.900	3.040
Colon	112.340	55.290	57050	52180	26000	26180
Riñón	51.190	31.590	19.600	12.890	8.080	4.810
Páncreas	37.170	18.830	18.340	33.370	16.840	16.530
Carcinomas epidermoides; neoplasias queratinocíticas de la piel	1.000.000	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos
Leucemia	44.240	24.800	19.440	21.790	12.320	9.470
Pulmón	213.380	114. 760	98.620	160.390	89.510	70.880
Linfoma no hodgkiniano	63.190	34.210	28.990	18. 660	9.600	9.060
Ovarios	22.430		22. 430	15.280		15.280
Melanoma	59.940	33.910	26.030	8.110	5.220	2.890

15 Así pues, sigue existiendo necesidad de nuevas opciones de tratamiento eficaz y seguro para el glioblastoma, tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, carcinoma de células claras de células renales, cáncer de pulmón, cáncer del SNC, cáncer de ovario, melanoma (Tamm et al. 1998), cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia y meduloblastoma, así como para otros tumores que muestran una sobreexpresión de survivina, de forma que se mejore el bienestar de los pacientes sin utilizar quimioterapia u otros fármacos que
 20 puedan provocar efectos secundarios graves.

Resumen de la invención

En un primer aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un péptido que consta de la SEC ID N.º3.

En un segundo aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un ácido nucleico, que codifica un péptido conforme a la presente invención o a un vector de expresión capaz de expresar dicho ácido nucleico.

25 En un tercer aspecto de la misma, la presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la presente invención, en que dicha célula hospedadora es preferiblemente una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o una célula presentadora de antígeno.

En un cuarto aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un 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 presente invención.

5 La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, a un ácido nucleico o a un vector de expresión acorde con la presente invención, la célula acorde con la presente invención, o un linfocito T citotóxico activado producido conforme a la presente invención como un medicamento destinado al tratamiento del cáncer, en que dicho medicamento preferiblemente es una vacuna. Preferiblemente, dicho cáncer es seleccionado del grupo consistente en 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, p. ej., meduloblastoma, meduloepitelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, ependimoblastoma), tumores del parénquima pineal (p. ej., pineocitoma, pineoblastoma), tumores de células ependimarias, tumores del plexo coroideo, tumores neuroepiteliales de origen incierto (p. ej., gliomatosis cerebral, astroblastoma), glioblastoma, tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, cáncer de pulmón, cáncer del SNC, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia y meduloblastoma, así como otros tumores o cánceres que muestran una sobreexpresión de survivina.

10 La presente invención se refiere, además, a un equipo, que comprende: (a) un envase que contiene una composición farmacéutica que contiene un péptido acorde con la presente invención, el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la presente invención, una célula acorde con la presente invención, o un linfocito T citotóxico activado acorde con la presente invención, en forma de solución o liofilizado; (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada; (c) opcionalmente, al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en los péptidos acordes con las SEC ID N.º 4 a 24; y (d) opcionalmente, instrucciones de uso para la solución y/o la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

15 La presente invención se refiere, además, a un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA conforme a la SEC ID N.º 3, en el que el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo quimérico.

20 WO 2007/039192, WO 2004/022709, WO 2004/067023, Piesche et al. (Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. Hum Immunol. 2007 Jul; 68(7):572-6), y Schmitz et al. (Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. Cancer Res. 2000 Sep 1;60 (17):4845-9) dan a conocer péptidos derivados de la survivina que se unen a moléculas MHC de clase I o clase II.

25 Asimismo, WO 2007/036638 da a conocer un péptido consistente en los aminoácidos 96-110 de la molécula de survivina entera.

Descripción detallada de la invención

30 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.

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.

35 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 las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

40 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 linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T.

45 Un «epítipo» de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I o clase II, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser

reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos. Los epítomos de linfocitos T que se unen a moléculas MHC de clase II suelen tener una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos. En el caso de los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II, el mismo péptido y el epítomo del linfocito T correspondiente pueden compartir un segmento central común pero en cambio diferir en la longitud total como consecuencia de secuencias de flanco de diferentes longitudes en dirección ascendente del extremo amino de la secuencia central y descendente con respecto a su terminal carboxílico, respectivamente. Los receptores MHC de clase II presentan una conformación más abierta; de la misma manera, los péptidos unidos a receptores MHC de clase II no se enclavan completamente en la estructura de la hendidura de unión al péptido de la molécula MHC de clase II, como ocurre con la hendidura de unión del péptido de la molécula MHC de clase I. Es de notar que éste no es el caso del péptido acorde con la SEC ID n.º 1, puesto que pequeñas variaciones en la longitud del péptido ocasionan un gran descenso de la actividad (véase más abajo).

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-A*11 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

Tabla 2: Los 30 alelos más expresados en diversas poblaciones

Probabilidad de que un alelo se exprese en un individuo (%)							
Los 30 alelos más expresados							
Alelo	Caucásicos	Alelo	Afroamericanos	Alelo	Hispanos	Alelo	Oriental
A*0201	45,6%	C*0401	29,0%	A*0201	37,1%	A*1101	38,4%
C*0701	27,7%	C*0701	25,4%	C*0401	25,4%	A*2402	33,7%
A*0101	27,4%	C*0602	23,0%	A*2402	24,9%	C*0702	33,3%
A*0301	23,8%	A*0201	22,3%	C*0702	24,2%	C*0102	27,7%
C*0702	21,5%	A*2301	20,7%	C*0701	20,8%	A*3303	23,3%
C*0401	21,2%	C*0202	19,0%	C*0304	14,4%	C*0801	21,6%
B*4402	20,2%	A*0301	18,7%	A*0301	14,3%	C*0304	19,9%
B*0702	18,1%	C*0702	18,1%	B*0702	13,2%	A*0201	18,1%
B*0801	18,1%	B*5301	18,1%	B*3501	12,8%	B*4001	15,2%
C*0501	17,2%	B*0702	15,8%	C*0602	12,3%	C*0401	14,0%
C*0304	16,8%	C*1601	15,7%	C*0501	11,9%	B*5801	13,3%
C*0602	15,7%	B*1503	13,9%	A*0101	11,4%	B*4601	12,7%
A*1101	15,3%	B*5801	13,5%	A*1101	11,0%	B*5101	12,4%
B*4001	13,6%	A*6802	12,7%	B*5101	10,8%	C*0302	12,0%
A*2402	12,1%	C*1701	11,7%	C*1601	10,6%	B*3802	11,4%
B*3501	10,7%	B*4501	10,8%	B*4403	9,9%	A*0207	11,0%
C*0303	10,6%	B*4201	10,5%	C*0102	9,7%	B*1501	9,4%
B*5101	10,4%	A*3001	10,4%	A*2902	9,7%	A*0206	9,3%
C*1203	9,9%	B*3501	10,1%	C*0802	9,3%	C*0303	9,2%
B*1501	9,6%	A*0101	10,0%	B*1801	9,1%	B*1502	9,1%

(continuación)

Probabilidad de que un alelo se exprese en un individuo (%)							
Los 30 alelos más expresados							
Alelo	Caucásicos	Alelo	Afroamericanos	Alelo	Hispanos	Alelo	Oriental
A*2902	8,9%	C*0304	9,3%	A*3101	8,9%	A*0203	8,8%
A*2601	8,2%	A*3002	9,2%	B*5201	8,6%	B*4403	8,6%
A*3201	8,2%	B*0801	8,5%	B*1402	8,6%	C*1402	8,4%
C*0802	7,7%	A*3402	8,4%	C*0202	7,6%	B*3501	7,2%
A*2501	7,5%	A*7401	8,4%	C*1203	7,6%	C*0602	7,0%
B*5701	7,1%	A*3303	8,0%	A*2601	7,6%	B*5401	6,9%
B*1402	6,7%	C*1801	7,3%	A*6801	7,1%	B*1301	6,6%
C*0202	6,6%	A*2902	7,2%	B*0801	7,0%	B*4002	6,3%
B*1801	6,4%	B*4403	6,9%	A*3002	6,8%	B*5502	6,3%
B*4403	6,4%	B*4901	6,9%	B*4402	6,5%	A*2601	6,0%

5 Tres locus diferentes del genoma humano albergan los genes MHC de clase II: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Los receptores MHC de clase II son heterodímeros que constan de una cadena alfa y una beta, las cuales se enclavan en la membrana celular a través de una región transmembrana. HLA-DRB1*04 y HLA-DRB1*07 son dos ejemplos de diferentes alelos beta MHC de clase II que se sabe que están codificados en estos locus. Los alelos de clase II son muy polimorfos: por ejemplo, se han descrito varios cientos de alelos HLA-DRB1 distintos. Por tanto, a efectos terapéuticos y de diagnóstico sería muy deseable contar con un péptido que se uniese, con la afinidad adecuada, a varios receptores HLA de clase II distintos. Un péptido que se une a varias moléculas HLA de clase II distintas recibe el nombre de ligando promiscuo.

15 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.

20 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.

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

25 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.

30 El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia de codificación, define una porción de ADN que no comprende la región codificante entera, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante entera.

El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en 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, exento de 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.

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.

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

El término «marco de lectura abierto (ORF)» designa una serie de tripletes que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación y que forman una secuencia (potencialmente) traducible en proteína.

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.

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.

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.

El término «fragmento activo» define un fragmento que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) 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 linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

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 SEC ID n.º 1 a 3, que corresponde a la estructura natural, o a la proteína «precursora» de las SEC ID n.º 1 a 3, esto es la survivina. 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.

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje de identidad», 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

- 5 (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;

- 10 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.

- 15 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.

- 20 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».

- 25 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).

- 30 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.

- 35 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 invención.

- 40 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 cuatro posiciones simultáneamente dentro del péptido.

- 45 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 lo que respecta a los linfocitos T cooperadores restringidos a las MHC de clase II, las funciones efectoras pueden consistir en la secreción inducida

por el péptido de citocinas, preferiblemente de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4, IL-5, IL-10 o IL-2, o la desgranulación inducida por el péptido. Las posibles funciones efectoras de los CTL y de los linfocitos T cooperadores no se limitan a esta lista.

5 Preferiblemente, cuando los CTL específicos para un péptido derivado de la SEC ID N.º 3 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.

10 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 sea específica contra los antígenos expresados en la superficie de las células tumorales y que a través de este mecanismo de acción sea capaz de inducir la regresión, paralice o frene el crecimiento del tumor.

15 Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humerales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

20 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).

25 Las moléculas MHC de clase I presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRiP y péptidos grandes. Las moléculas 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.

30 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). Inicialmente, la sensibilización y la expansión de los CTL en los ganglios linfáticos está sustentada por los linfocitos T CD4+ (Schoenberger et al., 1998). Así pues, un mecanismo podría ser el direccionamiento de los linfocitos CD8+ vírgenes hacia el lugar donde tiene lugar la interacción funcional entre los linfocitos T CD4+ y las APC (Castellino et al., 2006). Por último, la generación de los linfocitos CD8+ de memoria funcionales depende casi siempre de la asistencia de los linfocitos T CD4+ (Sun and Bevan, 2003; Janssen et al., 2003). Por todas esas razones, la identificación de epítopos 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). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los CTL (Qin and Blankenstein, 2000; Mortara et al., 2006) y que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos, granulocitos (Marzo et al., 2000; Hwang et al., 2007).

35 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).

40 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). También ha sido propuesta la destrucción directa de las células tumorales por los linfocitos T CD4+ citotóxicos a través de linfotoxinas y granzima B (Penna et al., 1992; Littau et al., 1992).

45 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 (TAA) es pequeño.

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 varios epítomos de MHC de clase II en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006).

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 que, 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 (TAA) 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 espermatocitos/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 ajuste 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 prerrequisitos. 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 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 prerrequisito 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 epítipo 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 epítipos 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 epítipo 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»).

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítipos 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 epítipos 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 MHC de clase I + epítipo peptídico) o por los linfocitos T cooperadores CD4 positivos (ligando: moléculas MHC de clase II + epítipo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

A la luz de los efectos secundarios graves y los gastos que supone el tratamiento contra el cáncer es evidente la urgente necesidad de mejora de los métodos pronósticos y diagnósticos. Así pues, existe la necesidad de descubrir otros factores que puedan servir como biomarcadores para el cáncer en general y el glioblastoma en particular. Existe igualmente la necesidad de identificar factores que puedan ser utilizados en el tratamiento contra el cáncer en general y contra el glioblastoma en particular.

Y es más, no existe ninguna pauta terapéutica pensada para los pacientes con cáncer de próstata que presentan recidiva bioquímica después de la prostatectomía radical, normalmente causada por tumor residual *in situ* que no ha sido extirpado en presencia de crecimiento localmente avanzado del tumor. Sería deseable contar con nuevas estrategias terapéuticas de menor morbilidad y similar eficacia terapéutica a las estrategias terapéuticas disponibles en estos momentos.

La presente invención proporciona un péptido que es útil para el tratamiento del glioblastoma, el cáncer de próstata y otros tumores que sobreexpresan la survivina. De los péptidos descritos en la presente memoria se ha demostrado en parte directamente con técnicas de espectrometría de masas que son presentados de forma natural por moléculas HLA en muestras de glioblastoma humano primario (véanse el ejemplo 1 y la figura 1), o en el caso de las SEC ID N.º 1 y 2 predichas conforme al algoritmo de predicción SYFPEITHI (Rammensee et al., 1995) son ligandos promiscuos de los alelos HLA-DR HLA-DRB1*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*11 y DRB1*15 (véase el anexo). A tenor de los datos anteriores y de las frecuencias de dichos alelos DRB1 frecuentes (Mori et al., 1995; Chanock et al., 2004), se puede suponer que el 92% de las personas de raza blanca A*02-positivas expresan como mínimo un alelo DRB1 que se une a esos péptidos (SEC ID N.º 1 a 3). La SEC ID N.º 2 contiene la misma secuencia central que la SEC ID N.º 1, alargada por dos aminoácidos N-terminales procedentes de la secuencia natural de la survivina que contiene un epítipo de linfocito T de clase I descrito de la survivina (Schmitz et al., 2000). La SEC ID N.º 3 contiene la misma secuencia que la SEC ID N.º 1, salvo porque el último aminoácido C-terminal es modificado: la asparragina (N) es sustituida por un ácido aspártico (D).

Se ha demostrado que el gen originario del cual derivan las SEC ID N.º 1 a 3 –survivena– está altamente sobreexpresado en el glioblastoma, el tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, carcinoma renal de células claras, cáncer de pulmón, cáncer del SNC, cáncer de ovario, melanoma (Tamm et al. 1998), cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia y meduloblastoma en comparación con los tejidos normales (véanse el ejemplo 2 y la figura 2) demostrando un alto grado de asociación del péptido con el tumor, es decir, que dichos péptidos aparecen claramente en el tejido tumoral pero no en los tejidos normales.

Los péptidos unidos 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 el péptido derivado de survivina (SEC ID N.º 1 a 3). Los linfocitos T cooperadores

activados por los péptidos derivados de la survivina pueden inhibir la vascularización del tumor, pueden atraer a las células efectoras del sistema inmunitario y facilitar la sensibilización y la proliferación de los CTL, así como la respuesta sostenida de los linfocitos TCD8+.

5 El péptido de la presente invención ha demostrado ser capaz de estimular las respuestas de los linfocitos T (véanse el ejemplo 3 y la figura 3). Así pues, el péptido de la presente invención es útil 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 ácidos 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 tejidos normales no contienen el péptido diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo $-NH_2$ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej. ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma de sales de ácido acético (acetatos) o ácido clorhídrico (cloruros).

30 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.

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

40 La detección de los péptidos 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 los péptidos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

45 Los péptidos descritos 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 péptido o el péptido 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 péptidos 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.

55 Los péptidos pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo 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.

Además se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

La Tabla 3 muestra el péptido acorde con la presente invención correspondiente a la SEC ID N.º 3, los alelos HLA a

los que se unen los péptidos respectivos y las proteínas originarias de las que pueden surgir dichos péptidos. Reviste especial interés que el péptido acorde con la SEC ID N.º 2 se una tanto a HLA-DR como a HLA-A*02, con lo que puede desencadenar dos respuestas distintas.

Tabla 3: Péptidos descritos

SEC ID N.º	Código del péptido	Secuencia	Alelos HLA	Proteína(s) originaria(s)
1	BIR-002	TLGEFLKLDREERAKN	HLA-DR	Survivina
2	BIR-004	ELTLGEFLKLDREERAKN	HLA-DR y HLA-A*02	Survivina
3	BIR-002a	TLGEFLKLDREERAKD	HLA-DR	Survivina

5

La expresión de BIRC5 (survivina), miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), es elevada en tejidos fetales y en diversos cánceres humanos mientras que su expresión está enormemente reducida en los tejidos diferenciados normales del adulto, sobre todo en aquellos cuyo índice de proliferación es bajo. La survivina parece ser capaz de regular tanto la proliferación celular como la muerte celular apoptótica. Aunque la survivina se localiza normalmente en la región citoplasmática de la célula, donde está asociada con un mal pronóstico en el cáncer, también se ha descrito en el núcleo, localización donde indica un pronóstico favorable (O'Driscoll et al., 2003). Se han descrito varios mecanismos de regulación a través de la survivina y de ella misma. La survivina parece estar relacionada con la chaperona molecular Hsp60. En condiciones *in vivo*, la Hsp60 aparece abundantemente expresada en los tumores humanos primarios en comparación con los correspondientes tejidos normales. El silenciamiento agudo de la Hsp60 con ARN pequeños de interferencia desestabiliza la reserva mitocondrial de survivina, induce la disfunción mitocondrial y activa la apoptosis dependiente de caspasas (Ghosh et al., 2008). Además, la inhibición de Ras libera el «freno» que ejerce la survivina sobre la apoptosis y provoca la activación de la vía apoptótica mitocondrial. Especialmente en el glioblastoma, la resistencia a la apoptosis se puede neutralizar con un inhibidor de Ras dirigido contra la survivina (Blum et al., 2006). Asimismo parece haber una correlación entre la hiperactividad del NF-kappaB en los gliomas y la hiperexpresión de la survivina, uno de los genes diana del factor NF-kappaB. En consecuencia, los genes antiapoptóticos activados por el NF-kappaB están hiperexpresados en muestras tumorales. Y especialmente en el glioblastoma se detectan niveles sumamente elevados de expresión de la survivina (Angileri et al., 2008). Se ha planteado que la sobreexpresión de la survivina en los gliomas cerebrales podría desempeñar un papel importante en la proliferación maligna, los mecanismos anti-apoptóticos y la angiogénesis (Zhen et al., 2005; Liu et al., 2006). Se han realizado diversos análisis para estudiar la expresión de la survivina y su repercusión en la supervivencia en el marco del glioblastoma. En resumen, la expresión de la survivina, sobre todo la expresión simultánea en el núcleo y el citoplasma en los tumores astrocíticos apareció relacionada significativamente con el grado de malignidad (con la mayor expresión de survivina en el glioblastoma) y con tiempos de supervivencia global más cortos que los pacientes con tumores negativos para la survivina (Kajiwara et al., 2003; Saito et al., 2007; Uematsu et al., 2005; Mellai et al., 2008; Grunda et al., 2006; Xie et al., 2006; Sasaki et al., 2002; Chakravarti et al., 2002).

La sobreexpresión de la survivina también se ha descrito en otros tipos de tumores. En el cáncer de mama, la expresión de la survivina aparece asociada con un grado mayor y menor supervivencia sin progresión (Yamashita et al., 2007; Al-Joudi et al., 2007; Span et al., 2004). En estirpes celulares de cáncer de esófago, la actividad promotora de la survivina ha resultado ser 28,5 veces más elevada que en los tejidos normales (Sato et al., 2006). La expresión de la survivina en el cáncer colorrectal también está relacionada con el grado patológico y la metástasis ganglionar (Tan et al., 2005). También se ha demostrado que la agresividad del carcinoma renal de células claras está relacionada con la expresión de la survivina. Asimismo, su expresión está inversamente relacionada con la supervivencia dependiente específicamente del cáncer (Kosari et al., 2005). La expresión de la survivina se puede detectar en un conjunto de neoplasias queratinocíticas y lesiones cutáneas hiperproliferativas pero no en la piel normal (Bowen et al., 2004). En estirpes celulares de cáncer de páncreas, la survivina aparecía amplificada en el 58% de las estirpes celulares estudiadas (Mahlamaki et al., 2002). En el carcinoma epidermoide, la expresión de la survivina puede ayudar a identificar los casos con un fenotipo clínico más agresivo e invasivo (Lo et al., 2001).

Las posibilidades que ofrece la survivina como diana en el tratamiento contra el cáncer ha propiciado la realización de estudios con péptidos derivados de la misma en los cuales ha demostrado su inmunogenicidad en pacientes oncológicos al desencadenar respuestas mediadas por los linfocitos T CD8+. Asimismo, la survivina estimuló de forma específica la reactividad de los linfocitos T CD4+ en linfocitos de sangre periférica de los mismos pacientes (Casati et al., 2003; Piesche et al., 2007).

La survivina (SVN, BIRC) se sobreexpresa en multitud de tipos de cáncer distintos. Por lo que en general su sobreexpresión se considera vinculada con una menor supervivencia global y mayor grado de malignidad.

Piesche (2006) reveló como parte de su estudio (véase también (Piesche et al., 2007)), epítomos candidatos restringidos a HLA de clase II y MHC de clase II en la survivina (SVN) y en la proteinasa-3 (PR3), que fueron

determinados utilizando el programa informático TEPITOPE (Bian and Hammer, 2004). El análisis con TEPITOPE dio como resultado 6 epítomos candidatos de la SVN y 11 de la PR3 con una alta probabilidad de unión a varios alelos HLA-DR. Los 17 péptidos se estudiaron en experimentos inmunológicos con linfocitos T una vez sintetizados y purificados por cromatografía. Los péptidos manifestaron longitudes variables a consecuencia del solapamiento de epítomos que se consideraron juntos en un péptido (Tabla 4).

Tabla 4: Nombre, posición de los AA y secuencias de AA de los péptidos sintéticos de la SVN revelados por Piesche 2006.

Péptido	Posición	Secuencia de aminoácidos	Frecuencia en linfocitos T
S ₁₀	10-24 (SEC ID N.º28)	WQPFLKDHRISTFKN	8,64*10 ⁻⁷
S ₂₂	22-36 (SEC ID N.º 29)	FKNWPFLEGAAATPE	7,2*10 ⁻⁷
S ₄₀	40-54 (SEC ID N.º 30)	EAGFIHAPTENEPDL	8,64*10 ⁻⁷
S ₅₈	58-72 (SEC ID N.º 31)	FFCFKELEGWEPDDD	4,32*10 ⁻⁷
S ₈₈	88-103 (SEC ID N.º 32)	LGEFLKDRERAKNKI	1,73*10 ⁻⁷
S ₁₁₀	110-124 (SEC ID N.º 33)	KNKIAKETNNKKKEF	8,64*10 ⁻⁷

(Nota: El S₈₈ es en realidad el S₉₈, por lo que Piesche et al. pudieron cometer un error al determinar la posición de este epítomo).

Piesche llevó a cabo experimentos de titulación con los péptidos correspondientes para estimar la afinidad entre el HLA y los péptidos o la afección del TCR por el complejo péptido-HLA. Cuanto menor es la concentración de péptido mayor es la afinidad de unión de los epítomos peptídicos a las moléculas de MHC, un prerequisite importante para la presentación natural de los «auténticos» epítomos de linfocito T procedentes del procesamiento intracelular del antígeno proteico. La actividad proliferativa semimáxima medida de los clones de linfocitos T específicos de cada péptido fue: <50 nM en el caso del S₁₀, 400–700 nM en el del S₄₀, 2000–3000 nM en el del S₈₈ y 100–300 nM en el del P₅₈. Piesche indicó además que solo el péptido S₁₀ de la SVN desencadenó la proliferación de linfocitos T específicos tras la exposición a la proteína SVN recombinante. Esto se demostró en tres clones de linfocitos T específicos del S₁₀ procedentes de donantes diferentes. Piesche et al. investigaron el procesamiento y la presentación de los epítomos peptídicos de la SVN a partir del antígeno natural mediante el cultivo de clones de linfocitos T específicos del péptido con células dendríticas expuestas a la proteína SVN. Sólo el péptido S₁₀ de la SVN fue capaz de causar la proliferación de los linfocitos T específicos durante la exposición a la proteína SVN recombinante. Esto se demostró en tres clones de linfocitos T específicos del S₁₀ procedentes de donantes diferentes. No se detectó ninguna proliferación específica como respuesta al antígeno natural en los clones de linfocitos T específicos de la PR₃.

Además, antígenos tumorales procedentes de células tumorales apoptóticas o necróticas fueron internalizados por APC *in vivo*, procesados independientemente de las MHC II y presentados a linfocitos T CD4+. Para el reconocimiento por parte de los linfocitos T del auténtico epítomo S₁₀, se expusieron células dendríticas a lisados de células tumorales procedentes de varias estirpes de células tumorales positivas para la SVN. En el caso del epítomo S₁₀, se detectó el reconocimiento directo *in vitro* de las CD expuestas al lisado de estirpes de células tumorales Karpas-422, Jurkat y HL-60. Esto se demostró al menos en tres clones de linfocitos T específicos del S₁₀ procedentes de donantes diferentes.

A fin de demostrar que el epítomo S₁₀ puede provocar una respuesta inmunitaria en pacientes oncológicos es preciso confirmar la presencia de los correspondientes linfocitos T CD4+ en la sangre de dichos pacientes. Se aislaron PBMC de varios pacientes y se estimularon con el péptido S₁₀. Con ese fin se extrajeron muestras de PBMC de los pacientes antes de iniciar el tratamiento y del inicio del tratamiento citotóxico-citostático, y como células presentadoras de antígeno/péptido se emplearon los monocitos y los linfocitos B contenidos en la fracción de PBMC. Tras una semana de cultivo, las células se analizaron para determinar la proliferación específica del péptido con un ensayo de incorporación de [³H]-timidina. En tres de los 13 pacientes analizados se detectó la respuesta proliferativa *in vitro*.

La aplicación potencial de los epítomos peptídicos en la inmunoterapia depende básicamente de si los linfocitos T CD4+ específicos de péptido responden al antígeno correspondiente. El reconocimiento del antígeno proteico procesado naturalmente en forma de epítomos «auténticos» o «reales» depende en principio de varios factores.

Piesche mostró que el reconocimiento de la proteína solo resultó detectable con el epítomo S₁₀ de la SVN. Con los demás péptidos identificados no se detectó el reconocimiento de la proteína (SVN: S₄₀ y S₈₈; PR3: P₅₈, P₂₁₆, P₂₃₅ y P₂₃₉). Piesche et al. afirmaron que durante la proteólisis endosómica es importante que los motivos de secuencia presentes no sean degradados, como en el caso de los epítomos «crípticos». En contraste con los epítomos restringidos a MHC de clase I, las moléculas MHC de clase II pueden captar péptidos de longitud variable (12-28) y,

por tanto, no es necesaria la escisión de los epítomos peptídicos en longitudes concretas.

Los inventores revelan sorprendentemente en la presente invención que otro epítomo, la SEC ID N.º 1, derivado de la survivina que es más corto que el S₈₈, pero también se solapa, generó una potente respuesta inmunitaria en 16 de 19 pacientes *in vivo* (véase el ejemplo 4). Debido al elevado polimorfismo del locus HLA-DR, esto también demuestra la unión altamente promiscua del péptido de la SEC ID N.º 1 como se había predicho, puesto que la respuesta inmunitaria solo se puede desencadenar con la unión de un péptido a una molécula HLA.

La importancia de los diversos tipos de cáncer en los que se ha descrito la sobreexpresión de la survivina se indica en la Tabla 2. Los tipos de cáncer en los que se describe con frecuencia la sobreexpresión de la survivina fueron responsables de más de 415. 000 muertes en 2007 (véase la tabla 1).

Piesche et al. (2006) demostraron en condiciones *in vitro* la presencia de precursores adecuados del péptido S₈₈ en tres de cuatro donantes con alelos HLA-DR solapados. En este caso el peso de las pruebas es demasiado pequeño para deducir la unión promiscua del S₈₈ al HLA-DR, puesto que los resultados se pueden explicar por la unión a dos alelos HLA-DR distintos (p. ej. DR3 y DR11, o DR1 y DR3, o DR11 y DR4). Asimismo, los índices de estimulación obtenidos en un ensayo de proliferación bastante inespecífico (incorporación de [³H]-timidina) en cultivos de PBMC enteras son bastante bajos y no se realizaron con un control positivo (p. ej. una mezcla conocida de péptidos virales fuertemente inmunogénicos) ni controles negativos adecuados (estimulación durante el ensayo de proliferación con un péptido control irrelevante). Los datos sobre las frecuencias de los precursores no fueron confirmados con un segundo ensayo de otro tipo.

WO 2007/036638 (Wang et al.), entre otras, da a conocer péptidos de la survivina con las siguientes secuencias de aminoácidos

96-110 (LTLGEFLKLDREERAK; SEC ID N.º 25);
99-113 (GEFLKLDREERAKNKI; SEC ID N.º 26); y
102-116 (LKLDRERAKNKIAKE; SEC ID N.º 27).

Como región que se une a moléculas HLA de MHC II con una afinidad «buena» (CI₅₀<1000 nM), se describe la región 84 a 113. No obstante, los péptidos como los examinados por Wang et al. presentan un espectro muy amplio de unión con las diferentes moléculas de HLA, y dicha unión incluso difiere drásticamente dentro de dicha región tal y como se describe, cuando la secuencia de los péptidos varía en uno o dos aminoácidos.

El péptido de la presente invención de la SEC ID N.º 3 (TLGEFLKLDREERAKD; péptido «BIR-002a») comprende una secuencia del péptido BIR-002 de la presente invención de SEC ID N.º 1, excepto que en el extremo C-terminal, dicho péptido acaba con el aminoácido ácido aspártico (D) en lugar de asparragina (N). El péptido se solapa con el péptido S₈₈ de Piesche, que contiene los tres últimos aminoácidos NKI. Tal y como se ha dicho, el péptido S₈₈ se mostró inactivo en un ensayo de proliferación de linfocitos T específicos en el curso de la exposición a la proteína SVN recombinante. En cambio, el péptido BIR-002a presentó una potente respuesta inmunitaria relacionada con moléculas MHC II. Sin pretensión de limitarse a la teoría, se supone que la conversión enzimática de la asparragina en ácido aspártico mediante una asparraginasa tiene lugar *in vivo*, y de ese modo el aminoácido C-terminal queda modificado (y el péptido queda activado y/o activado en mayor grado). Como la asparragina C-terminal del péptido de Piesche S₈₈ queda bloqueada por dos aminoácidos, dicho péptido permanece inactivo (hecho que pone de manifiesto la importancia de un solo cambio de aminoácido en la actividad de dicho péptido).

Asimismo, se comprobó que las respuestas inmunitarias y las actividades de otros péptidos que contenían la asparragina C-terminal (como, por ejemplo, la SEC ID N.º 1) tal vez dependan también de la modificación del extremo C-terminal en otro aminoácido ácido, en concreto en ácido aspártico. Por tanto, en un aspecto de la presente invención, el péptido acorde con la SEC ID N.º 1 puede ser considerado como un «profármaco» de la SEC ID N.º 3, que proporciona el péptido activo acorde con la SEC ID N.º 3 tras la conversión enzimática. Debe entenderse que la presente invención también abarca la conversión química del aminoácido, en concreto de la asparragina, y la desamidación espontánea por la pérdida de una molécula de agua.

Asimismo, los ejemplos que demuestran la actividad del péptido acorde con la SEC ID N.º 1 sustentan también la actividad del péptido modificado acorde con la SEC ID N.º 3.

Además, en el contexto de la presente invención puede llegar a constatarse que las solubilidades de los péptidos en la zona del péptido BIR-002 (región 84 a 113) difieren drásticamente de la de otros péptidos muy similares. Cabe subrayar que en Wang et al. los péptidos de la región cercana al péptido BIR-002 eran en realidad insolubles por lo que los estudios de unión no se pudieron llevar a cabo.

Se comprobó que las solubilidades eran las siguientes:

BIR-002 (SEC ID N.º 1):	< 32,9 mg/ml (acetato)
BIR-002a (SEC ID N.º 3) (D en lugar de N en el extremo C-terminal):	< 23,5 mg/ml
BIR-014 (péptido comparativo de Wang, SEC ID N.º 25):	< 99,5 mg/ml

Existe otro aspecto más de la presente invención que se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA (en lo sucesivo también denominado «anticuerpo específico de complejo»). Aún existe otro aspecto más de la invención que se refiere a un método para producir dicho anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II con una forma soluble de una molécula MHC de clase II unida a dicho antígeno restringido a HLA; aislamiento de moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho mamífero no humano; producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo capaz de unirse específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II unido con dicho antígeno restringido a HLA. Métodos pertinentes para la producción de tales anticuerpos y de complejos mayores de histocompatibilidad de clase I monocatenarios, así como de otras herramientas para la producción de tales anticuerpos se revelan en WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en Cohen CJ, Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. *J Mol Recognit.* 2003 Sep-Oct;16(5):324-32.; Denkberg G, Lev A, Eisenbach L, Benhar I, Reiter Y. Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2197-207; y en Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, Tomaru U, Jacobson S, Reiter Y. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigen presentation: visualization, quantitation, and in situ detection of human viral epitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. *J Immunol.* 2003 Apr 15; 170(8):4349-61, que a efectos de la presente invención se incorporan explícitamente como referencia en su integridad.

Preferiblemente el anticuerpo se une al complejo con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar, preferentemente a 10 nanomolar, lo cual se considera «específico» en el contexto de la presente invención.

El término «anticuerpo» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, el término «anticuerpos» también incluye fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de moléculas de inmunoglobulina, siempre que posean alguna de las propiedades deseadas (p. ej., ser un anticuerpo específico de complejo como se ha definido arriba, administración de una toxina contra una célula cancerosa que exprese un gen marcador de cáncer con un nivel elevado, y/o inhibición de la actividad de un polipéptido marcador del cáncer, como la survivina) descritas en la presente memoria.

Si es posible los anticuerpos de la invención se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto polipéptidos marcadores de cáncer enteros como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, un ADNc que codifica un polipéptido de la survivina, o un fragmento de los mismos, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o células eucariotas (p. ej., de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se puede purificar una proteína recombinante con la que generar una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se una específicamente al polipéptido marcador de cáncer usado para generar el anticuerpo. Los anticuerpos específicos de complejo se generarán habitualmente tal y como se ha indicado antes.

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para el uso previsto (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con métodos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.); para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunoelectrotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido canceroso congelados o fijados en formol. Después de la caracterización *in vitro* inicial, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínico conocidos.

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º

pat. de EE. UU. 4.816.567).

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej. con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348, publicada el 22 de diciembre de 1994 y en la Pat. de EE. UU. N.º 4.342.566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento que tiene dos sitios de combinación con antígenos y todavía es capaz de reconocer antígenos de reactividad cruzada.

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagénesis dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej. de ratón) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos quiméricos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá casi todas de al menos uno, y normalmente de dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, a un anticuerpo humanizado se le introducen uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo la o las secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. EE. UU. N.º 4.816.567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

Se pueden emplear animales transgénicos (p. ej. ratones) que tras la inmunización sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes germinales provoca la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Los anticuerpos humanos también se pueden producir en fagotecas, por ejemplo como se ha descrito antes en el caso de los

anticuerpos específicos de complejo.

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución esté comprendido aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej. películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar, por ejemplo.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, al paciente o a las células mediante inyección (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, etc.), o con otros métodos como la infusión que aseguren su liberación efectiva en el torrente sanguíneo. Los anticuerpos también se pueden administrar por vía intratumoral o peritumoral para ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosis y pautas de administración más adecuadas se pueden determinar empíricamente; la toma de decisiones a este respecto forma parte de los conocimientos de la materia. Las personas versadas en la materia saben que la dosis de anticuerpos a administrar depende, por ejemplo, del sujeto que va a recibir al anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Haber et al, eds. Raven Press, New York (1977) pp. 365-389. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo como tratamiento contra el cáncer, su eficacia se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer en el sujeto receptor del tratamiento utilizando técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ³H, ³²P o ³⁵S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de cáncer y el valor de afinidad (Kd) es inferior a 1 x 10 µM.

Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos ópticos. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopia, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo, y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra de tejido patológico puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de la proteína NCAN.

La presente invención proporciona así un péptido consistente en la secuencia acorde con la SEC ID N.º 3.

En una forma de realización preferida para el tratamiento del carcinoma de células renales el péptido de la SEC ID N.º 3 se usa en combinación con al menos dos de los péptidos de las SEC ID N.º 4 a 13 y la SEC ID N.º 24. El péptido de la SEC ID N.º 3 puede ser administrado por separado o junto con otros péptidos en una formulación.

ID de la secuencia interna	Antígeno	Secuencia	SEC ID N.º
IMA-MMP-001	Metaloproteinasa de matriz 7	SQDDIKGIQKLYGKRS	4
IMA-ADF-002	Adipofilina	VMAGDIYSV	5
IMA-ADF-001	Adipofilina	SVASTITGV	6
IMA-APO-001	Apolipoproteína L1	ALADGVQKV	7

(continuación)

ID de la secuencia interna	Antígeno	Secuencia	SEC ID N.º
IMA-CCN-001	Ciclina D1	LLGATCMFV	8
IMA-GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVG	9
IMA-K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL	10
IMA-MET-001	Protooncogén c-met	YVDPVITSI	11
IMA-MUC-001	MUC1	STAPPVHNV	12
IMA-RGS-001	RGS-5	LAALPHSCL	13
IMA-HBV-001	HBV	FLPSDFFPV	14
IMA-NCAN-001	Neurocán	VLCGPPPAV	24

En WO 2007/028573 se da a conocer una descripción detallada de los péptidos y los antígenos indicados arriba.

- 5 En una forma de realización preferida para el tratamiento del cáncer de colon el péptido de la SEC ID N.º 3 se usa en combinación con al menos dos de los péptidos de las SEC ID N.º 15 a 24, 4, 8, 11 o 12. El péptido de la SEC ID N.º 3 puede ser administrado por separado o junto con otros péptidos en una formulación.

SEC ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen	Función	Se une a MHC
15	C20-001	ALSNLEVTL	C20orf42	Implicado en el anclaje del citoesqueleto de actina a la matriz extracelular	HLA-A*02
16	NOX-001	ILAPVILYI	NOX1	NADPH oxidasa	HLA-A*02
17	ODC-001	ILDQKINEV	ODC1	Ornitina descarboxilasa	HLA-A*02
18	PCN-001	KLMDLDVEQL	PCNA	Proteína auxiliar de la ADN-polimerasa delta	HLA-A*02
19	TGFBI-001	ALFVRLALA	TGFBI	Factor de crecimiento transformante, beta-inducido	HLA-A*02
20	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2A/TOP2B	Topoisomerasa	HLA-A*02
21	TGFBI-004	TPPIDAHRNLLRNH	TGFBI	Factor de crecimiento transformante, beta-inducido	HLA-DR
22	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT	CEACAM5	Antígeno carcinoembrionario	HLA-DR
8	CCN-001	LLGATCMFV	CCND1	Ciclina D1	HLA-A*02
12	MUC-001	STAPPVHNV	MUC1	Mucina 1	HLA-A*02
4	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS	MMP7	Metaloproteinasa 7	HLA-DR
23	CEA-004	YLSGANLNL	CEACAM5	Variante del péptido CEA	HLA-A*02
11	MET-001	YVDPVITSI	MET	Protooncogén met	HLA-A*02

En EP07014796.2 y US 60/953.161 se da a conocer una descripción detallada de los péptidos y los antígenos

indicados arriba.

El péptido de la invención tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase II.

5 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 deleción (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., 10 22(22): 4673 4680 (1994). Bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX y otras herramientas de análisis.

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., 2001) (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay et al., 2006).

15 Por «variante» de la secuencia de aminoácidos los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo sustituyéndolas con la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste de la secuencia de aminoácidos indicada en las SEC ID N.º 1 a 24. Por ejemplo, un péptido se puede modificar para que mejore o al 20 menos mantenga la capacidad para interaccionar y unirse a la hendidura de unión de una molécula MHC adecuada, como HLA-A*02 o -DR, y de un modo que mejore o al menos mantenga la capacidad para unirse al TCR de CTL activados. Estos CTL pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía (Rammensee et al., 1997) y de las bases de datos científicas (Rammensee et al., 1999), 25 ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión. Así pues, una persona versada en la técnica será capaz de modificar las secuencias de aminoácidos expuestos en las SEC ID N.º 1 a 24, manteniendo los residuos de anclaje conocidos, y será capaz de determinar si tales variantes 30 mantienen la capacidad de unión a moléculas MHC de clase I o II. Las variantes de la presente invención conservan la capacidad para unirse a los TCR de los CTL activados, que después pueden reaccionar con células y matar las que expresan un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afín definido en los aspectos de la invención.

35 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. Así pues, aparte de la condición indicada, el péptido de la invención puede ser cualquier péptido (en cuyo término los inventores incluyen oligopéptidos o polipéptidos), que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o una variante de las mismas tal y como se indican.

40 **Tabla 5: Variantes y motivo del péptido acorde con la SEC ID N.º 24**

NCAN	Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido	V	L	C	G	P	P	P	A	V
	Variantes		M							L
			I							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			

(continuación)

NCAN		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Código del péptido		V	L	C	G	P	P	P	A	V
	Variantes			M							L
			Y		S		V				
			V		R						
				M							L

5 Es sabido que los péptidos que son presentados por MHC de clase II están compuestos por una «secuencia central»
 10 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
 15 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 de la invención
 pueden tener cualquier tamaño, pero normalmente tienen menos de 100.000 en masa molecular, preferiblemente
 20 menos de 50.000, más preferiblemente menos de 10.000, y normalmente unos 5.000. En cuanto al número de
 residuos de aminoácidos, los péptidos de la invención pueden tener menos de 1.000 residuos, preferiblemente
 25 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, la presente invención también proporciona 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.

20 En el caso de los péptidos restringidos a MHC de clase II, la molécula MHC puede presentar varios péptidos
 distintos dotados de la misma secuencia central. Como la interacción con el linfocito T reconocedor (cooperador)
 depende de la secuencia central de 9 a 11 aminoácidos, el mismo clon de linfocito T (cooperador) puede reconocer
 varias variantes de longitud. Así pues para la carga directa de moléculas MHC de clase II se pueden usar diversas
 25 variantes de longitud de una secuencia de unión central sin necesidad de ningún procesamiento adicional ni recortes
 en los extremos N y C-terminal. 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 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
 30 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. No
 obstante, en algunos casos se ha demostrado que las regiones que flanquean la secuencia central pueden influir en
 35 la unión del péptido a la molécula MHC de clase II o en la interacción del complejo dimérico MHC:péptido con el
 TCR en ambas direcciones en comparación con un péptido de referencia dotado de la misma secuencia central. Las
 estructuras terciarias intramoleculares del péptido (p. ej. bucles) normalmente reduce la afinidad hacia el MHC o el
 TCR. Las interacciones intermoleculares de las regiones flanqueantes con otras partes del MHC o del TCR aparte
 de la misma hendidura de unión al péptido pueden estabilizar la interacción. Esos cambios de afinidad pueden ser
 determinantes para que el péptido de MHC de clase II estimule de forma efectiva la respuesta de los linfocitos T
 (cooperadores).

40 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.

45 El péptido acorde con la presente invención tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de
 histocompatibilidad humana (MHC) de clase II. 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).

50 Un péptido como el descrito, además de la secuencia acorde con cualquiera de las SEC ID N.º 1 a N.º 3 o con una
 variante de las mismas puede contener segmentos adicionales de aminoácidos en los extremos N- y/o C-terminal

que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como un epítipo para el epítipo de moléculas MHC.

No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido acorde con la presente invención en las células. En una forma de realización de la presente invención, el péptido es parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo «li») tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497 (Strubin, M. et al. 1984).

Ejemplos de otros péptidos preferidos incluyen péptidos dotados de un subtipo de HLA específico y que son capaces de estimular linfocitos CD8, y en los que dicho péptido comprende el motivo de aminoácidos de anclaje específico mostrado a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6: Subtipos de HLA y motivos de anclaje del péptido preferido acorde con la SEC ID N.º 24

Péptido	Subtipo HLA		Posición	1	2	3	4	5	6	7	8	9
24	A*02	Código del péptido		V	L	C	G	P	P	P	A	V
		Motivo de anclaje		x	L	x	x	x	x	x	x	V

Además, el péptido o variante pueden ser modificados 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.

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, y que se incorporan en la presente memoria como referencia. 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.

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.

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 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 carboxílicos de los péptidos.

Adicionalmente, todos los péptidos descritos pueden ser sintetizados para alterar 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 invención 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 de la invención.

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, que se incorpora en la presente memoria como referencia. 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-trinitrobencenosulfónico (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 carbamoylación 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.

- 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>) ofrecen información sobre reactivos concretos.
- 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. .
- 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.
- 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.
- 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(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. 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).
- 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.
- Un péptido o variante que está modificado o que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, péptidos y variantes (al menos aquellas que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados con 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-fluorenilmetiloxycarbonilo (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 butiloxycarbonílicos (en la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido 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), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina 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).
- 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.
- 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.

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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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). 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.

25 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 o variante 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, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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.

50 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, 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.

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 contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la b-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 las RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N.º 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, 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, CA 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 la 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 o 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).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un péptido, 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 o su variante pueden ser preparados 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 acorde con la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

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.

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.

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.

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* Schneider line 2 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.

Preferentemente, la 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 LFA3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase II y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

De forma similar, si se utiliza como antígeno un epítipo de MHC de clase I, los linfocitos T serán CTL CD8-positivos.

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 SEC ID N.º 3.

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.

Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método que se incorpora a la presente memoria como referencia. 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).

5 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 SEC ID N.º 1.

10 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 administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser 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
15 buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que analizada se le detecte.

En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD4-positivos conformes a la presente invención 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)).

20 Los linfocitos T de la presente invención pueden ser utilizados como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también proporciona un método para destruir células diana de un paciente que 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.

25 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.

30 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); revisado en (Gattinoni et al., 2006) y (Morgan et al., 2006).

35 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 o cualesquier moléculas conocidas.

40 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
45 puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO95/18145 y Longenecker et al. 1993). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos
50 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
55 invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEC ID N.º 3 y al menos otro péptido adicional, 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. Preferiblemente al menos un péptido adicional tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEC ID N.º 4 a 24.

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, 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 vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados 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.

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[®]), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, 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 dextrano y PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam 3 Cys, estimulón 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 antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) 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 plena de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 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 incluyen sin ánimo de limitación a CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos ARNdc como poli(I:C) y AmpliGen, ARN o ADN bacteriano sin CpG así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas 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.

5 La presente invención proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del glioma y del cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de páncreas, carcinomas epidermoides y neoplasias queratinocíticas de la piel, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y melanoma.

10 La presente invención también contempla 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.

15 Los equipos de la presente invención comprenden, preferiblemente, una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor 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 concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. El prospecto puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

20 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 reconstituída. El equipo puede comprender, además, un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

25 Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituída 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.

30 Los equipos de la presente invención 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.

35 Preferiblemente, los equipos de la invención 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.

45 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.

50 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.

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.

55 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el resultado de la espectrometría de masas con ESI acoplada cromatografía de líquidos que

identifica el péptido asociado a tumor NCAN-001 en la muestra de glioblastoma GB1006.

La Fig. 2 expone el perfil de expresión del ARNm del gen NCAN que codifica el péptido asociado a glioblastoma NCAN-001. 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).

5 La Fig. 3 muestra el perfil de expresión relativo del ARNm del gen BIRC. 5. La expresión de este gen es nula o muy baja en los tejidos normales pero es muy elevada en muestras tumorales.

Las Figs. 4a y 4b muestran la presencia de linfocitos T CD4⁺ que segregan IFN γ específico contra PSMA y survivina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en varios intervalos de tiempo tras la vacunación del paciente, análisis realizado con EliSpot de IFN γ . Intervalos de tiempo: antes de la vacunación (a) y después de 3 (b), 6 (c), 7 (d), 8. (e), 9 (f), 10 (g) y 11 (h) vacunaciones.

10 La Fig. 5 muestra la presencia de linfocitos T CD4⁺ que segregan IFN γ , IL-5, IL-10 y TNF α específicamente contra la survivina en PBMC en tres intervalos de tiempo distintos tras la vacunación del paciente analizados con un ensayo de ICS. Intervalos de tiempo: después de 1 (a), 3 (b) y 7 (c) vacunaciones.

15 La Fig. 6 expone la respuesta bioquímica de los pacientes 8 y 10 que revela la estabilidad del PSA, con un aumento no superior al 10% respecto al valor inicial del mismo.

La Fig. 7 expone la respuesta bioquímica de los pacientes 11 y 16, que muestra el aumento del tiempo de duplicación del PSA sin que se llegue a estabilizar.

La Fig. 8 expone la respuesta bioquímica del paciente 5, que muestra el aumento del tiempo de duplicación del PSA sin que se llegue a estabilizar.

20 La Fig. 9 expone la respuesta bioquímica de los pacientes 1, 4, 10, 12 y 13 que no revela ningún cambio en el tiempo de duplicación del PSA durante la vacunación.

La Fig. 10 expone la respuesta bioquímica de los pacientes 2, 6, 9, 14, 18 y 19 que no revela ningún cambio en el tiempo de duplicación del PSA durante la vacunación.

25 La Fig. 11 expone la respuesta bioquímica de los pacientes 7, 15 y 17 que revela un descenso transitorio del PSA o bien un aumento del tiempo de duplicación seguido por un descenso de este último.

La Fig. 12 expone que del estudio de vacunación contra el cáncer de próstata, se pueden establecer clones de linfocitos T CD4⁺ específicos del péptido BIR-002 a partir de varios pacientes con cáncer vacunados que son funcionales en lo referente a la producción de IFN-gamma como respuesta contra el BIR-002. Wang et al., 2008 describen clones de linfocitos T obtenidos de donantes sanos solo tras varias rondas de sensibilización y estimulación *in vitro*, mientras que los presentes linfocitos T pueden ser inducidos en los pacientes mediante vacunaciones. PMA/ionomicina = activación inespecífica independiente de antígeno; Survivina (II): estimulación con BIR-002; PSMA (II): estimulación con péptido irrelevante. Todas las células reactivas son CD4 positivas.

30 La Fig. 13 ilustra que el BIR-002 es presentado de forma natural por las células dendríticas. Células dendríticas inmaduras incubadas con survivina recombinante o con el epítipo BIR-002 de la misma son reconocidas por linfocitos T específicos de BIR-002 procedentes de pacientes vacunados, tal y como demuestra la tinción intracelular de citocinas. Estos resultados apuntan a que BIR-002 es procesado de forma natural por proteinasas dentro de las células dendríticas y que el epítipo BIR-002 no es destruido durante el procesamiento. Además, dichos linfocitos T CD4⁺ son multifuncionales puesto que segregan las citocinas IFN-gamma, TNF-alfa e IL-2, expresan en su superficie el ligando de CD40 (CD154) y se desgranulan, tal y como indica la expresión en su superficie del CD107a. Esta respuesta de los linfocitos T es específica de antígeno, ya que no resultan activados por células dendríticas incubadas con la proteína irrelevante RAP80 ni con el péptido HIV-001.

35 La Fig. 14 expone que una elevada fracción de los linfocitos T CD4⁺ específicos de BIR-002 derivados de pacientes con cáncer de próstata vacunados con BIR-002 expresan citocinas beneficiosas como IFN-gamma, TNF-alfa e IL-2 mientras que las citocinas inmunorreguladoras IL-10 e IL-7 no se expresan con esa magnitud. Se muestran los datos primarios y los datos resumidos aportados por la tinción intracelular de citocinas de los linfocitos T específicos de BIR-002 o de dos péptidos restringidos a clase II usados como control.

45 La Fig. 15 muestra que varias estirpes de células tumorales que expresan diferentes alelos HLA-DR son reconocidas por PBMC extraídas de pacientes (mostrados de los pacientes Pro26 y Pro15). Así pues: 1. Los pacientes desarrollan respuestas multiclonales de linfocitos T tras la vacunación con BIR-002; 2. BIR-002 se une de forma promiscua a varios alelos HLA de clase II: DR1 (véase también Wang et al.); DQ5 (no analizado por Wang et al.); DR11 (véase también Wang et al.); y DRB3 (en contraste con Wang et al., 2008, Tabla 1); 3. La presentación funcional de BIR-002 es posible en el contexto de varias moléculas de HLA de clase II (producción de TNF-alfa). Tal y como sucede con las HLA de clase I (HLA-A, -B, C), en principio, en las HLA de clase II también se pueden encontrar tres locus genéticos diferentes que expresan moléculas funcionales de clase II en la superficie celular, concretamente HLA-DQ, HLA-DP y HLA-DR. Las moléculas de clase I están compuestas por una cadena pesada (A, B o C) y una microglobulina beta-2 que es constante en los tres genes. Por su parte, las moléculas de clase II están compuestas por dos cadenas variables (alfa y beta). De ahí que el genotipado avanzado resulte siempre complicado en la clase II. En la tabla se ofrecen los llamados tipos serológicos, que están basados en la unión de anticuerpos. Así pues, por ejemplo «DQ3» comprende diferentes alelos de las cadenas alfa y beta del HLA-DQ que suelen hallarse juntos y reaccionan con un anticuerpo particular. Las células de la tabla son:

Denominación	Estirpe celular	Referencia bibliográfica
AL	Estirpe de linfocitos B transformados con EBV, E418	Human Immunology Volumen 51, Número 1, Noviembre 1996, Páginas 13-22

LAM	Estirpe de linfoma de linfocitos B	Oncogenomics 19 septiembre 2002, Volumen 21, Número 42, Páginas 6549-6556
HO301	Estirpe de linfocitos B transformados con EBV	The Journal of Immunology, 1998, 160: 3363-3373.
BM15	Estirpe de células Dr11 + APC	The Journal of Immunology, 2004, 173: 1876-1886
MGAR	B-LCL homocigotas	Gene Therapy (2004) 11, 1408-1415
LG2-EBV	Estirpe de linfocitos B autólogos	Cancer Immunity, Vol. 2, p. 9 (19 julio 2002)
EMJ	Estirpe de células linfoblastoides B	ECACC No. 8602103 IHW Number 9097: y Hum Immunol. 1980 Dec;1(4):363-8.

Las SEC ID N.º 1 a SEC ID N.º 3 muestran las secuencias del péptido asociado a tumor derivado de la survivina. La SEC ID N.º 3 es conforme a la presente invención.

5 Las SEC ID N.º 4 a SEC ID N.º 13 y la SEC ID N.º 24 presentan las secuencias de otros péptidos asociados a tumor usados en la presente invención.

La SEC ID N.º 14 expone las secuencias del péptido del HBV.

Las SEC ID N.º 15 a SEC ID N.º 23 presentan las secuencias de otros péptidos asociados a tumor usados en la presente invención.

10 Las SEC ID N.º 25 a SEC ID N.º 27 presentan las secuencias de otros péptidos asociados a tumor de Wang et al. (WO 2007/036638).

Las SEC ID N.º 28 a SEC ID N.º 33 muestran las secuencias de los péptidos asociados a tumor de Piesche.

Las SEC ID N.º 34 a SEC ID N.º 63 presentan las secuencias de los péptidos tal y como aparecen designados en el Ejemplo 3.

15 Las SEC ID N.º 64 y SEC ID N.º 65 presentan las secuencias de los péptidos tal y como se usan en el Ejemplo 4.

Las SEC ID N.º 66 y SEC ID N.º 72 presentan las secuencias de los péptidos tal y como se usan en el Ejemplo 5.

Ejemplos

Ejemplo 1:

20 Identificación de los péptidos asociados a tumor presentados en la superficie celular

Muestras de tejido

25 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 péptidos.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

30 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. et al. T1999) 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.

Método dos:

35 Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase invertida (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 invertida 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 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 SECUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia. La Fig. 1 muestra un ejemplo de espectro obtenido de tejido tumoral correspondiente al péptido asociado a MHC de clase I NCAN-001.

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

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 criogenizaron 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.

El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Amsterdam, 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.

La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent)

Experimentos con micromatrices

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, CA, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. 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 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-ficoeritina 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 por defecto en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal se ajustó de forma arbitraria en 1,0.

El perfil de expresión del gen originario NCAN del péptido NCAN-001 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

Motivos peptídicos HLA-DR derivados de la survivina (swissprot: O15392)

Predicción de epítomos: La predicción de los posibles ligandos de HLA-DR se llevó a cabo con la base de datos virtual SYFPEITHI. En resumen, la secuencia de la survivina se cribó con un patrón de matriz que evalúa cada aminoácido de la secuencia noámera central de los péptidos 15ámeros que encajan en el motivo HLA-DR

correspondiente. A los residuos de anclaje se les dan valores de hasta 10; a otros residuos se les puntúa hasta 3, reflejando las preferencias de aminoácidos para ciertas posiciones dentro del péptido. La puntuación máxima teórica de un péptido candidato oscila entre 28 y 43; las puntuaciones de los abundantes ligandos naturales superan normalmente los 20 puntos.

- 5 TLGEFLKDRERAKN (SED ID N.º 1) (o versiones truncadas) ocupa los primeros puestos de los péptidos en 5 de las 6 predicciones.

DRB1*01 (puntuación teórica máxima 43)

	58	FFCFKELEGWEPDDD (SEC ID N.º 34)	36
	98	LGEFLKDRERAKNK (SEC ID N.º 35)	28
10	22	FKNWPFLEGCCTPE (SEC ID N.º 36)	28

DRB1*03 (puntuación teórica máxima 40)

	99	GEFLKDRERAKNKI (SEC ID N.º 37)	29
	10	WQPFLKDHRIKTFKN (SEC ID N.º 38)	26
	3	APLPPAWQPFLKDH (SEC ID N.º 39)	25

- 15 DRB1*04 (puntuación teórica máxima 28)

	98	LGEFLKDRERAKNK (SEC ID N.º 40)	28
	10	WQPFLKDHRIKTFKN (SEC ID N.º 41)	28
	3	APLPPAWQPFLKDH (SEC ID N.º 42)	26

DRB1*07 (puntuación teórica máxima 34)

20	121	KKEFEETAEKVRRAI (SEC ID N.º 43)	24
	128	AEKVRRAIEQLAAMD (SEC ID N.º 44)	24
	3	APLPPAWQPFLKDH (SEC ID N.º 45)	22
	16	DHRISTFKNWPFLG (SEC ID N.º 46)	20
	28	LEGCCTPERMAEAG (SEC ID N.º 47)	18
25	40	EAGFIHCPTENEPDL (SEC ID N.º 48)	18
	93	FEEL TLGEFLKDRE (SEC ID N.º 49)	16
	103	KLDRERAKNKIAKET (SEC ID N.º 50)	16

DRB1*11 (puntuación teórica máxima 38)

	98	LGEFLKDRERAKNK (SEC ID N.º 51)	32
30	83	GCAFLSVKKQFEELT (SEC ID N.º 52)	24
	58	FFCFKELEGWEPDDD (SEC ID N.º 53)	22

DRB1*15 (puntuación teórica máxima 34)

	95	EL TLGEFLKDRERA (SEC ID N.º 54)	30
	19	ISTFKNWPFLGCAC (SEC ID N.º 55)	28
35	55	AQCFFCFKELEGWEP (SEC ID N.º 56)	28

Pasos para tomar la decisión sobre la secuencia

1. Para cada péptido se precisa una secuencia noámera central para la unión al HLA-DR. Secuencias centrales predichas:

	DRB1*01	FLKDRERA (SEC ID N.º 57)
40	DRB1*03	LKDRERAK (SEC ID N.º 58)
	DRB1*04	FLKDRERA (SEC ID N.º 59)
	DRB1*11	FLKDRERA (SEC ID N.º 60)
	DRB1*15	LGEFLKDR (SEC ID N.º 61)

2. Combinar las secuencias centrales para obtener una secuencia central promiscua:

- 45 Combinada: LGEFLKDRERAK (SEC ID N.º 62)

3. Añadir secuencias flanqueantes hasta obtener la longitud final de 15 aminoácidos:

Final: TLGEFLKDRERAK (SEC ID N.º 63)

ejemplo 4

Se llevó a cabo un estudio clínico para confirmar la inmunogenicidad del péptido con la SEC ID N.º 1. El objetivo principal del estudio era investigar la respuesta del PSA (antígeno específico de próstata) (PSA-R) a la administración subcutánea de un panel de péptidos específicos de la próstata (vacunación) en pacientes con recidiva bioquímica tras prostatectomía radical sin detección de lesiones metastásicas evidentes.

- 5 El objetivo secundario del estudio consistió en investigar la tolerabilidad y la viabilidad del tratamiento vacunal en pacientes con carcinoma de próstata, con especial hincapié en los fenómenos inmunitarios en términos de respuesta de los linfocitos T.

El estudio se diseñó como un ensayo prospectivo y aleatorizado de fase I/II para la indicación de «recidiva bioquímica tras prostatectomía radical sin detección de lesiones metastásicas evidentes».

10 *Población del estudio*

Como parte de este estudio de fase I/II se intentó inducir la regresión del PSA como indicador del cese del crecimiento tumoral mediante la vacunación con un panel de péptidos específicos de la próstata en pacientes HLA-A*02⁺ que presentaban recidiva bioquímica tras la prostatectomía radical. La combinación de péptidos específicos de la próstata se administró por vía subcutánea y se evaluó la magnitud de la respuesta inmunitaria en el contexto de varias formas de administración de las estructuras antigénicas.

- 15 A diferencia de los estudios de vacunación anteriores, el estudio priorizó el tratamiento de pacientes que presentaban una pequeña carga tumoral todavía indetectable con las técnicas de imagen. Todos los pacientes fueron vacunados del mismo modo utilizando conocidas estructuras antigénicas específicas de la próstata para estimular la respuesta inmunitaria contra las células malignas. Se trató a 19 pacientes.

20 **Tabla 7. Población del estudio**

	Total	%	Mediana	Rango
Edad	19		63	55 - 77
Tratamiento neo-/adyuvante previo				
Ninguno	11	58		
Radiación	3	16		
Hormonoterapia intermitente	2	11		
Rad. + Int. Horm. Int.	2	11		
Rad. + Quimioterapia	1	5		
Clasificación TNM en el momento de la prostatectomía radical (RPX)				
T2a-c R0	6	32		
T3a-c R0	6	32		
T2a-c R1	3	16		
T3a-c R1	3	16		
T3aN2 R0	1	5		
Escala de Gleason				
5 - 7	10	53		
8 - 10	3	16		
Desconocido	6	32		
Meses entre la RPX y la vacunación			41	9 - 124
Primera recidiva postquirúrgica, meses			14	1 - 90
PSA al iniciar la vacunación			0.76	0,14 – 10,8

Esquema de tratamiento

Una vez descartadas las lesiones metastásicas manifiestas con la tomografía computadorizada y la gammagrafía ósea, la vacuna de péptidos específicos contra la próstata se administró por vía subcutánea conforme a las diferentes formas de administración a pacientes con recidiva del PSA que habían sido sometidos a prostatectomía radical (aumento del PSA: elevación del 50% en dos análisis realizados como mínimo con 14 días de diferencia). La vacuna se administró ocho veces los días 0, 7, 14, 28, 42 y 56 (aproximadamente 100 microgramos de cada péptido en cada inyección). Después de cada vacunación y de nuevo el día 70, se midió la concentración de PSA para evaluar la respuesta al tratamiento.

Si se detectaba respuesta del tumor (remisión completa [PSA-CR] o remisión parcial [PSA-PR] o estabilización clínica [sin cambio, PSA-NC]), el paciente recibía la vacuna una vez al mes como tratamiento de mantenimiento con la forma de administración seleccionada en cada caso. La respuesta del paciente al tratamiento de vacunación se evaluó detalladamente del modo indicado a continuación:

Remisión completa (PSA-CR): Normalización de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas. La normalización se definió como un valor mínimo del PSA < 0,2 ng/ml, que cabría esperar después de la prostatectomía radical con extirpación completa del tumor o de la próstata.

Remisión parcial: a) PSA-PR ≤ 80% (Reducción de un 80% de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas); y b) PSA-PR ≤ 50% (Reducción de un 50% de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas);

Enfermedad estable (PSA-SD): Ningún cambio significativo durante un período mínimo de cuatro semanas. Esto incluye la estabilización y una reducción inferior al 50% y un aumento inferior al 10%, confirmada por la medición después de un intervalo de al menos 4 semanas.

Progresión (PSA-PD): Aumento de la concentración de PSA superior al 10%. El estudio se daba por concluido para el paciente si aparecía progresión del PSA.

Una vez admitidos los pacientes en el estudio se les administraba la vacuna de epítomos específicos; se tuvieron en cuenta las proteínas que se expresan específicamente en las células epiteliales de la próstata (p. ej. PSMA / PSCA). Además de investigar la eficacia general de la vacuna controlando el crecimiento de las fracciones residuales del tumor mediante la cuantificación regular de las concentraciones de PSA, el estudio investigó los efectos de los diversos métodos de vacunación sobre la modulación del sistema inmunitario. Además de la simple administración subcutánea de los péptidos acordes con la invención solos también se probaron diversas combinaciones con adyuvantes. La vacuna incluyó una combinación de al menos 6 péptidos derivados de PSA, PSCA, PSMA, survivina, TRP-P8 y prostéina, respectivamente. Como control positivo se utilizó un péptido derivado de la MP gripal. Como epítomos para los linfocitos T cooperadores se emplearon péptidos derivados del PSMA y de la survivina. En concreto se empleó Montanide por la liberación lenta y el efecto adyuvante que consigue en las vacunas peptídicas (Montanide consiste en el clásico adyuvante incompleto de Freund adaptado para la administración en humanos), que recientemente ha sido descrito muy favorablemente. Con este fin, antes de la administración se mezclaron 500 µl de la solución de péptidos con 500 µl de Montanide. Así se obtiene una emulsión de agua en aceite que libera lentamente el antígeno contenido en la fase acuosa durante varias semanas. La estabilidad física de la emulsión es muy alta, y a 4 °C se puede conservar durante más de tres meses sin una separación apreciable de las fases. La liberación lenta de Montanide se ha aprovechado en varios ensayos de vacunación con buenos resultados (Oka et al., 2004).

En una rama del estudio se investigó la eficacia de la vacunación con la estimulación simultánea del sistema inmunitario con factores de crecimiento, GM-CSF y solución inyectable Leukine®. El GM-CSF es un adyuvante muy habitual en los ensayos de vacunación con péptidos y en varios se ha descrito la potenciación de la respuesta clínica y de los linfocitos T. Inicialmente, el GM-CSF actúa como un factor de reclutamiento y de diferenciación de las células dendríticas que se cree que potencia el número de estas en el punto de inyección de la vacuna. Aunque el GM-CSF no activa por sí solo las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y los macrófagos sí se ha descrito la activación indirecta en condiciones *in vivo* (Molenkamp et al., 2005).

Otra rama del estudio investigó la eficacia de la vacunación con la activación simultánea de las células dendríticas mediante el uso epicutáneo del imiquimod. El imiquimod se administró en forma de pomada al 5% (Aldara). Ejerce una potente acción inmunoestimuladora a través de su efecto sobre las células TLR7-positivas (p. ej. células dendríticas plasmocitoides, células de Langerhans, células dendríticas dérmicas), que activa la vía dependiente de MyD88. Las APC activadas liberan citocinas inflamatorias y estimuladoras de los linfocitos T, regulan al alza la coestimulación y migran a los ganglios linfáticos invadidos por el tumor. En modelos con animales se ha demostrado el potencial de imiquimod para estimular la respuesta de los CTL inducida por los péptidos con la mezcla de los antígenos en la pomada o con la aplicación de Aldara sobre el punto de administración por vía s.c. o inyección i.d. de los antígenos.

Otra rama del estudio investigó la eficacia de la vacunación con la activación concomitante de las células dendríticas mediante su mezcla con ARNm de la mucina-1 estabilizado con protaminas para activar los TLR 7/8. El ARNm genera una amplia activación de las poblaciones de células inmunitarias de ratón y humanas. La incorporación a la formulación de la proteína polibásica protamina aumenta la semivida del ARNm y propicia la formación de partículas que probablemente prolongan la liberación. Así pues, este adyuvante combina propiedades de liberación lenta con la activación de las APC.

En resumen, las formas de administración de la vacuna incluyeron las siguientes estrategias:

- a) Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada con Montanide
- 10 b) Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500 µl de Montanide en combinación con la administración tópica de 225 µl de GM-CSF con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria más potente gracias a la administración simultánea de factores de crecimiento;
- c) Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500 µl de Montanide en combinación con hipertermia local, esta última con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria más potente por el efecto térmico;
- 15 d) Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500 µl de Montanide en combinación con imiquimod epicutáneo a fin de activar las células dendríticas a través del TLR 7;
- e) Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500 µl de Montanide en combinación con 55 µl de ARNm de mucina-1/protamina a fin de activar las células dendríticas a través de los TLR 7/8.

Calendario

20 La duración total del estudio fue de tres años. Las vacunas con los péptidos específicos de próstata se administraron a los pacientes los días 0, 7, 14, 28, 42 y 56. En los pacientes con enfermedad estable o con respuesta objetiva del tumor (PSA-CR o PSA-PR) las vacunas se administraron una vez al mes por vía i.d. hasta detectar progresión. A tenor de la experiencia hasta la fecha, las inyecciones de péptidos se toleran sin reacciones adversas significativas. Como la respuesta al tratamiento vacunal se evaluó exclusivamente con la serología a través de las concentraciones de PSA, al inicio del estudio se efectuó un análisis para determinar si la vacuna administrada interfería con la medición de las concentraciones de PSA *in vitro*, de modo que pudiera semejar una respuesta clínica. Los días 0, 7, 25 14, 28, 42, 56 y 70 se extrajeron muestras de sangre para las analíticas clínicas, la concentración de PSA, el hemograma diferencial, el análisis de FACS y citocinas. Si el tratamiento duraba más de 70 días se practicaba un control regular del PSA cada 6 semanas para detectar oportunamente el fracaso terapéutico.

30 El tratamiento concluía si se verificaba la progresión de la enfermedad con la elevación continua del PSA.

A partir del día 84 el tratamiento de vacunación se administró cada 4 semanas hasta verificar la progresión o hasta el día 420 (15 meses). Las decisiones referentes a la continuación del tratamiento fuera del estudio en los casos de éxito se tomaron de forma individualizada. Durante el estudio no hubo reacciones adversas imprevistas.

35 Las analíticas incluyeron pruebas de coagulación, electrolitos, LDH, β2-M, CK, enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, proteína total, coagulación, CRP, hemograma diferencial con extensión, concentración de PSA, citocinas, FACS y Elispot.

El análisis de la reacción cutánea a antígenos bacterianos y fúngicos conocidos (48-72 horas después de la administración, hipersensibilidad retardada (DTH), mediada por linfocitos T, se empleó para analizar el sistema inmunitario celular del paciente antes de iniciar el estudio)

40 Los péptidos necesarios para el estudio (nonapéptidos) se fabricaron en el laboratorio del Dr. Stefan Stevanovic del departamento del catedrático H. G. Rammensee. Los péptidos se purificaron con HPLC y se analizaron con espectrometría de masas. La pureza de los péptidos también se puede verificar con HPLC, espectrometría de masas y secuenciación de Edman. Con estos métodos se puede obtener una pureza de hasta el 98% (que se puede considerar el máximo por el estado actual de los métodos). Los péptidos sintetizados se disolvieron en DMSO (CryoSure, WAK Chemie Medical GmbH; 10 mg/ml), se diluyeron 1:10 con Ampuwa (Fresenius Kabi), y se fraccionaron en alícuotas en condiciones estériles.

Respuesta clínica

50 En dos pacientes el estudio de TEP-TAC reveló recurrencia local después de detectar el tumor local mediante tacto rectal continuo. En los 17 pacientes restantes la localización de la actividad de la enfermedad no se pudo verificar al acabar el estudio.

Los hemogramas diferenciales y los análisis bioquímicos completos reiterados no revelaron anomalías ni cambios durante el estudio.

55 Dieciséis de los 19 pacientes reaccionaron al péptido de la survivina II (IFN-g ELISPOT, +/- ICS) acorde con la SEC ID N.º 1. Entre ellos hubo 12 que manifestaron una respuesta de linfocitos T contra la survivina después de la vacunación, dos que ya presentaban linfocitos T anti-survivina antes de ello y otros dos en los que no se pudo determinar si los linfocitos T anti-survivina eran abundantes antes de la vacunación.

Respuesta bioquímica

La respuesta completa se definió como todo valor de PSA indetectable según el límite de detección del laboratorio colaborador después de haber presentado inicialmente un valor elevado de PSA. Para confirmar la medición esta tenía que verificarse tras un intervalo mínimo de cuatro semanas. La PR > 80% y > 50% tenían que volver a analizarse al cabo de cuatro semanas. La enfermedad estable se definió como cualquier valor del PSA comprendido entre una reducción inferior al 50% y un aumento inferior al 10% que se volvía a confirmar al cabo de como mínimo cuatro semanas. La enfermedad progresiva se definió como todo aumento del PSA superior al 10% respecto al inicio del tratamiento.

La respuesta bioquímica de los pacientes que concluyeron el estudio se siguió controlando hasta que comenzaron a recibir otro tratamiento con radioterapia local o privación de andrógenos. Diecinueve pacientes accedieron a participar y sus datos se analizaron; el período de seguimiento más largo duró alrededor de 3,75 años.

Estabilidad del PSA y aumento del TD

Dos pacientes (10,2%) manifestaron estabilización de los valores de PSA según los susodichos criterios de recidiva bioquímica, por los cuales no se produjo ningún aumento del valor del PSA superior al 10% desde el inicio del tratamiento hasta el final del estudio (Fig. 6, Tablas 8, 9 y 10). El seguimiento de los dos casos se prolongó hasta 14 y 16 meses después de la última aplicación de la vacuna. La duración media de la estabilidad fue de 24 meses (28 y 31) en el momento de la fecha límite de datos con una media de 18 vacunaciones (14 y 20) aplicadas.

Uno de los dos pacientes presentó respuesta parcial >50% durante un período de 9 meses, seguida por un período de lento incremento del PSA con un tiempo de duplicación de 20,5 en comparación con los 9,8 meses observados antes del tratamiento. La recidiva inicial del PSA había comenzado 18 meses después de la extirpación de un tumor apT2pN0 Gleason 5.

En el análisis de los datos el paciente 8 mostró enfermedad estable desde el inicio del programa de vacunación hacía 28 meses. Pero tuvo que abandonarlo al cabo de 10 meses debido a una reacción alérgica después de recibir la 14^o vacunación. Presentaba una situación desfavorable con tumor pT3b Gleason 3+4 con un valor mínimo del PSA no inferior a 0,6 ng/ml tras la prostatectomía radical y progresión del PSA tras un declive postquirúrgico inicial. El tiempo de duplicación se frenó pasando de 6,6 a 148 meses.

Ambos pacientes recibieron imiquimod dérmico en el punto de aplicación con cada vacunación peptídica (Figuras 9, 10 y 11, Tabla 13).

Aumento del TD del PSA sin estabilidad del mismo

El TD del PSA del paciente 11 aumentó de 1,5 a 10,1 meses en los primeros seis meses del estudio. Como había comenzado con un PSA de 10,8 ng/ml y progresó hasta 17,8 ng/ml se le retiró de los procedimientos del estudio para recibir supresión androgénica en monoterapia sin que se visualizara ninguna lesión maligna en el TEP-TAC. Recibió Aldara como adyuvante.

El paciente 16 comenzó con el tratamiento a base de vacuna acompañada de ARNm de la mucina-1/protamina con un tiempo de duplicación de 6,1 meses. La velocidad del PSA se redujo hasta un tiempo de semivida de 2,7 meses durante cinco meses, seguidos por un repunte calculado estadísticamente del TD del PSA de 14,4 meses que continuaba 16 meses después de comenzar el tratamiento. Su PSA inicial de 0,29 ng/ml se redujo a 0,19 ng/ml durante los 5 primeros meses de tratamiento del estudio, volvió a aumentar a 0,4 ng/ml en los 8 meses siguientes y 19 meses después de iniciar el tratamiento concluyó el estudio conforme al protocolo con 0,41 ng/ml (Fig. 7, Tablas 8 y 10).

Progresión del PSA

El paciente 5 manifestó progresión durante el estudio según el tiempo de duplicación del PSA calculado antes de recibir las vacunas. No obstante, experimentó un declive del PSA con un tiempo de semivida de 20,2 meses después del final del tratamiento durante un periodo continuo de 10 meses hasta la fecha límite de recogida de datos. Después de concluir las vacunaciones seguía sin recibir ningún tratamiento secundario. Las vacunas se le administraron con Montanide como único adyuvante (Figura 8, Tabla 13).

Tabla 8: Tiempo de duplicación del PSA en meses

	Total	%	Media geométrica	Rango del TD
TD del PSA antes de la vacunación, en meses	19		8,3	1,5 – 44,8
TD del PSA al final del estudio o al final del seguimiento	18*		11,2	2,2 -148

(continuación)

	Total	%	Media geométrica	Rango del TD
Sin cambio del TD del PSA durante la vacunación	11	58		2,2 – 44,8
Elevación del TD del PSA continuaba al final del estudio	4	21		
Sin cambio del TD del PSA durante la vacunación pero después descendió	1	5		
Descenso provisional del PSA o aumento del TD seguido por un descenso del TD	3	16		
* El TD del PSA que presentaba este paciente al final del estudio o al final del seguimiento no quedó incluido. 5 debido al descenso del PSA				

Tabla 9: Estabilidad del PSA con un aumento no superior al 10% respecto al valor inicial del PSA

	PSA inicial ng/ml	PSA final del estudio ng/ml	PSA final del seguimiento ng/ml	Meses desde nivel basal
Pac. 3	0,7	0,51	0,73	31
Pac. 8	1,76	1,84	1,85	28

5

Tabla 10: Incremento permanente del TD del PSA durante la vacunación, en meses

	1º TD antes de los meses de vacunación	2º TD durante los meses de vacunación	3º TD durante los meses de vacunación
Pac. 3	9,8	- 2,3	20,5
Pac. 8	6,6	148	
Pac. 11	1,5	10,1	
Pac. 16	6,1	-2,7	14,4
Media geométrica del TD	4,9	25,8	

Tabla 11: Sin cambio del TD del PSA durante la vacunación (meses) pero con declive posterior

	1º TD antes de los meses de vacunación	2º TD durante los meses de vacunación
Pac. 5	3,2	- 20,2

Tabla 12: Descenso/estabilidad transitoria del TD del PSA (meses) seguido por aumento acelerado

	1º TD antes de los meses de vacunación	2º TD durante los meses de vacunación	3º TD durante los meses de vacunación	4º TD durante los meses de vacunación
Pac. 7	3,7	21,5	2,8	
Pac. 15	1,3	25,8	-9,9	7,4
Pac. 17	10,2	-1,9	4,8	

10

Tabla 13: Adyuvantes y respuesta del paciente. Sin respuesta del PSA (-), descenso transitorio del PSA con posterior aumento acelerado (+/-), incremento del TD del PSA (+)

Sin adyuvantes	Respuesta	Aldara	Respuesta	Hipertermia	Respuesta	Gm-CSF	Respuesta	ARN	Respuesta
Pac. 1	-	Pac. 3	+	Pac. 13	-	Pac. 4	-	Pac. 16	+
Pac. 2	-	Pac. 7	+/-	Pac. 10	-	Pac. 6	-	Pac. 17	+/-
Pac. 5	-	Pac. 8	+			Pac. 12	-	Pac. 18	-
Pac. 9	-	Pac. 11	+			Pac. 14	-	Pac. 19	-
						Pac. 15	+/-		

Síntesis

Los péptidos se sintetizaron de forma totalmente automática con el sintetizador de péptidos EPS 221 fabricado por Abimed. El programa de síntesis se ajusta a los protocolos indicados por el fabricante. Siempre que es posible se anotan los números de lote de los reactivos empleados en la fabricación de cada lote de péptido.

5 *Procesamiento del péptido bruto*

El procesamiento del péptido bruto consistió en la separación del mismo de la resina de síntesis y la eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales con TFA / fenol / etanoditiol / tioanisol / agua (90/3,75/1,25/2,5/2,5, porcentajes en volumen) durante 1 h o 3 h (péptidos con arginina). El péptido bruto se precipitó con metil-tert-butiléter, se lavó también con metil-tert-butiléter y dos veces con dietiléter, se secó y el sedimento formado por el péptido se diluyó con ácido acético. De nuevo se volvió a precipitar con dietiléter, se secó, se resuspendió en agua y se liofilizó.

HPLC preparativa

Sistema de HPLC Varian "Star", columna cromatográfica de 250 x 10 mm con C18 y 5 µm (Ziemer). Solvente móvil A: agua con TFA al 0,1%, solvente móvil B: acetoneitrilo con TFA al 0,08%. El gradiente utilizado para la separación está orientado a la hidrofobicidad del péptido. Las fracciones de péptido separadas se liofilizan.

Análisis

Se registró un cromatograma HPLC y un espectro de masas MALDI de cada péptido para demostrar la identidad (mediante la masa molar reflejada en el espectro de masas) y la pureza (con las áreas de los picos del cromatograma HPLC).

20 *Péptidos sintéticos y estímulos*

Los péptidos sintéticos empleados para la estimulación y las pruebas funcionales fueron el epítipo derivado del VIH (HIV gag 164-181: YVDRFYKTLRAEQASQEV (SEC ID N.º 65), control negativo); el PSMA 459-473: NYTLRVDCTPLMYSL (SEC ID N.º 64) y el survivina 97-111: TLGEFLKLDREKAKN (SEC ID N.º 1). La enterotoxina estafilocócica B (SEB, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) se utilizó como control positivo de la estimulación de los linfocitos T CD4⁺ en el ELISPOT con interferón-γ.

Amplificación in vitro de los linfocitos T específicos

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de pacientes con carcinoma de próstata en diferentes intervalos de tiempo durante la vacunación que se conservaron congeladas en nitrógeno líquido con suero fetal bovino al 90% y DMSO al 10%. Una vez descongeladas, se cultivaron aproximadamente 5 x 10⁶ células (placas de cultivo celular de 24 pocillos, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania) con medio IMDM complementado con penicilina 50 U/ml, estreptomina 50 µg/ml (todos de Biowhittaker, Verviers, Bélgica), suero humano termoinactivado al 10% (c.c.pro, Neustadt, Alemania) y beta-mercaptoetanol 50 µM a 37°C y CO₂ al 7,5%. El día 1 se añadieron mezclas de péptidos sintéticos de unión a HLA de clase II, cada uno en una concentración de 5 µg/ml y el cultivo se complementó con IL-2 recombinante humana (r-hIL2, R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Alemania) en los días 2, 5, 7 y 9 de la estimulación de los linfocitos T.

Ensayo de puntos por inmunoadsorción ligada a enzima (ELISPOT)

La funcionalidad de los linfocitos T expandidos se analizó con un ensayo ELISPOT con interferón-γ siguiendo las recomendaciones del comité de seguimiento de CIMT (CIMT Monitoring Panel; www.c-imt.org). En suma, las células se recolectaron a los 12 días de cultivo, se lavaron, contaron y sembraron con medio de cultivo en una placa ELISPOT (Millipore, Schwalbach, Alemania). Se analizaron por duplicado o triplicado entre 0,15 y 0,25 x 10⁶ células en presencia de los péptidos sintéticos con una concentración de 2,5 µg/ml o bien con SEB en una concentración 1 µg/ml. La producción de IFN-γ se detectó con una pareja de anticuerpos monoclonales específicos (1D1-k y 7-B6-1, ambos de Mabtech, Nacka Strand, Suecia) tras 26 horas de incubación a 37°C y CO₂ al 5%. Se añadieron ExtraAvidina-fosfatasa alcalina y sustrato BCIP/NBT (ambos de Sigma-Aldrich) durante 1 hora y durante 10 min, respectivamente. El análisis ELISPOT se llevó a cabo con lectores ImmunoSpot (Series 3A y 5, Cellular Technology Ltd, Aalen, Alemania).

Tinción intracelular de citocinas

Las células recuperadas del ensayo ELISPOT se siguieron cultivando en presencia de r-hIL2 2 ng/ml durante nueve días más. Después de ese período de reestimulación, las células efectoras se recolectaron, se lavaron y se estimularon en un ensayo estándar con los péptidos a 5 µg/ml o con PMA e ionomicina (50 ng/ml y 1 µM, respectivamente) en presencia de Golgi-STOP (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Después de un período de incubación de 6 horas, las células se lavaron con PBS, FCS al 1% y NaN₃ al 0,02% y se tificaron con los anticuerpos monoclonales (AcM) CD4-APC-Cy7 (BD Biosciences) y CD8-PE-Cy7 (Beckman Coulter) durante 20 min a 4°C y a oscuras. Después de una fase de lavado, las células se

5 permeabilizaron durante 20 min con el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) y después se tiñeron durante 30 minutos para visualizar las citocinas intracelulares. Los AcM utilizados fueron: IFN- γ -FITC, IL-10-PE (ambos de BD Biosciences), IL-5-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y TNF- α -Pacific Blue (Biolegend, San Diego, California, EE. UU.). La adquisición de las células se llevó a cabo con un citómetro Canto II, con software Diva y análisis con FlowJo (BD Biosciences).

Ejemplo 5

Unión de BIR-11, BIR-12 y BIR-13 a HLA-A*0211

10 El objetivo de este análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos C-terminales de BIR-004 (ELTLGEFLKLDREERAKN (SEC ID N.º 2)) hacia la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A*0211 ya que de este alelo se ha descrito su capacidad para unirse a péptidos portadores de residuos de asparragina en el extremo C-terminal. Los ligandos MHC con la N c-terminal no son muy frecuentes y solo hemos analizado 66 péptidos que la tengan en dicho extremo C-terminal. La gran mayoría no reconocen ligandos MHC, salvo contadas excepciones: RLYNFSFLN (SEC ID N.º 66) se une con fuerza a A*0211 y también YADGGQWYN (SEC ID N.º 67) se une a A*0211...”).

15 Las pruebas indican con claridad que la unión al HLA-A*0211 se da en el caso del BIR-11 (nonúmero C-terminal: KLDREERAKN (SEC ID N.º 68)) y, en concentraciones elevadas, con el BIR-13 (decámero C-terminal: LKLDREERAKN (SEC ID N.º 69)), pero no con el BIR-12 (octámero C-terminal: LDREERAKN (SEC ID N.º 70)). El péptido que sirvió como control positivo (Secuencia: FLPSDYFPSV (SEC ID N.º 71)) mostró claras propiedades de unión.

Fundamento de la prueba

20 El ensayo se preparó del modo siguiente: 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*0211 solas se puede conservar convirtiéndolas en equivalentes funcionales de «moléculas HLA-A*0211 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 SYLVESTERHVID2002 /id).

30 Moléculas recombinantes y purificadas de HLA-A*0211 se incubaron con b2m y dosis escalonadas del péptido de interés. La cantidad de complejos de HLA/péptido plegados *de novo* 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 de HLA/péptido de calibración. La desviación en las mediciones resultó demasiado grande para obtener valores K_D fiables, aunque se puede decir que el valor K_D del BIR13 se haya comprendido en el intervalo del control positivo, mientras que el valor K_D del BIR-11 es mayor. Cuanto más bajo es el valor de K_D mayor es la afinidad hacia el HLA-A*0211.

35 Puntuaciones de unión del nonúmero BIR-11 y del nonúmero BIR-11a frente a varios alelos con SYFPEITHI

KLDREERAKD (SEC ID N.º 72).	ID del alelo	Nombre del alelo	Puntuación relativa	Puntuación
KLDREERAKD	74	A*0301	0,45	20
KLDREERAKD	65	A*0201	0,42	15
KLDREERAKD	99	B*1501 (B62)	0,36	10
KLDREERAKD	334	A*0101	0,28	14

KLDREERAKN

KLDREERAKD (SEC ID N.º 68).	ID del alelo	Nombre del alelo	Puntuación relativa	Puntuación
KLDREERAKN	74	A*0301	0,45	20
KLDREERAKN	65	A*0201	0,42	15
KLDREERAKN	99	B*1501 (B62)	0,36	10
KLDREERAKN	334	A*0101	0,28	14

Lista de referencias bibliográficas

Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Imran AK (2007). Survivin expression correlates with unfavourable prognoses in invasive ductal carcinoma of the breast. Med J Malaysia 62, 6-8.

- al-Sheneber IF, Shibata HR, Sampalis J, Jothy S (1993). Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 71, 1954-1959.
- Angileri FF, Aguenouz M, Conti A, La TD, Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008). Nuclear factor-kappaB activation and differential expression of survivin and Bcl-2 in human grade 2-4 astrocytomas. *Cancer*.
- 5 Apostolopoulos V, McKenzie IF (1994). Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev. Immunol.* 14, 293-309.
- 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.
- 10 Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000). Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J Neurosci.* 20, 2427-2438.
- Bamias A, Chorti M, Deliveliotis C, Trakas N, Skolarikos A, Protogerou B, Legaki S, Tsakalou G, Tamvakis N, Dimopoulos MA (2003). Prognostic significance of CA 125, CD44, and epithelial membrane antigen in renal cell carcinoma. *Urology* 62, 368-373.
- 15 Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ (1989). Specific, Major Histocompatibility Complex-Unrestricted Recognition of Tumor-Associated Mucins by Human Cytotoxic T Cells. *PNAS* 86, 7159-7163.
- Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9, 71-79.
- 20 Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P (2000). Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95, 3964-3969.
- Berger M, Bergers G, Arnold B, Hammerling GJ, Ganss R (2005). Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 105, 1094-1101.
- 25 Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC, . (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67, 2376-2380.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- 30 Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Kloog Y (2006). Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2337-2347.
- Borset M, Seidel C, Hjorth-Hansen H, Waage A, Sundan A (1999). The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in multiple myeloma and other blood malignancies. *Leuk. Lymphoma* 32, 249-256.
- 35 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.
- Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D (2004). Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol.* 26, 177-181.
- 40 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.
- Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR (1997). Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol.* 182, 347-355.
- 45 Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W (1999a). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
- Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W (1999b). Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 93, 4309-4317.
- 50 Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W (2000). Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 96, 3102-3108.
- Browner MF, Smith WW, Castelano AL (1995). Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry* 34, 6602-6610.
- 55 Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol* 1, 459-468.
- Cao Y, Karsten U, Zerban H, Bannasch P (2000). Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. *Virchows Arch.* 436, 119-126.
- 60 Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F, Belli F, Mezzanzanica D, Costa A, Andreola S, Leo E, Parmiani G, Castelli C (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 63, 4507-4515.
- Castellino F, Huang AY, tan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890-895.
- 65 CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006.
- Ref Type: Internet Communication
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002). Quantitatively

- determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20, 1063-1068.
- Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, O'Hanlon TP (2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. *Hum. Immunol.* 65, 1211-1223.
- 5 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.
- Chen X, Higgins J, Cheung ST, Li R, Mason V, Montgomery K, Fan ST, van de RM, So S (2004). Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod. Pathol.* 17, 1198-1210.
- 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.
- 10 Cresswell P (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 259-293.
- 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 SECUential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.
- 15 De VL, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40, 235-271.
- Delsol G, Al ST, Gatter KC, Gerdes J, Schwarting R, Caveriviere P, Rigal-Huguet F, Robert A, Stein H, Mason DY (1988). Coexpression of epithelial membrane antigen (EMA), Ki-1, and interleukin-2 receptor by anaplastic large cell lymphomas. Diagnostic value in so-called malignant histiocytosis. *Am. J. Pathol.* 130, 59-70.
- 20 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.
- 25 Denys H, De WO, Nusgens B, Kong Y, Sciot R, Le AT, Van DK, Jadidizadeh A, Tejpar S, Mareel M, Alman B, Cassiman JJ (2004). Invasion and MMP expression profile in desmoid tumours. *Br. J Cancer* 90, 1443-1449.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW (2005). Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909-2915.
- Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, . (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147-154.
- 30 Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.
- Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van WC (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 61, 5911-5918.
- 35 Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C, Kane JP (2001). Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J. Lipid Res.* 42, 620-630.
- Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, Kunitake ST, Naya-Vigne J, O'Connor PM, Malloy MJ, Kane JP (1997). Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J. Biol. Chem.* 272, 25576-25582.
- 40 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, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854.
- 45 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.
- 50 Duperray C, Klein B, Durie BG, Zhang X, Jourdan M, Poncelet P, Favier F, Vincent C, Brochier J, Lenoir G, . (1989). Phenotypic analysis of human myeloma cell lines. *Blood* 73, 566-572.
- Engel M, Maurel P, Margolis RU, Margolis RK (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. I. cellular sites of synthesis of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 366, 34-43.
- 55 Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-749.
- Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barratt-Boyes SM (1995). MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. *Immunol. Rev.* 145, 61-89.
- 60 Fischer J, Palmedo G, von KR, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
- Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG (2001). Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 8809-8814.
- 65

- Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 125, 669-680.
- 5 Fujita K, Denda K, Yamamoto M, Matsumoto T, Fujime M, Irimura T (1999). Expression of MUC1 mucins inversely correlated with post-surgical survival of renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 80, 301-308.
- Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GF, Webb CP (2001). Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10722-10727.
- 10 Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-5589.
- Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, Suyama T, Naya Y, Ito H, Nikaido T, Ishikura H (2004). Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J. Pathol.* 203, 551-558.
- 15 Gaire M, Magbanua Z, McDonnell S, McNeil L, Lovett DH, Matrisian LM (1994). Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J Biol Chem.* 269, 2032-2040.
- 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.
- 20 Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 383-393.
- Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell J (1988). A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.* 263, 12820-12823.
- 25 Gerner EW, Meyskens FL, Jr. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4, 781-792.
- Gherardi E, Stoker M (1991). Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells* 3, 227-232.
- Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol. Chem.* 283, 5188-5194.
- 30 Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillett C, Taylor-Papadimitriou J (1989). A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int. J. Cancer* 43, 1072-1076.
- 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.
- 35 Gong L, Jiang C, Zhang B, Hu H, Wang W, Liu X (2006). Adenovirus-mediated Expression of Both Antisense Ornithine Decarboxylase and S-adenosylmethionine Decarboxylase Induces G(1) Arrest in HT-29 Cells. *J Biochem. Mol. Biol* 39, 730-736.
- Grumet M, Friedlander DR, Sakurai T (1996). Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 319-330.
- 40 Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU (1994). Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol. Chem.* 269, 12142-12146.
- 45 Grunda JM, Nabors LB, Palmer CA, Chhieng DC, Steg A, Mikkelsen T, Diasio RB, Zhang K, Allison D, Grizzle WE, Wang W, Gillespie GY, Johnson MR (2006). Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol.* 80, 261-274.
- Gursky S, Olopade OI, Rowley JD (2001). Identification of a 1.2 Kb cDNA fragment from a region on 9p21 commonly deleted in multiple tumor types. *Cancer Genet. Cytogenet.* 129, 93-101.
- 50 Halaban R (1999). Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 333-343.
- Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasini P, Nagy ZA, Sinigaglia F (1995). Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp. Med* 181, 1847-1855.
- 55 Hanada K, Yewdell JW, Yang JC (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-256.
- Hedberg Y, Davoodi E, Roos G, Ljungberg B, Landberg G (1999). Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 84, 268-272.
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW (1998). Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294, 309-321.
- 60 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. 20-6-2006.
- 65 Herz C, Aumailley M, Schulte C, Schlotzer-Schrehardt U, Bruckner-Tuderman L, Has C (2006). Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281, 36082-36090.

- Hwang ML, Lukens JR, Bullock TN (2007). Cognate memory CD4+ T cells generated with dendritic cell priming influence the expansion, trafficking, and differentiation of secondary CD8+ T cells and enhance tumor control. *J Immunol.* 179, 5829-5838.
- 5 Jadeski LC, Chakraborty C, Lala PK (2003). Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int. J. Cancer* 106, 496-504.
- Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- 10 Jarvinen TA, Liu ET (2006). Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 6, 579-602.
- Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 182, 399-411.
- Jucker M, Gunther A, Gradl G, Fonatsch C, Krueger G, Diehl V, Tesch H (1994). The Met/hepatocyte growth factor receptor (HGFR) gene is overexpressed in some cases of human leukemia and lymphoma. *Leuk. Res.* 18, 7-16.
- 15 Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2003). Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 97, 1077-1083.
- Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P (2002). Culprit and victim -- DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol.* 3, 235-243.
- 20 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.
- Kloeker S, Major MB, Calderwood DA, Ginsberg MH, Jones DA, Beckerle MC (2004). The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 279, 6824-6833.
- 25 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.
- Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57, 5391-5398.
- 30 Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Vasmataz G (2005). Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res.* 11, 5128-5139.
- Kraus S, Abel PD, Nachtmann C, Linsenmann HJ, Weidner W, Stamp GW, Chaudhary KS, Mitchell SE, Franke FE, Lalani e (2002). MUC1 mucin and trefoil factor 1 protein expression in renal cell carcinoma: correlation with prognosis. *Hum. Pathol.* 33, 60-67.
- 35 Kurokawa Y, Matoba R, Nakamori S, Takemasa I, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M, Kato K (2004). PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 23, 135-141.
- 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.
- 40 Leontiou C, Lightowers R, Lakey JH, Austin CA (2003). Kinetic analysis of human topoisomerase IIalpha and beta DNA binding by surface plasmon resonance. *FEBS Lett.* 554, 206-210.
- Leroy X, Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N (2002). Expression of human mucin genes in normal kidney and renal cell carcinoma. *Histopathology* 40, 450-457.
- 45 Lew DJ, Dulic V, Reed SI (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-1206.
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20, 8125-8135.
- 50 Li H, Leung TC, Hoffman S, Balsamo J, Lilien J (2000). Coordinate regulation of cadherin and integrin function by the chondroitin sulfate proteoglycan neurocan. *J Cell Biol.* 149, 1275-1288.
- Lin TS, Chiou SH, Wang LS, Huang HH, Chiang SF, Shih AY, Chen YL, Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Chou MC, Kuo SJ, Chow KC (2004). Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 12, 717-723.
- 55 Littau RA, Takeda A, Cruz J, Ennis FA (1992). Vaccinia virus-specific human CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol.* 66, 2274-2280.
- Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q (2006). Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 905-913.
- 60 Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, Sette A (1997). The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159, 1383-1392.
- Lo ML, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De RG, Altieri DC (2001). Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 249-254.
- 65 Loden M, Stighall M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Ostlund H, Landberg G (2002). The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic

- aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene* 21, 4680-4690.
- Louhelainen J, Wijkstrom H, Hemminki K (2000). Initiation-development modelling of allelic losses on chromosome 9 in multifocal bladder cancer. *Eur. J. Cancer* 36, 1441-1451.
- Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.
- 5 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.
- Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, Gorunova L, Høglund M, Karhu R, Kallioniemi A (2002). Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 35, 353-358.
- 10 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.
- 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.
- 15 Margolis RK, Rauch U, Maurel P, Margolis RU (1996). Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 273-290.
- Mark AS, Mangkornkanok M (1989). B-cell lymphoma marking only with anti-epithelial membrane antigen. *Cancer* 63, 2152-2155.
- 20 Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B (2000). Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol.* 165, 6047-6055.
- Maulik G, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, Lin J, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, Salgia R (2002). Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 620-627.
- Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 71, 2454-2460.
- 25 McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci.* 19, 10778-10788.
- Mellai M, Caldera V, Patrucco A, Annovazzi L, Schiffer D (2008). Survivin expression in glioblastomas correlates with proliferation, but not with apoptosis. *Anticancer Res.* 28, 109-118.
- 30 Meyer-Puttlitz B, Junker E, Margolis RU, Margolis RK (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J Comp Neurol.* 366, 44-54.
- Miyazaki K, Hattori Y, Umenishi F, Yasumitsu H, Umeda M (1990). Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line. *Cancer Res.* 50, 7758-7764.
- 35 Mizuno K, Higuchi O, Ihle JN, Nakamura T (1993). Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 178-186.
- Molenkamp BG, Vuylsteke RJ, van Leeuwen PA, Meijer S, Vos W, Wijnands PG, Scheper RJ, de Gruijl TD (2005). Matched skin and sentinel lymph node samples of melanoma patients reveal exclusive migration of mature dendritic cells. *Am. J Pathol.* 167, 1301-1307.
- 40 Monajemi H, Fontijn RD, Pannekoek H, Horrevoets AJ (2002). The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 79, 539-546.
- Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, Aaronson SA (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ.* 9, 355-365.
- 45 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.*
- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog. Brain Res.* 137, 313-332.
- 50 Mori M, Barnard GF, Mimori K, Ueo H, Akiyoshi T, Sugimachi K (1995). Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas. *Cancer* 75, 1516-1519.
- Mortara L, Castellani P, Meazza R, Tosi G, De Lerma BA, Procopio FA, Comes A, Zardi L, Ferrini S, Accolla RS (2006). CIITA-induced MHC class II expression in mammary adenocarcinoma leads to a Th1 polarization of the tumor microenvironment, tumor rejection, and specific antitumor memory. *Clin Cancer Res.* 12, 3435-3443.
- 55 Mott JD, Werb Z (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol* 16, 558-564.
- Nakamura T, Tabuchi Y, Nakae S, Ohno M, Saitoh Y (1996). Serum carcinoembryonic antigen levels and proliferating cell nuclear antigen labeling index for patients with colorectal carcinoma. Correlation with tumor progression and survival. *Cancer* 77, 1741-1746.
- 60 Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501-504.
- 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.
- 65

- Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.
- 5 Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, Hayashi T, Hinoda Y, Imai K (1997). Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. *Int. Immunol.* 9, 791-798.
- 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.
- O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M (2003). Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr. Cancer Drug Targets.* 3, 131-152.
- 10 Ohara O, Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D, Ohira M, Seki N, Nomura N (1997). Construction and characterization of human brain cDNA libraries suitable for analysis of cDNA clones encoding relatively large proteins. *DNA Res.* 4, 53-59.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Uda K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13885-13890.
- 15 Penna A, Fowler P, Bertolotti A, Guilhot S, Moss B, Margolskee RF, Cavalli A, Valli A, Fiaccadori F, Chisari FV, . (1992). Hepatitis B virus (HBV)-specific cytotoxic T-cell (CTL) response in humans: characterization of HLA class II-restricted CTLs that recognize endogenously synthesized HBV envelope antigens. *J Virol.* 66, 1193-1198.
- 20 Piesche M, Hildebrandt Y, Zettl F, Chapuy B, Schmitz M, Wulf G, Trumper L, Schroers R (2007). Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Hum. Immunol.* 68, 572-576.
- Pons E, Uphoff CC, Drexler HG (1998). Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk. Res.* 22, 797-804.
- Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, Comoglio PM (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 13, 4600-4608.
- 25 Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol* 27, 1-10.
- Previsani N, Lavanchy D (2002). Hepatitis B. World Health Organization Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. 2002 WHO/CDS/CSR/LYO/2002. 2:Hepatitis B.
- 30 Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT (2002). Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62, 589-596.
- 35 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.
- 40 Quantin B, Murphy G, Breathnach R (1989). Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 28, 5327-5334.
- Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int. J. Cancer* 88, 726-732.
- 45 Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL (2000). Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 53, 635-644.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- 50 Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.
- 55 Rauch U, Feng K, Zhou XH (2001). Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 1842-1856.
- Rehermann B, Nascimbeni M (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 215-229.
- Retzler C, Gohring W, Rauch U (1996). Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Biol. Chem.* 271, 27304-27310.
- 60 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.
- 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.
- 65 Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and

- clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 481-506.
- Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* 1155, 357-371.
- 5 Ruiz M, Kobayashi H, Lasarte JJ, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Celis E, Sarobe P (2004). Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 10, 2860-2867.
- Sablitzki 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.
- Sadler E, Klausegger A, Muss W, Deinsberger U, Pohla-Gubo G, Laimer M, Lanschuetzer C, Bauer JW, Hintner H (2006). Novel KIND1 gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement. *Arch. Dermatol.* 142, 1619-1624.
- 10 Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St CB, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (2001). A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 294, 1343-1346.
- Saino M, Maruyama T, Sekiya T, Kayama T, Murakami Y (2004). Inhibition of angiogenesis in human glioma cell lines by antisense RNA from the soluble guanylate cyclase genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. *Oncol. Rep.* 12, 47-52.
- 15 Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K (2007). Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol.* 82, 193-198.
- 20 Sakaguchi A, Kikuchi A (2004). Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci.* 117, 1047-1054.
- Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA (2002). Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 104, 105-109.
- 25 Sato F, Abraham JM, Yin J, Kan T, Ito T, Mori Y, Hamilton JP, Jin Z, Cheng Y, Paun B, Berki AT, Wang S, Shimada Y, Meltzer SJ (2006). Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specific promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 465-471.
- Schmidt C, Blatt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- 30 Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, Rammensee HG, Rieber EP (2000). Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res.* 60, 4845-4849.
- Schoenberger SP, Toes RE, van de V, Ofringa R, Melief CJ (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- 35 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.
- Shedlock DJ, Shen H (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300, 337-339.
- Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D (1988). Isolation and SEQuencing of a cDNA Coding for the Human DF3 Breast Carcinoma-Associated Antigen. *PNAS* 85, 2320-2323.
- 40 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.
- Smith GM, Strunz C (2005). Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes. *Glia* 52, 209-218.
- Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB (2004). Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem.* 50, 1986-1993.
- 45 Sun JC, Bevan MJ (2003). Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300, 339-342.
- Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A (1994). Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. *J. Immunol.* 153, 2102-2109.
- 50 Takayama H, Larochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G (1997). Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 701-706.
- Takayama H, LaRochelle WJ, Anver M, Bockman DE, Merlino G (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *PNAS* 93, 5866-5871.
- 55 Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS (2005). Expression of a novel apoptosis inhibitor-survivin in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 11, 4689-4692.
- Ten KM, van der Wal JB, Sluiter W, Hofland LJ, Jeekel J, Sonneveld P, van Eijck CH (2006). The role of superoxide anions in the development of distant tumour recurrence. *Br. J. Cancer.*
- 60 Teofilii L, Di Febo AL, Pierconti F, Maggiano N, Bendandi M, Rutella S, Cingolani A, Di RN, Musto P, Pileri S, Leone G, Larocca LM (2001). Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease. *Blood* 97, 1063-1069.
- 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.
- 65 Tripathi A, Dasgupta S, Roy A, Sengupta A, Roy B, Roychowdhury S, Panda CK (2003). SEQuential deletions in both arms of chromosome 9 are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in

- Indian patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 22, 289-297.
- Troussard X, vet-Loiseau H, Macro M, Mellerin MP, Malet M, Roussel M, Sola B (2000). Cyclin D1 expression in patients with multiple myeloma. *Hematol. J.* 1, 181-185.
- 5 Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148, 225-232.
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-705.
- Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S (2005). Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J. Neurooncol.* 72, 231-238.
- 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.
- van d, V, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M, Pals ST (1997). Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J. Exp. Med.* 185, 2121-2131.
- 15 Vasef MA, Brynes RK, Sturm M, Bromley C, Robinson RA (1999). Expression of cyclin D1 in parathyroid carcinomas, adenomas, and hyperplasias: a paraffin immunohistochemical study. *Mod. Pathol.* 12, 412-416.
- 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.
- 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.
- 20 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.
- Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA (2005). Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int. J. Cancer* 114, 19-31.
- 25 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 R, Ferrell LD, Faouzi S, Maher JJ, Bishop JM (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J. Cell Biol.* 153, 1023-1034.
- 30 Weber RG, Rieger J, Naumann U, Lichter P, Weller M (2001). Chromosomal imbalances associated with response to chemotherapy and cytotoxic cytokines in human malignant glioma cell lines. *Int. J. Cancer* 91, 213-218.
- 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.
- 35 Weinstein EJ, Bourner M, Head R, Zakeri H, Bauer C, Mazarella R (2003). URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas. *Biochim. Biophys. Acta* 1637, 207-216.
- Wierecky J, Muller MR, Horger MS, Brugger W, Kanz L, Brossart P (2005). Induction of clinical and immunological responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccinations with peptide pulsed dendritic cells. *J. Clin. Oncol. (Meeting Abstracts)* 23, 2507.
- 40 Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006). Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br. J. Cancer* 94, 108-114.
- Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699.
- 45 Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, Haga Y, Murayama T, Ikei S, Kamei M, Takeno S, Kawahara K (2007). Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res.* 27, 2803-2808.
- 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.
- 50 Young AN, Amin MB, Moreno CS, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, Neish AS (2001). Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am. J. Pathol.* 158, 1639-1651.
- Zacharias U, Rauch U (2006). Competition and cooperation between tenascin-R, lecticans and contactin 1 regulate neurite growth and morphology. *J. Cell Sci.* 119, 3456-3466.
- 55 Zarella 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.
- Zarnegar R, Michalopoulos GK (1995). The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell Biol.* 129, 1177-1180.
- 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.
- 60 Zhang B, Liu XX, Zhang Y, Jiang CY, Hu HY, Gong L, Liu M, Teng QS (2006). Polyamine depletion by ODC-AdoMetDC antisense adenovirus impairs human colorectal cancer growth and invasion in vitro and in vivo. *J. Gene Med* 8, 980-989.
- Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL (2005). Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* 104, 2775-2783.
- 65

Zhou YT, Guy GR, Low BC (2005). BNIP-2 induces cell elongation and membrane protrusions by interacting with Cdc42 via a unique Cdc42-binding motif within its BNIP-2 and Cdc42GAP homology domain. Exp. Cell Res. 303, 263-274.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Immatix biotechnologies GmbH
 - <120> Nuevos y potentes péptidos del mhc de clase ii derivados de la survivina
 - <130> I31383PCT
 - <150> EP08008944.4
 - <151> 2008-05-14

- 10 <150> US 61/053,182
 - <151> 2008-05-14
 - <160> 72
 - <170> PatentIn version 3.4
 - <210> 1

- 15 <211> 15
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 1

```

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1           5           10           15

```

- 20 <210> 2
 - <211> 17
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 2

```

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
1           5           10           15

```

- 25 **Asn**
 - <210> 3
 - <211> 15
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens

- 30 <400> 3
 - <210> 4
 - <211> 16
 - <212> PRT

- 35 <213> Homo sapiens
 - <400> 4

```

Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser
1           5           10           15
1

```

- 40 <210> 5
 - <211> 9
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 5

ES 2 549 088 T3

Val Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val
1 5

5 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
1 5

10 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val
1 5

15 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Leu Leu Gly Ala Thr Cys Met Phe Val
1 5

20 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val
1 5

25 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 10

Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu
1 5

35 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
1 5

40 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

ES 2 549 088 T3

Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val
1 5

5 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

Leu Ala Ala Leu Pro His Ser Cys Leu
1 5

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

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val
1 5 10

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

Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Thr Leu
1 5

20 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile
1 5

25 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 17

Ile Leu Asp Gln Lys Ile Asn Glu Val
1 5

35 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18

ES 2 549 088 T3

Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
 1 5 10

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

Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala
 1 5 10

<210> 21
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr
 1 5 10 15

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 23

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 24

ES 2 549 088 T3

Val Leu Cys Gly Pro Pro Pro Ala Val
1 5

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 25

Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
1 5 10 15

<210> 26
<211> 15
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26

Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
1 5 10 15

<210> 27
15 <211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27

Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu
1 5 10 15

<210> 28
20 <211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28

Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 29

Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Ala Ala Ala Thr Pro Glu
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens
<400> 30

Glu Ala Gly Phe Ile His Ala Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu
1 5 10 15

ES 2 549 088 T3

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 31

Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp
 1 5 10 15

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 32

<400> 32

Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 33

<400> 33

Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 34

<400> 34

Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 35

<400> 35

Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 1 5 10 15

30 <400> 36

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 36

Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala Cys Thr Pro Glu
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 549 088 T3

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile
 1 5 10 15

<210> 38

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn
 1 5 10 15

10 <210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His
 1 5 10 15

15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 40

Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 41

Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn
 1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His
 1 5 10 15

35 <210> 43

<211> 15

<212> PRT

ES 2 549 088 T3

<213> Homo sapiens

<400> 43

Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala Glu Lys Val Arg Arg Ala Ile
 1 5 10 15

<210> 44

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Glu Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
 1 5 10 15

10 <210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp His
 1 5 10 15

15 <210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 46

Asp His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly
 1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 47

Leu Glu Gly Cys Ala Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr Glu Asn Glu Pro Asp Leu
 1 5 10 15

<210> 49

35 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

ES 2 549 088 T3

Phe Glu Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 50

Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys Ile Ala Lys Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 51

Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 15
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu Thr
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53

Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 54

Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala
 1 5 10 15

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 55

ES 2 549 088 T3

Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala Cys
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 56

Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala
 1 5

<210> 58
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
 1 5

<210> 59
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59

Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 60

Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61

Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg
 1 5

ES 2 549 088 T3

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 62

Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
1 5 10

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 63

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys
1 5 10

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 64

Asn Tyr Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu
1 5 10 15

<210> 65
<211> 18
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus

20 <400> 65

Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln
1 5 10 15

Glu Val

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 66

Arg Leu Tyr Asn Phe Ser Phe Leu Asn
1 5

30 <400> 67

<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 67

ES 2 549 088 T3

Tyr Ala Asp Gly Gly Gln Trp Tyr Asn
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 68

Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1 5

<210> 69
<211> 10
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1 5 10

<210> 70
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn
1 5

<210> 71
<211> 10
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Phe Leu Pro Ser Asp Tyr Phe Pro Ser Val
1 5 10

<210> 72
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

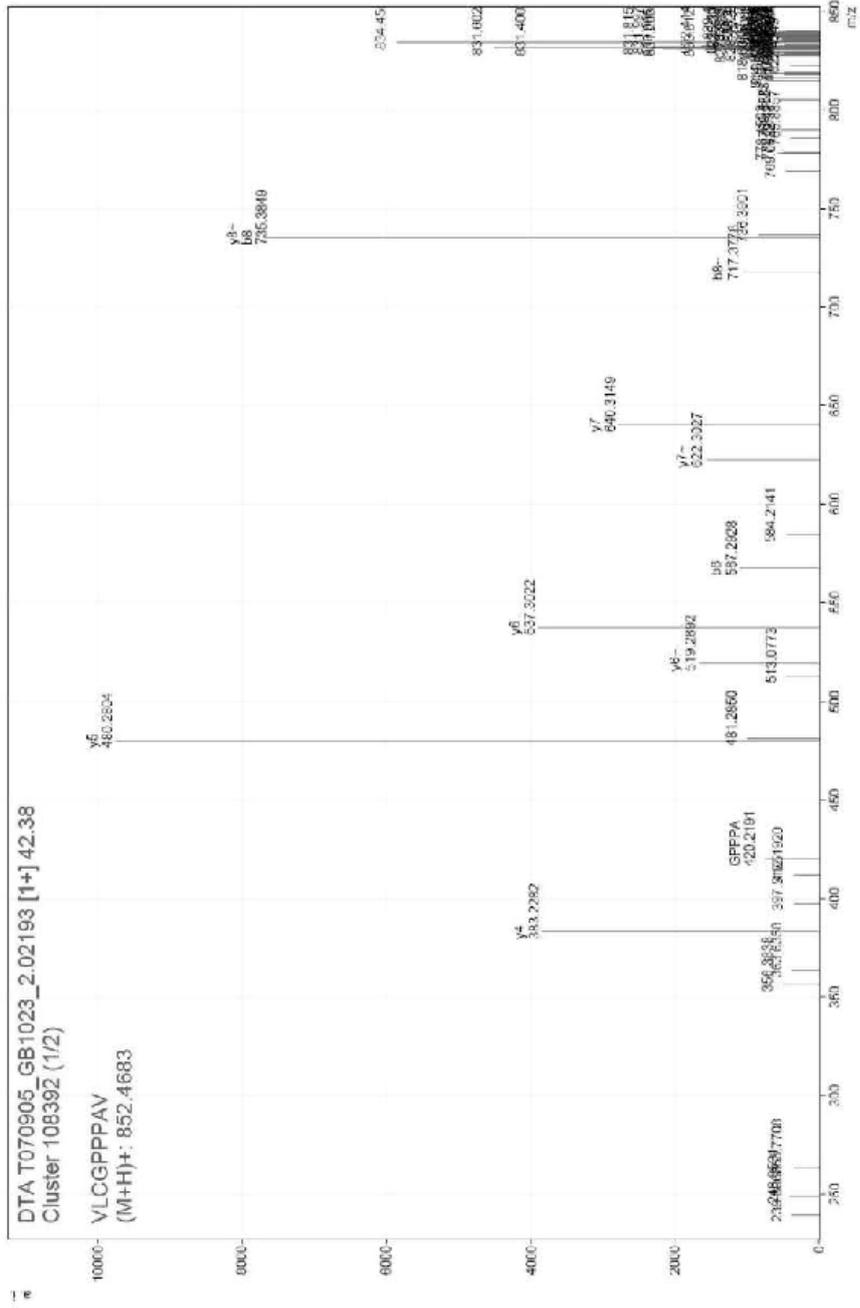
30 <400> 72

Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asp
1 5

REIVINDICACIONES

1. Péptido consistente en la SEC ID N.º 3.
2. Péptido acorde con la reivindicación 1, en que dicho péptido es capaz de estimular linfocitos T CD8 o CD4.
3. Péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que está fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.
4. Ácido nucleico, que codifica un péptido acorde con cualquiera de 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 o el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 4 para el uso en medicina.
6. Célula hospedadora que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 4, siendo dicha célula hospedadora preferiblemente una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica.
7. Método para producir un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el método el cultivo de la célula hospedadora acorde con la reivindicación 6 que expresa el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 4, y el aislamiento del péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
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 acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
9. Péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 4, la célula acorde con la reivindicación 6, un linfocito T citotóxico activado producido de acuerdo con la reivindicación 8 para el uso como medicamento en el tratamiento del cáncer, en que dicho medicamento es preferiblemente una vacuna.
10. Péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 4, la célula acorde con la reivindicación 6, un linfocito T citotóxico activado producido de acuerdo con la reivindicación 8 para el uso acorde con la reivindicación 9, en que dicho cáncer se selecciona entre: 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, p. ej. meduloblastoma, meduloepitelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, ependimoblastoma), tumores del parénquima pineal (p. ej. pineocitoma, pineoblastoma), tumores de células ependimales, tumores de los plexos coroideos, tumores neuroepiteliales de origen incierto (p. ej. gliomatosis cerebral, astroblastoma), glioblastoma, tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, cáncer de pulmón, SNC, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma epidermoide, leucemia y meduloblastoma, y otros tumores o cánceres que presenten una sobreexpresión de survivina.
11. Péptido para el uso acorde con la reivindicación 9 o 10, en combinación con al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en los péptidos acordes con las SEC ID N.º 4 a 13 y 24 en el tratamiento del cáncer renal, o para el uso en combinación con al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en los péptidos acordes con las SEC ID N.º 4, 8, 11, 12 y 15 a 24 en el tratamiento del cáncer de colon.
12. Un equipo que comprende:
 - (a) un envase que contiene una composición farmacéutica que contiene un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 4, una célula acorde con la reivindicación 6, o un linfocito T citotóxico acorde con la reivindicación 8, en solución o en forma liofilizada;
 - (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada;
 - (c) opcionalmente, al menos un péptido seleccionado del grupo consistente en los péptidos conformes a las SEC ID N.º 4 a 24; y
 - (d) opcionalmente, instrucciones de uso de la solución y/o la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.
13. Anticuerpo que es específico contra un péptido acorde con la SEC ID N.º 3 cuando forma un complejo con una molécula de HLA pertinente, siendo dicho anticuerpo preferiblemente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal y/o un anticuerpo quimérico.

Fig. 1: NCAN-001 (GB1023)



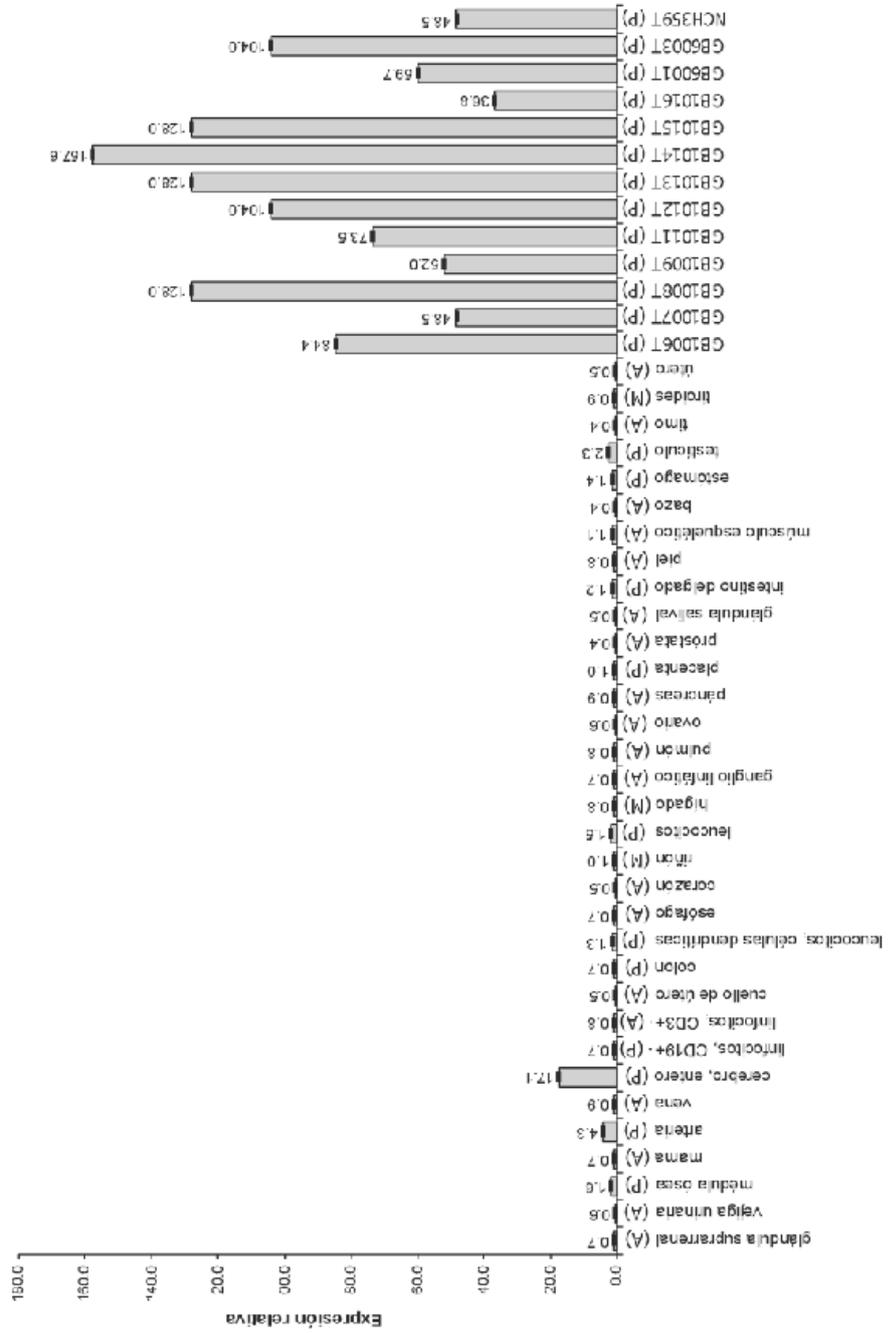


Fig. 2. Perfil de expresión del ARNm de NCAN

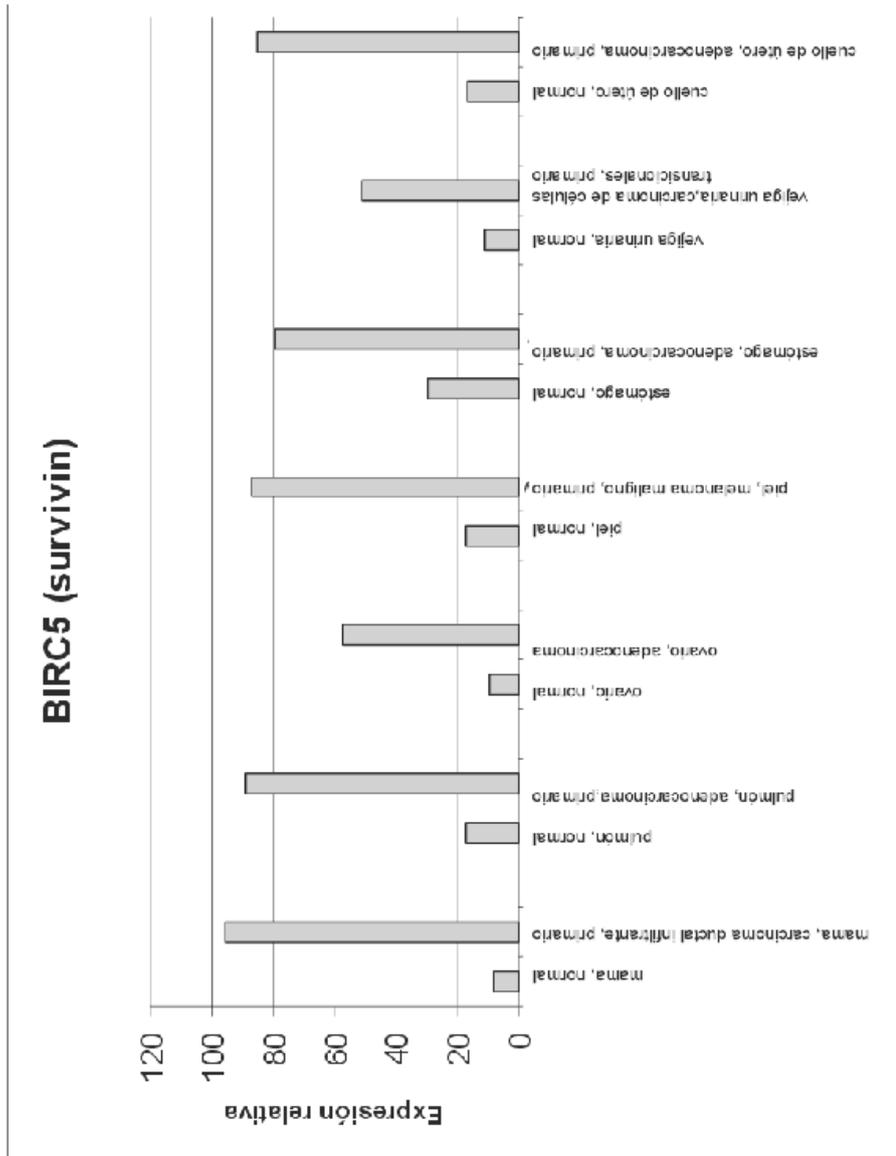


Fig. 3. Perfil de expresión relativa del ARNm de BIRC5.

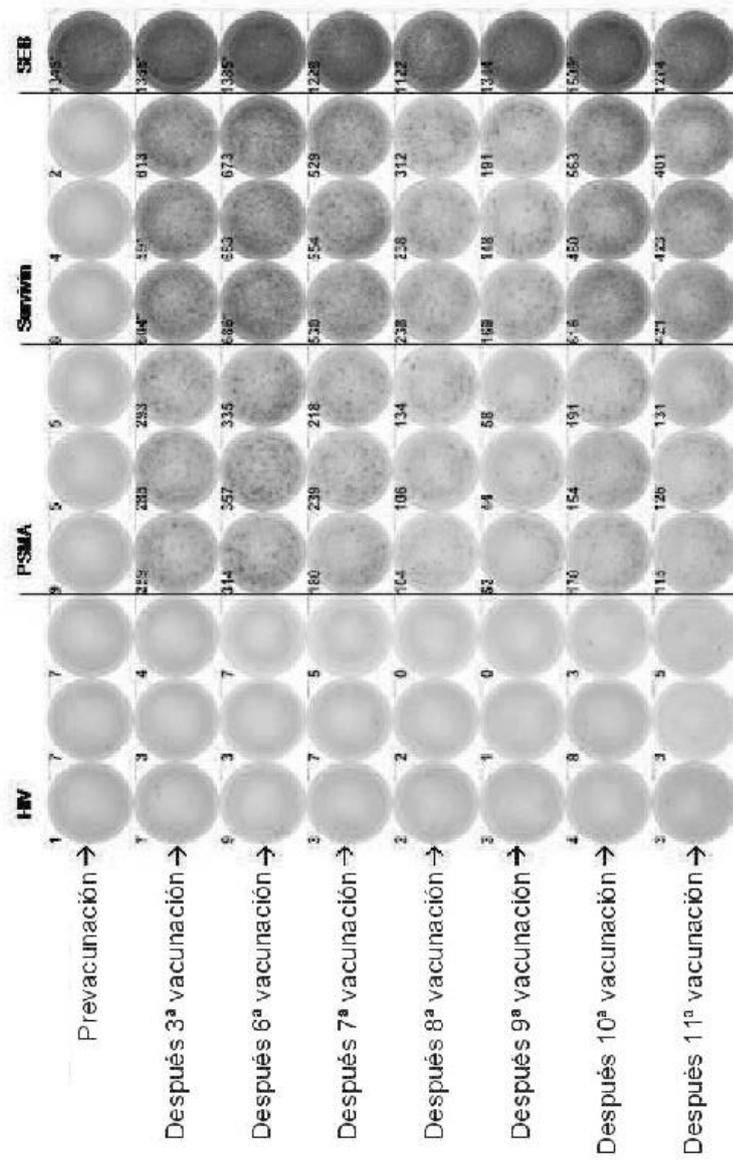


Fig. 4a: ELISpot-interferón gamma

Por medio de la prueba ELISpot-IFN γ se determinó la presencia de linfocitos T CD4⁺ secretores de IFN- γ y específicos del PSMMA y de la surivivina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídas en diferentes momentos a un paciente vacunado.

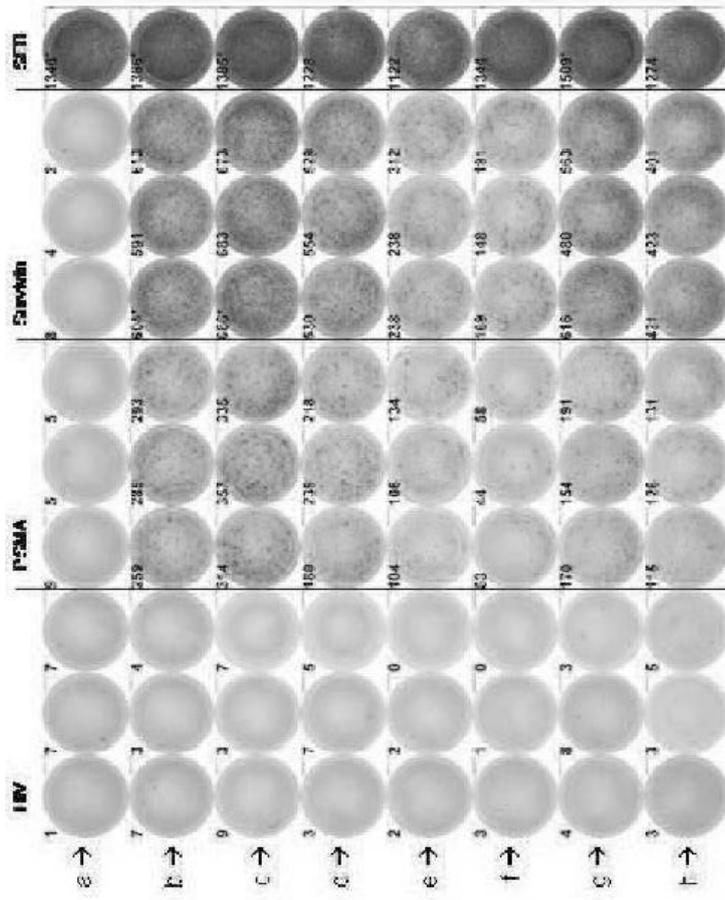


Fig. 4b: ELISpot-interferón gamma

Por medio de la prueba ELISpot-IFN γ se determinó la presencia de linfocitos T CD4 $^{+}$ secretores de IFN- γ y específicos del PSMMA y de la survivina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídas en diferentes momentos a un paciente vacunado. Momentos: prevacunación (a) y después de la 3^a (b), 6^a (c), 7^a (d), 8^a (e), 9^a (f), 10^a (g) y 11^a (h) vacunación.

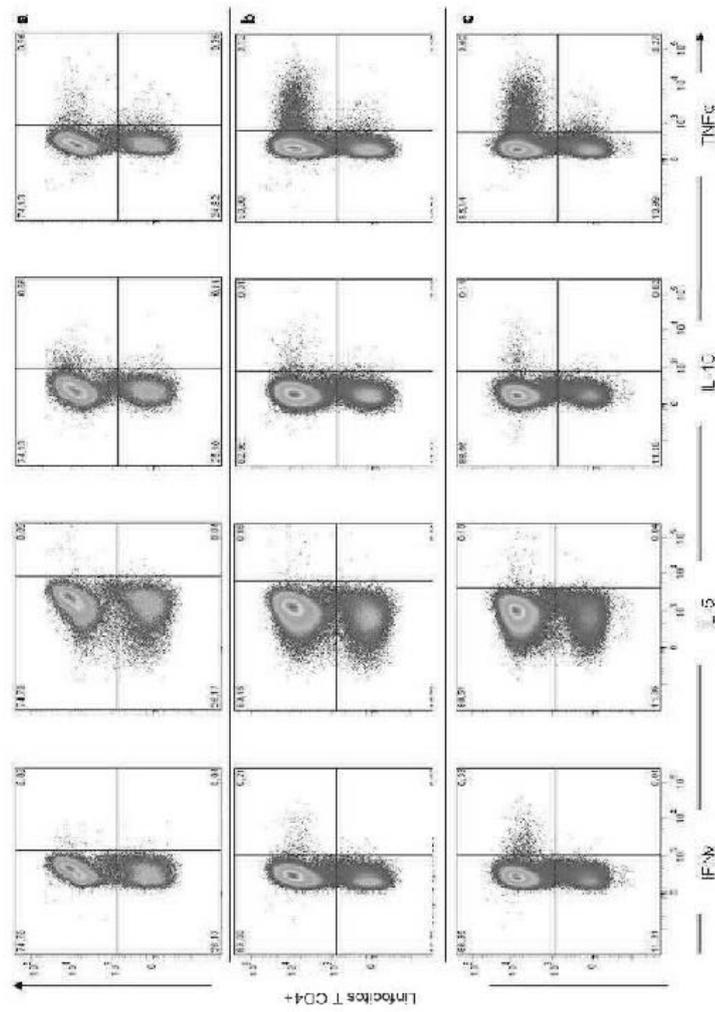
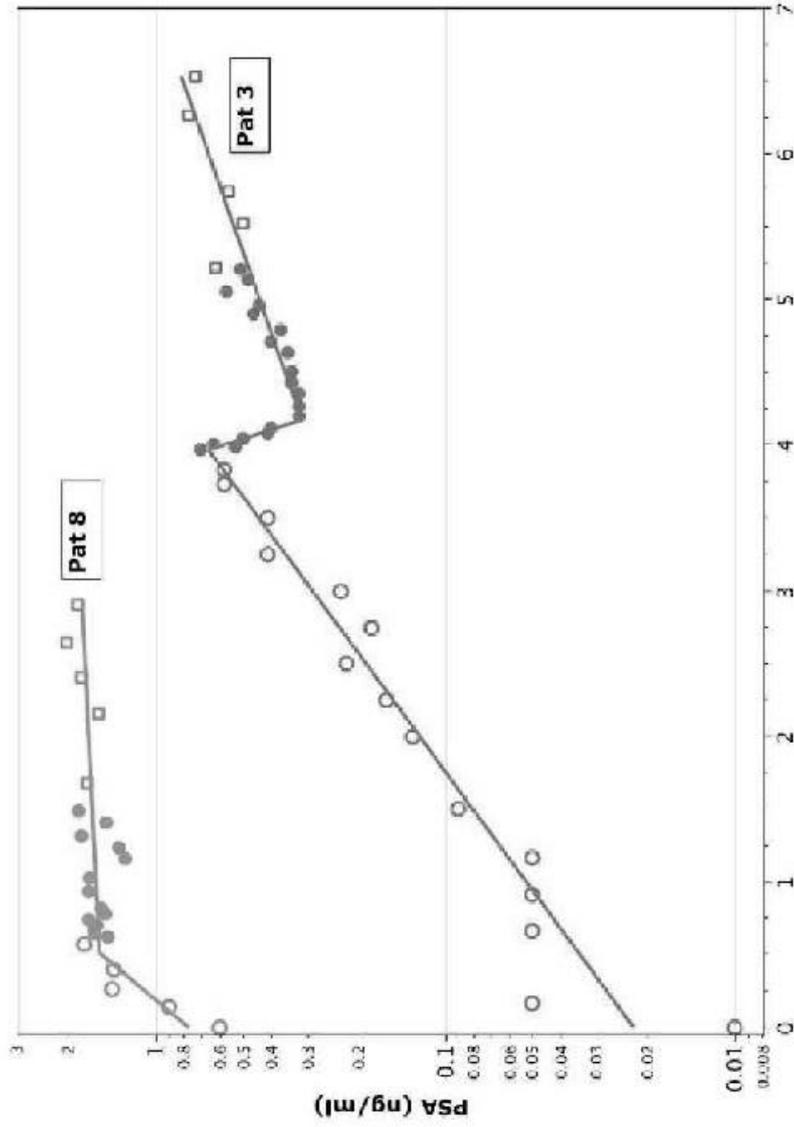


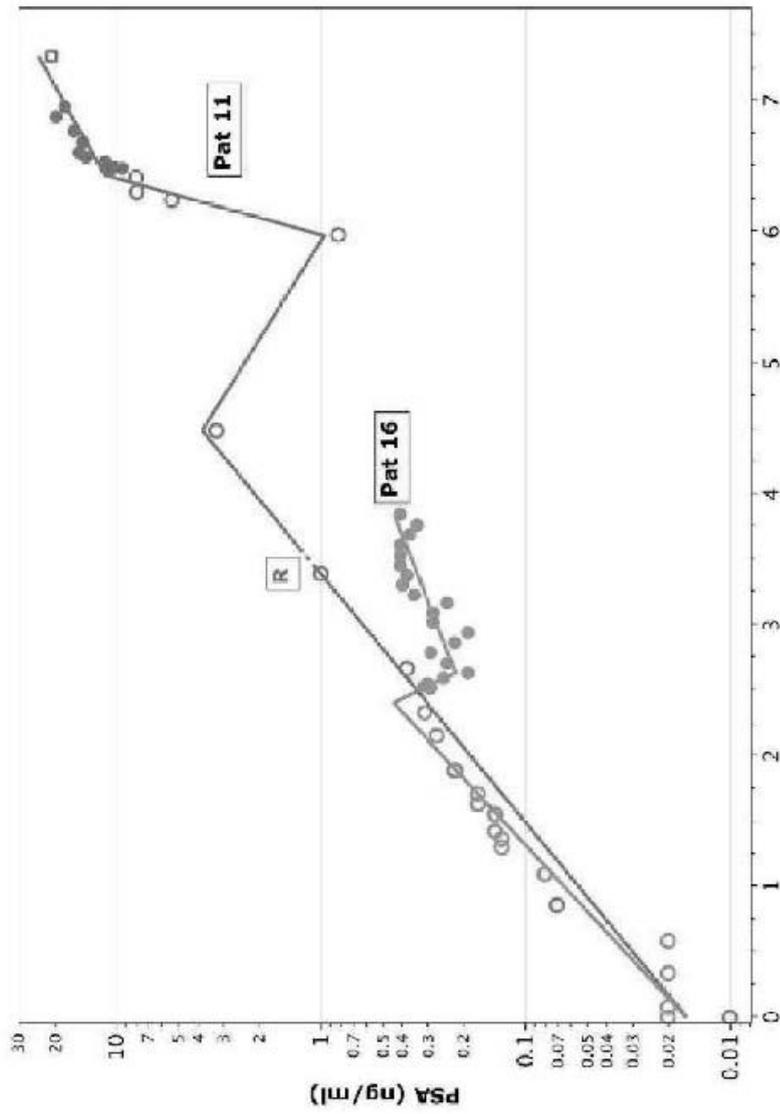
Fig. 5: Ensayo de tinción intracelular (ICS)

Por medio del ensayo de tinción intracelular se determinó la presencia de linfocitos T CD4⁺ secretores de IFN- γ , IL-5, IL-10 y TNF- α específicos de la surivina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídas en tres momentos distintos a un paciente vacunado. Momentos: después de la 1^a (a), 3^a (b) y 7^a (c) vacunaciones.



Tiempo transcurrido desde la prostatectomía radical (años)

Fig. 6. Estabilidad del PSA sin aumento superior al 10% respecto al valor inicial del mismo.
(Pat = Paciente)



Tiempo transcurrido desde la prostatectomía radical (años)

Figura 7. Incremento del TD del PSA sin estabilidad de éste

(Pat = Paciente)

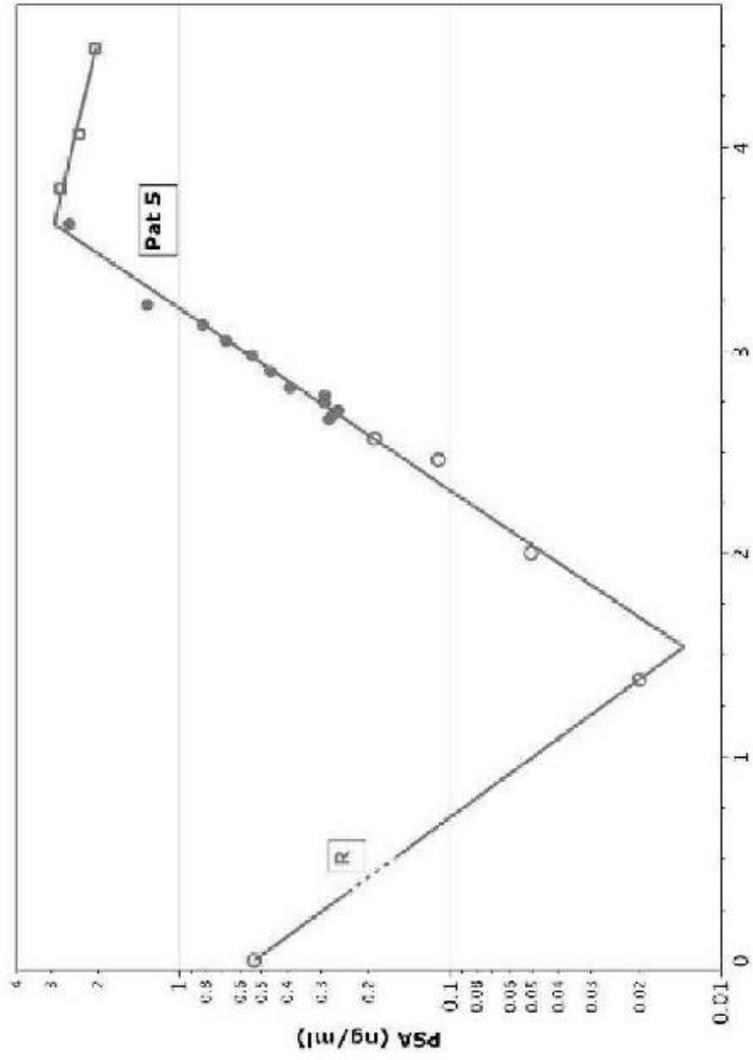
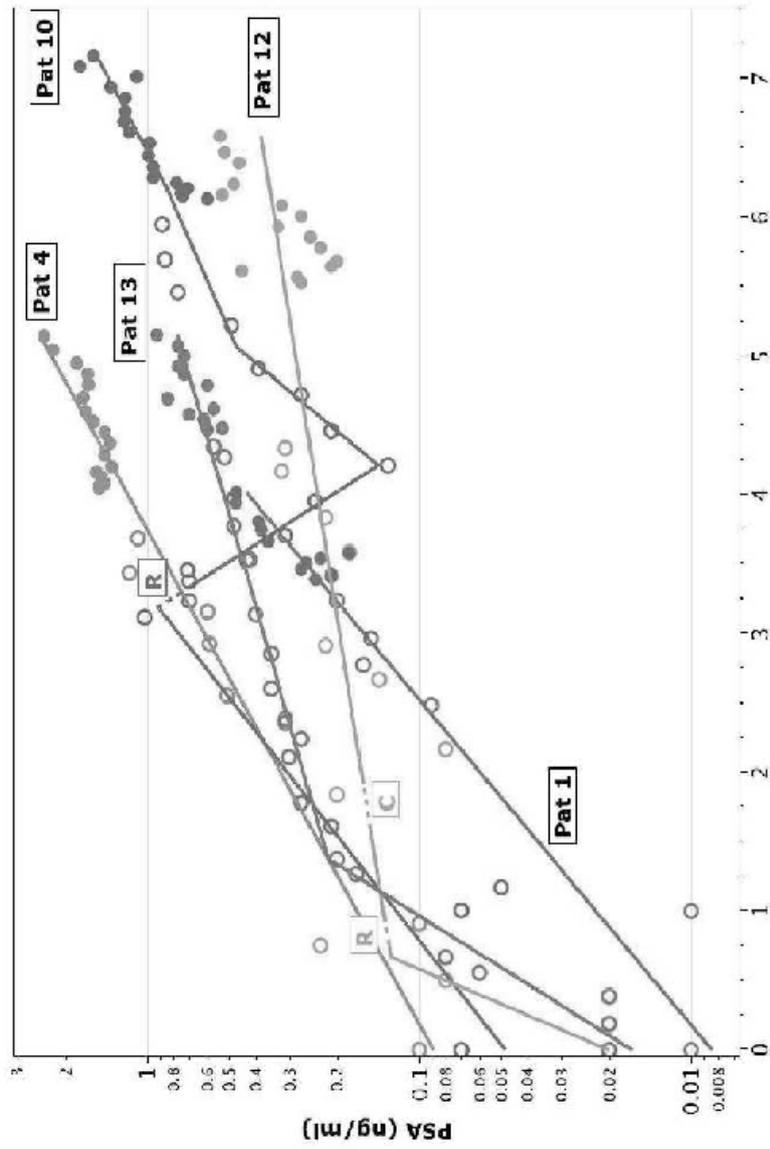
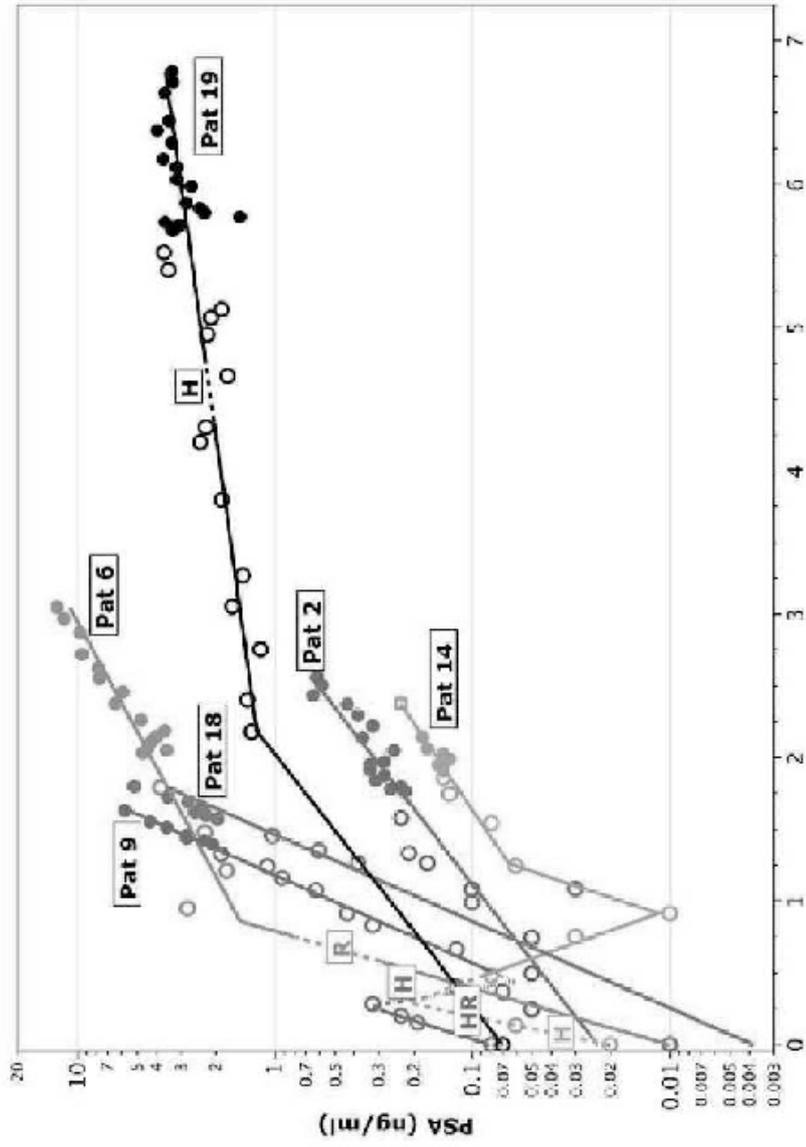


Figura 8. TD del PSA inalterado durante la prostatectomía radical, pero con declive posterior (Pat = Paciente)



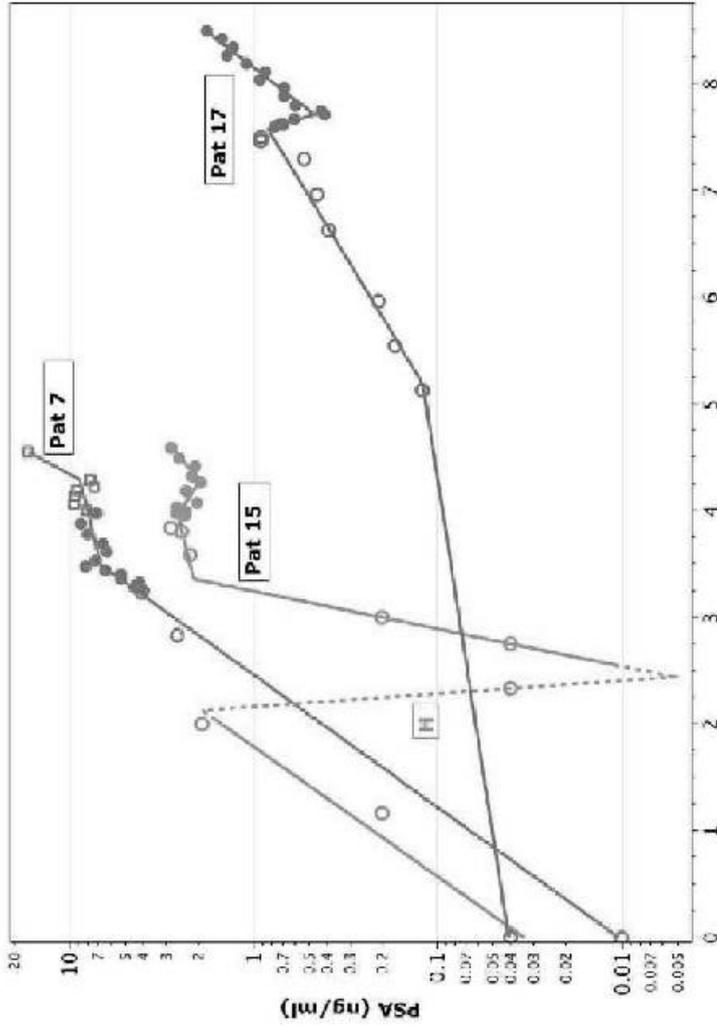
Tiempo transcurrido desde la prostatectomía radical (años)

Figura 9. TD del PSA inalterado durante la vacunación (Pat - Paciente)



Tiempo transcurrido desde la prostatectomía radical (años)

Figura 10. TD del PSA inalterado durante la vacunación
(Pat. Paciente)



Tiempo transcurrido desde la prostatectomía radical (años)

Figura 11. Declive transitorio del PSA o incremento del TD seguido por disminución de éste (Pat. Paciente)

Legenda de la figura:

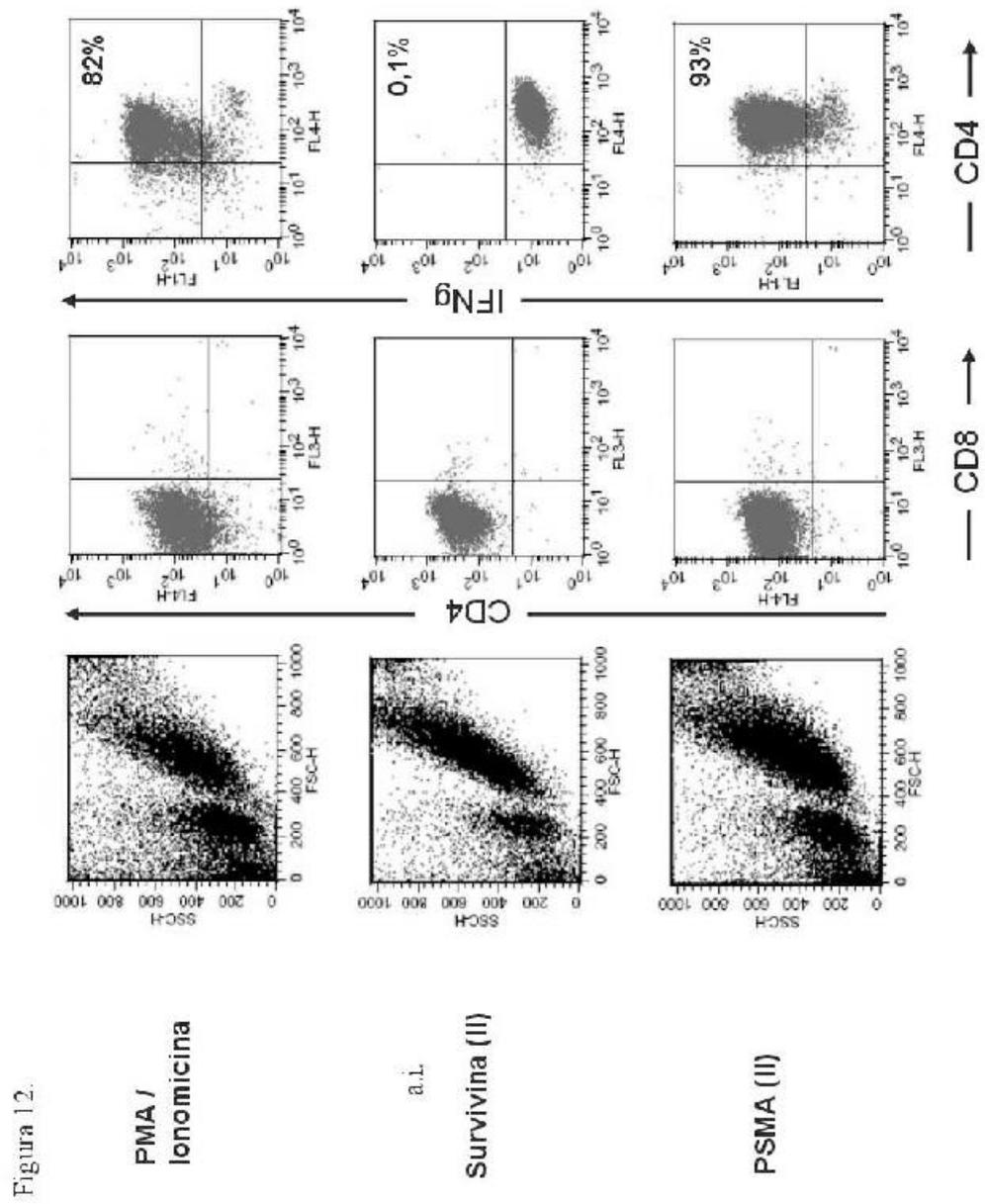
Círculo: valor del PSA antes o después de la vacunación

Punto: valor del PSA en cada vacunación

Línea discontinua K: intervalo de radioterapia externa

Línea discontinua H: intervalo de hormonoterapia intermitente

Línea discontinua C: intervalo de quimioterapia con docetaxel (Taxotere®)



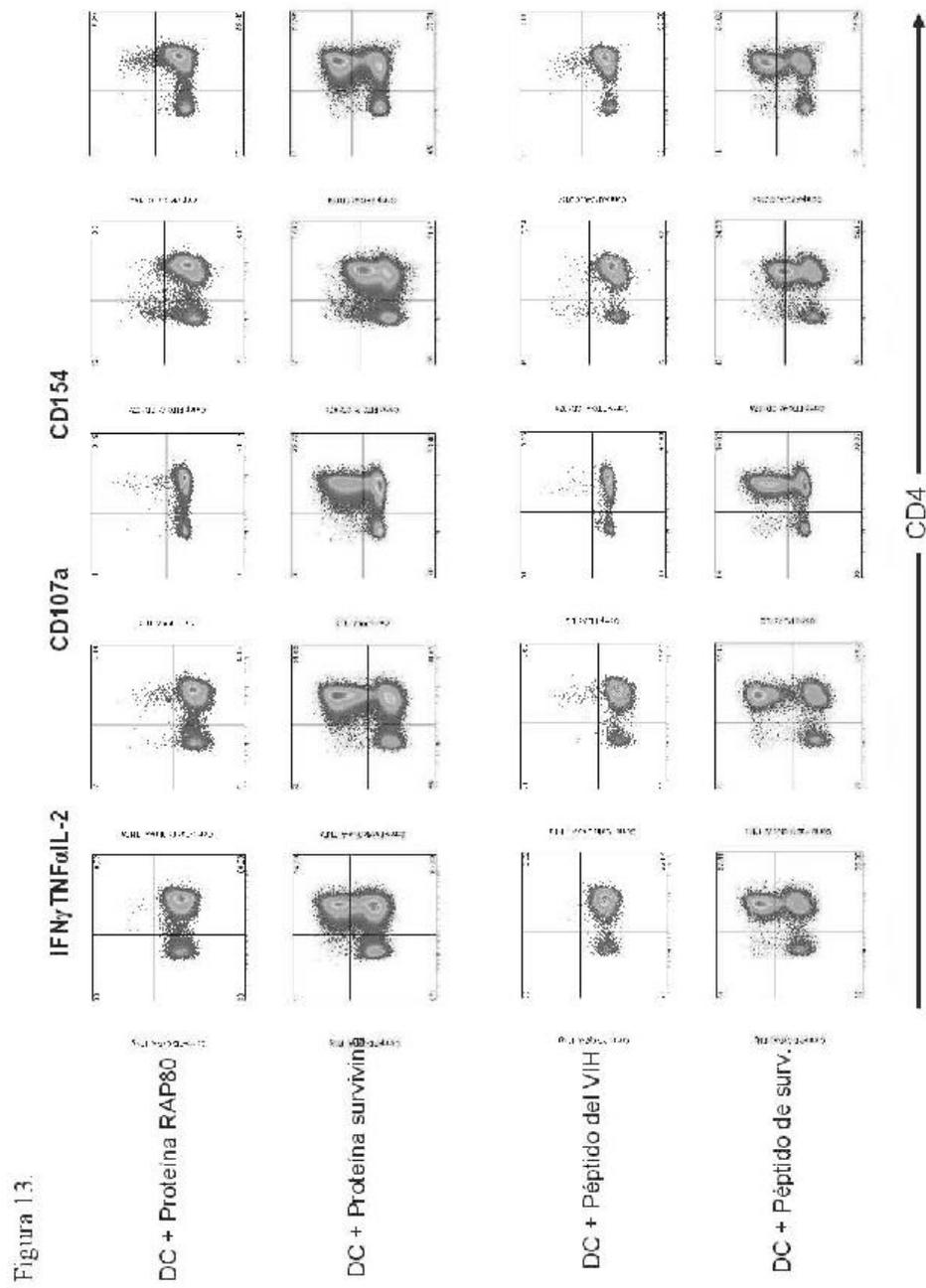
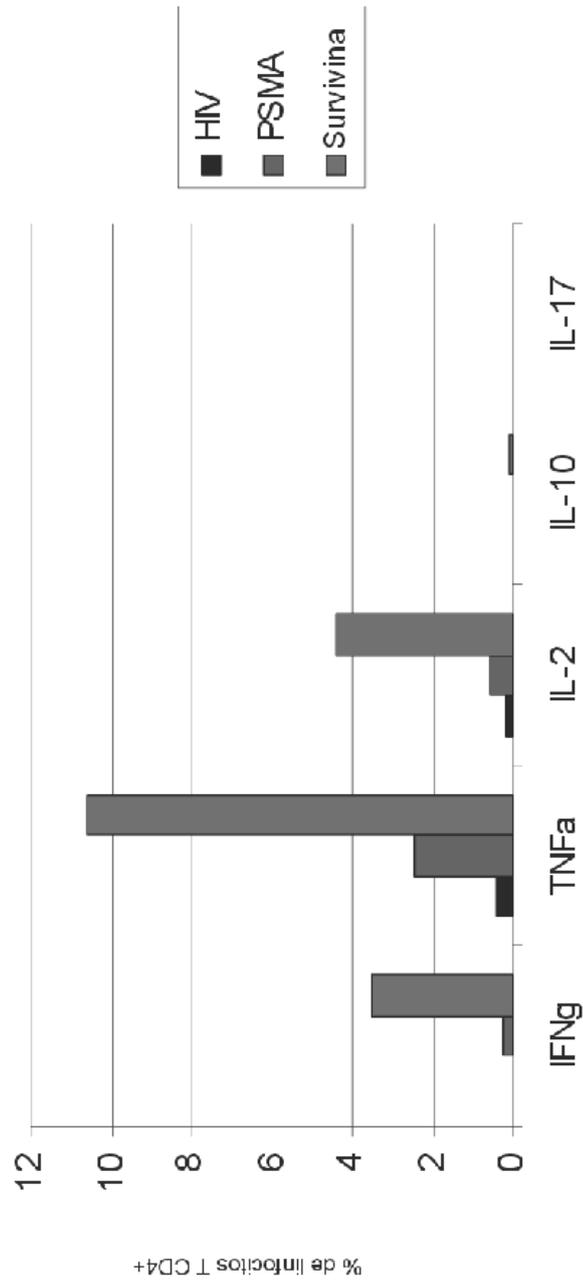


Figura 14. Linfocitos T CD4⁺ multifuncionales - Pro10 11.V



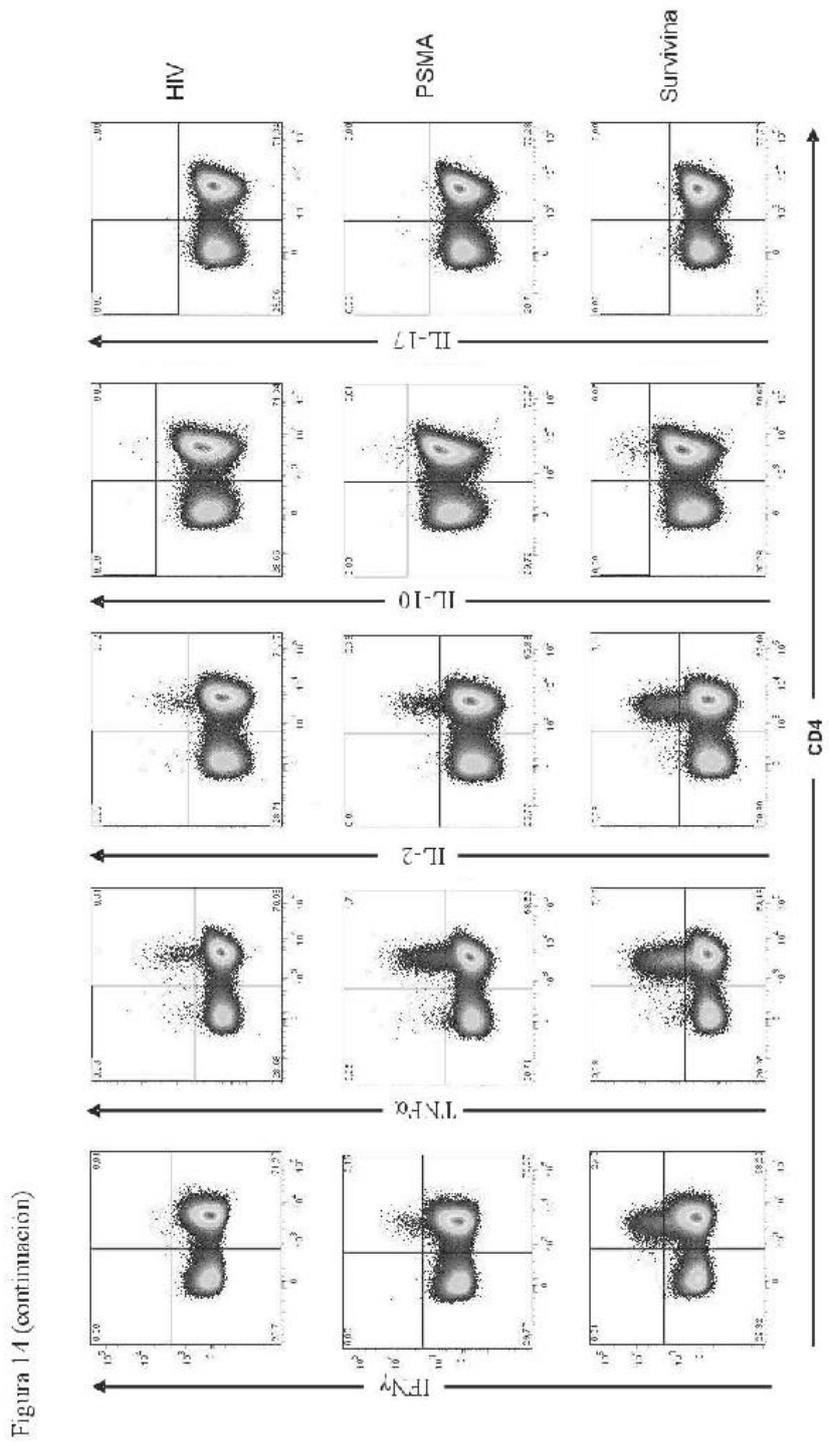


Figura 15.

	Tipado de HLA clase II de estirpes celulares	Pro26 (DR1, DR13, DRB3, DQ5, DQ6)	Pro15 (DR1, DR11, DRB3, DQ3, DQ5)
AL	DR1, DQ1	+++	+++
LAM	DQ3, DR4, DP4, DQA1*03	-	-
HO301	DQ5, DR6, DP19	+++	++
BM15	DR11, DRB3, DQ3	+++	+
MGAR	DQ6, DR15, DP4, DW2	-	-
LG2-EBV	DQ5, DRB3, DR14, DR7, DQB1*02	n.t.	n.t.
EMJ	DR13, DQ1, DP3,4, DW19	n.t.	n.t.

Respuestas a base de TNF- α : (-) < 0,1% CD4+, (+) > 3x control, (++) > 5x control, (+++) > 10x control