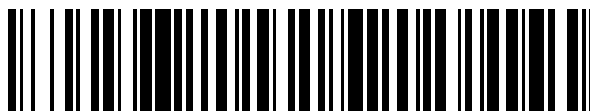


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 282**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 12191628 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2562184**

54 Título: **Nuevos epítomos inmunogénicos para inmunoterapia**

30 Prioridad:

27.07.2007 EP 07014797

31.07.2007 US 953161 P

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

30.12.2015

73 Titular/es:

IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 555 282 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 epítomos inmunogénicos para inmunoterapia

La presente invención se refiere a una nueva secuencia de aminoácidos de un péptido derivado de antígenos asociados a tumor que es capaz de unirse a complejos de MHC de clase I y desencadenar una respuesta inmunitaria.

Antecedentes de la invención

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 suscitado ahora la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente para la inmunoterapia contra el cáncer se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humerales y celulares del sistema inmunitario.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer y destruir específicamente las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL, por las siglas *Cytotoxic T-Cells*) de poblaciones de células infiltradas en tumores o de sangre periférica sugiere que estos leucocitos desempeñan un papel importante en la defensa inmunitaria natural contra el cáncer (Cheever y col., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94); High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy.). En concreto, en dicha respuesta desempeñan un papel importante los linfocitos T CD8 positivos (TCD8+), los cuales reconocen péptidos incorporados en las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por las siglas *Major Histocompatibility Complex*), que normalmente están compuestos por 8 a 10 restos de aminoácidos procedentes de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS, por las siglas *Defect Ribosomal Products*) localizados en el citosol (Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.; *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; Nature* 2000; 404(6779):770-774). Las moléculas de MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA, por las siglas *Human Leukocyte Antigens*).

Existen dos clases de moléculas de MHC: las moléculas de MHC de clase I, que pueden encontrarse en la mayoría de las células que tienen un núcleo que presentan péptidos procedentes de la escisión proteolítica de proteínas endógenas, DRIPS y péptidos más grandes. Las moléculas de MHC de clase II, pueden encontrarse predominantemente en células presentadoras de antígeno (APC, por las siglas *Antigen Presenting Cells*) especializadas, y presentan péptidos de proteínas exógenas que captan las APC durante la endocitosis, y que posteriormente se procesan (Cresswell P. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:259-93). Los complejos constituidos por péptidos y moléculas de MHC de clase I son reconocidos por linfocitos T citotóxicos CD8 positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas de MHC de clase II son reconocidos por linfocitos T cooperadores CD4 positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en abundancia en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4 positivos cumplen un importante papel en la organización de las funciones efectoras de las respuestas antitumorales de los linfocitos T y, por esta razón, la identificación de epítomos derivados de antígenos asociados a tumor (AAT) que reconocen linfocitos T CD4 positivos puede tener gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, y E. Celis. 2002. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin. Cancer Res.* 8:3219-3225., Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth, y L. J. Old. 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(15):8862-7). Los linfocitos T CD4+ pueden aumentar localmente los niveles de IFN γ (Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T; A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells; *Cancer Res.* 2003 J; 63(14):4095-4100).

En ausencia de inflamación, la expresión de moléculas de MHC de clase II se limita principalmente a células del sistema inmunitario, especialmente a células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con tumores se ha descubierto con sorpresa que las células tumorales expresan moléculas de MHC de clase II (Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4163-4170).

En modelos animales de mamífero, por ejemplo, en ratones, se ha demostrado que incluso en ausencia de células efectoras CTL (es decir, linfocitos T CD8 positivos) los linfocitos T CD4 positivos son suficientes para inhibir la visualización de tumores a través de la inhibición de la angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN γ) (Qin, Z. y T. Blankenstein. 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). Además, se ha demostrado que los linfocitos T CD4positivos que reconocen péptidos derivados de antígenos asociados a tumores presentados por moléculas HLA de clase II, pueden contrarrestar la progresión del tumor mediante la inducción de respuestas de anticuerpos (Ac) (Kennedy, R. C., M. H. Shearer, A. M. Watts, and R. K. Bright, 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). A diferencia de lo que sucede con los péptidos asociados a tumor que se unen a moléculas HLA de clase I, hasta la fecha solo se han descrito diversos ligandos de clase II derivados de antígenos asociados a tumor (AAT) (www.cancerimmunity.org, www.syfpeithi.de).

Puesto que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II está normalmente limitada a células del sistema inmunitario (Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301-331), se creía imposible aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios. Sin embargo, Dengjel y col. han logrado identificar recientemente diversos epítomos de MHC de clase II directamente en tumores (EP 04 023 546. 7, EP 05 019 254. 1; Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Miller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic" S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4163-4170).

Para desencadenar (suscitar) una respuesta inmunitaria celular, el péptido ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula de MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen al MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 restos de aminoácidos y suelen contener dos restos conservados ("anclajes") en su secuencia que interaccionan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo, cada alelo del MHC tiene un "motivo de unión" que determina qué péptidos pueden unirse específicamente a la hendidura de unión (Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S. *MHC ligands and peptide motifs*, Chapman & Hall 1998).

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

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor, esto es, sus epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todas las clases de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que se expresan positivamente en las células del tumor correspondiente. Además, los antígenos asociados a tumores, por ejemplo, pueden ser también exclusivos de células tumorales, por ejemplo como productos de genes mutados o de marcos de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) alternativos, o del corte y empalme de proteínas (Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science* 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90). Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son los antígenos específicos de tejido, tales como los antígenos de "cáncer y testículo" (CT) que se expresan en diferentes tipos de tumores y en el tejido sano de los testículos.

Se han descubierto varios antígenos asociados a tumores. Además, se han invertido muchos esfuerzos en identificar nuevos antígenos asociados a tumores. Algunos grupos de antígenos asociados a tumores, también denominados en la técnica antígenos específicos de tumores, son específicos de tejido. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, la tirosinasa en el caso del melanoma, el PSA y el PSMA en el caso del cáncer de próstata y translocaciones cromosómicas tales como bcr/abl en linfomas. Sin embargo, muchos antígenos asociados a tumores identificados aparecen en múltiples tipos de tumores, y algunos, como las proteínas oncogénicas y/o los genes supresores de tumores (estos últimos genes se revisan, por ejemplo, para el cáncer renal, en Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol.* 2003 Dec; 170 (6 Pt 1):2163-72), que realmente causan el evento de transformación, están presentes en casi todos los tipos de tumores. Por ejemplo, proteínas celulares normales que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, como la p53 (que es un ejemplo de gen supresor tumoral), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones que ocasionan la regulación positiva de la expresión de estos productos génicos, lo que los convierte en oncogénicos (McCartey y col. *Cancer Research*, 1998, 15:58 2601-5; Disis y col. *Ciba Found. Symp.* 1994, 187:198-211). Estas proteínas mutantes también pueden ser una diana de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor en múltiples tipos de cáncer.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan emplearse como tratamiento, deben cumplir ciertos requisitos previos. El antígeno debe expresarse principalmente en células tumorales y no en tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe expresarse en cantidades comparativamente pequeñas. Y no solo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también a altas concentraciones (es decir, número de copias del péptido respectivo 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 a una célula tumoral a causa de una función, por ejemplo, en el control del ciclo celular o en la apoptosis. Además, las dianas aguas abajo de las proteínas que son las causantes directas de una transformación pueden estar reguladas positivamente y, por tanto, estar asociadas indirectamente a tumores. Tales antígenos asociados indirectamente a tumores también pueden ser dianas en una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., *Cancer Immunol. Immunother.* 2004

Mar; 453 (3): 187-95). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que dicho péptido (“péptido inmunogénico”) procedente de un antígeno asociado a tumor, debe conducir a una respuesta de los linfocitos T *in vitro* o *in vivo*.

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

10 Por lo tanto, los AAT son un punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los procedimientos para identificar y caracterizar los AAT están basados, 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 C, Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D., Rammensee H. G., Stevanovic S. Nat. Biotechnol. 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, y H. G. Rammensee. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62 (20):5818-5827, 2002).

15 Sin embargo, 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 una inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante
20 seleccionar solo aquellos péptidos de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que estén presentes junto con moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Dicho linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y poder ejecutar funciones efectoras (“linfocito T efector”).

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

Dado que los dos 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: molécula MHC de clase I + epítomo peptídico) o por los CTL CD4 positivos (ligando: molécula MHC de clase II + epítomo peptídico), es importante para el desarrollo de vacunas tumorales. Por lo tanto, es un objeto de
35 la presente invención proporcionar nuevas secuencias de aminoácidos para péptidos que son capaces de unirse a complejos de MHC de cualquier clase.

El documento WO 2005/116051 desvela péptidos que se unen al MHC de clase I.

Breve descripción de las figuras

40 La Fig. 1 muestra los espectros resultantes de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ESI que identifican a los siguientes péptidos asociados a tumor (TUMAP): PCN-002 de la muestra de carcinoma de colon CCA707 (Fig. 1a), TOP-002 de la muestra de glioblastoma GB1006 (Fig. 1b), GAL-001 de la muestra de carcinoma de células renales RCC190 (Fig. 1d), CHI-001 de la muestra de glioblastoma GB1002 (Fig. 1e), JAK-001 de la muestra de glioblastoma GB1002 (Fig. 1f), AKR-001 del conjunto de muestras de cáncer de pulmón no microcítico NSCLC-Grupo 2 (Fig. 1g), y FNI-001 de la muestra de carcinoma de páncreas PC330 (Fig. 1h), todos los cuales fueron presentados de un modo restringido en MHC de clase I.

La Fig. 2 muestra los espectros resultantes de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ESI que identifican a los siguientes péptidos asociados a tumor (TUMAP): CEA-009 del conjunto de muestras de carcinoma gástrico GC-Grupo 2 (Fig. 2a), TGFBI-006 del conjunto de muestras de carcinoma gástrico GC-Grupo 1 (Fig. 2b), TGFBI-007 de la muestra de glioblastoma GB6002 (Fig. 2c), TGFBI-008 de la muestra de glioblastoma GB1004 (Fig. 2d), TGFBI-009 del conjunto de muestras de cáncer de pulmón no microcítico NSCLC-Grupo1 1(Fig. 2e), y TGFBI-010 de la muestra de glioblastoma GB6002 (Fig. 2f), todos ellos presentados de un modo restringido a MHC de clase II.

La Fig. 3 expone los perfiles de expresión de dos genes que codifican los péptidos asociados a glioblastoma PTP-001 (Fig. 3a) y CHI-001 (Fig. 3b). La expresión de los genes es nula o muy baja en los tejidos normales pero se multiplica más de 250 veces en muestras de glioblastoma (GB1006T a GB1011T; NCH359T y NCH361T)

La Fig. 4 expone las afinidades de unión al HLA-A*0201 de péptidos seleccionados medidas con Epl ELISA según Sylvester-Hvid, C, Kristensen, N, Blicher, T, Ferre, H, Lauemoller, SL, Wolf, XA, Lamberth, K, Nissen, MH,

Pedersen, LO, y Buus, S; 2002, Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction, Tissue Antigens, 59,251-258. El análisis se limitó a los péptidos que son péptidos de unión a MHC de clase I. Este ensayo no puede medir las afinidades de los péptidos que se unen al HLA-DR.

5 La Figura 5 expone el análisis de tetrámeros de la proliferación estimulada con microesferas de linfocitos CD8+ específicos de ODC-001 y de NOX-001 obtenidos de sangre periférica.

10 Se depositaron por pocillo 1×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas con CD8+ procedentes del donante sano HD100 que era HLA-A*0201+ y se estimularon semanalmente con microesferas acopladas con anti-CD28 más antígeno tumoral A*0201/ODC-001 a alta densidad (panel superior) o anti-CD28 más antígeno tumoral A*0201/NOX-001 a alta densidad (panel inferior). Después de tres estimulaciones *in vitro*, todas las células se tiñeron con anticuerpo CD8 FITC y con tetrámeros A*0201/NOX-001 PE y A*0201/NLGN4X-001 APC. Las células se seleccionan entre la población de linfocitos o de linfocitos CD8+ (panel derecho) y las cifras representan el porcentaje de tetrámeros+ en los linfocitos CD8+.

La Figura 6 expone la inmunogenicidad *in vitro* del TGFBI-004 detectada mediante ELISPOT de IFN- γ después de cinco ciclos de estimulación.

15 Las células se estimularon y reestimularon repetidamente con el péptido TGFBI-004 y después se incubaron con dicho péptido (Pocillos 1, 2, 3 y 4) y con otro péptido irrelevante (control negativo). El análisis de ELISPOT de IFN- γ se llevó a cabo con un Lector ELISPOT (CTL, Cleveland, EE. UU.). Como control positivo se empleó PHA-Ionomicina. Las cifras indican el recuento de puntos positivos.

20 La Figura 7 muestra la inmunogenicidad *in vitro* del TGFBI-004 detectada mediante tinción intracelular de citocinas (ICS) tras cinco ciclos de estimulación.

25 Las células se estimularon con CD autólogas cargadas con TGFBI-004 y se reestimularon repetidamente con PBMC autólogas más TGFBI-004. Para la lectura las células se incubaron con el péptido TGFBI-004 (Pocillos 1, 2, 3 y 4) y con otro péptido irrelevante (control negativo). Además de la tinción intracelular del IFN- γ , las células también se tiñeron con anticuerpos frente a CD4-FITC y CD8-PerCP. El análisis se realizó con un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD Biosciences, Alemania).

La Figura 8 expone el análisis ELISPOT de la producción de IFN- γ por parte de estirpes de linfocitos T tras su reestimulación *in vitro* con el péptido NOX-001. A. Estirpe de linfocitos T 7+ procedente del donante HBC-154 (selección de CD8+ NOX-001 tetrámero+); B. Estirpe de linfocitos T 7- procedente del donante HBC-154 (selección de CD8+ NOX-001 tetrámero).

30 Después de la reestimulación con el péptido irrelevante (MLA-001) (pocillos superiores) y con el péptido relevante (NOX-001) (pocillos inferiores) (10 μ g/ml) se analizaron las células seleccionadas CD8+ NOX-001 tetrámero+ (A.) y CD8+ NOX-001 tetrámero- (B.). Las cifras indican el recuento de puntos positivos.

35 La Figura 9 expone las afinidades de los péptidos contenidos en la presente invención hacia HLA-A*0201. Las constantes de disociación (K_D) de los péptidos HLA de clase I P116 y del péptido marcador viral HBV-001 se midieron con una prueba que se basaba en un ELISA (véase el apartado Ejemplos).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto la presente invención proporciona un péptido consistente en la secuencia ALFVRLALLA de acuerdo con la SEC ID N. ° 8 que induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido.

40 En la presente invención el término "homólogo" se refiere al grado de identidad entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir, secuencias peptídicas o polipeptídicas. La "homología" anteriormente indicada, 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., 22(22): 4673-4680 (1994). Para el análisis de secuencias también se puede usar programación informática habitualmente disponible, en concreto Vector NTI, GENETYX o herramientas de análisis facilitadas por bases de datos públicas, como las que se pueden hallar, por ejemplo, en <http://dragon.bio.purdue.edu/bioinformlinks/>.

50 Un experto en la materia podrá valorar si los linfocitos T inducidos por una variante de un péptido específico serán capaces de reaccionar también con el propio péptido (Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, y 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); (Zaremba, S, Barzaga, E, Zhu, M, Soares, N, Tsang, KY, y Schlom, J; Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen, Cancer Res., 1997, 57, 4570-4577; Colombetti, S, Fagerberg, T, Baumgartner, P, Chapatte, L, Speiser, DE, Rufer, N, Michielin, O, Y Levy, F; Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity, J Immunol., 2006, 176, 6560-6567; Appay, V, Speiser, DE,

Rufer, N, Reynard, S, Barbey, C, Cerottini, JC, Leyvraz, S, Pinilla, C, Y Romero, P; Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide, Eur. J Immunol., 2006, 36, 1805-1814).

5 La Tabla 1 muestra los péptidos, sus respectivas SEC ID N.º así como la información sobre las proteínas originarias.

Tabla 1: Péptidos

SEC ID N°	Código del péptido	Secuencia	Alelos HLA	Genes
1	C20-001	ALSNLEVTL	A*02	C20orf42
2	NOX-001	ILAPVILYI	A*02	NOX1
3	PCN-001	KLMDLDVEQL	A*02	PCNA
4	PCN-002	SMSADVPLV	A*02	PCNA
5	TOP-001	KIFDEILVNA	A*02	TOP2A, TOP2B
6	TOP-002	AAFVEELDKV	A*02	TOP2B
7	CEA-009	VLLLVHNLQHLFG	Clase II	CEACAM5
8	TGFBI-001	ALFVRLALA	A*02,A*02/B*13?	TGFBI
9	TGFBI-006	GDKLEVSLKNNVVS	Clase II	TGFBI
10	TGFBI-007	GKKLRVYRNSLCIENS	Clase II	TGFBI
11	TGFBI-008	LKNNWSVNKEPVAEPD	Clase II	TGFBI
		KNNWSVNKEPVAEPD	Clase II	TGFBI
		KNNWSVNKEPVA	Clase II	TGFBI
		LKNNWSVNKEPVA	Clase II	TGFBI
12	TGFBI-009	NGVIHYIDELLIPDS	Clase II	TGFBI
		GVIHYIDELLIPDSA	Clase II	TGFBI
13	TGFBI-010	LNRILGDPEALRDL	Clase II	TGFBI
14	TGFBI-004	TPPIDAHRNLLRNH	Clase II	TGFBI
15	PTP-001	ALTTLMHQL	A*02	PTPRZ1
16	GAL-001	SLDPSSPQV	A*02	GAL3ST1
17	CHI-001	SLWAGWWL	A*02	CHI3L2
18	JAK-001	KLTDIQIEL	A*02	JAKMIP2
19	AKR-001	YLIHFPVSV	A*02	AKR1C1, AKR1C2
20	FN1-001	IVDDITYNV	A*02	FN1
21	EGFR-002	GAVRFSNNPALCNVES	Clase II	EGFR
		AVRFSNNPALCNVES	Clase II	EGFR
		AVRFSNNPALCNVE	Clase II	EGFR
22	EGFR-005	NPTTYQMDVNPEGKYS	Clase II	EGFR
23	EGFR-006	FKKIKVLGSGAFG	Clase II	EGFR
24	CHI3L1-001	TTLIKEMKAEFIKAEQPG	Clase II	CHI3L1
		TLIKEMKAEFIKAEQPG	Clase II	CHI3L1
		TTLIKEMKAEFIKEA	Clase II	CHI3L1
		TLIKEMKAEFIKEA	Clase II	CHI3L1
		IKEMKAEFIKAEQPG	Clase II	CHI3L1
		TTLIKEMKAEFIKE	Clase II	CHI3L1
25	CHI3L1-007	VKSKVQYLKDRQLAG	Clase II	CHI3L1
26	CHI3L1-008	SRRTFIKSVPPFLRT	Clase II	CHI3L1
27	DCA-001	KLGDGFLATW	A*02	DCAMKL2
28	KCN-001	SLFDQWKV	A*02	KCNJ10
29	GPM-001	ALLSEVIQL	A*02	GPM6B

Marco de lectura abierta 42 del cromosoma 20

10 El C20orf42 es una proteína de adhesión focal que interviene en la fijación del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática y en procesos celulares mediados por las integrinas. La deficiencia de C20orf42 como

resultado de mutaciones que comportan la pérdida de función causa el síndrome de Kindler, una genodermatosis autosómica recesiva caracterizada por la aparición de ampollas cutáneas, atrofia progresiva de la piel, fotosensibilidad y, ocasionalmente, oncogénesis (Herz, C, Aumailley, M, Schulte, C, Schlotzer-Schrehardt, U, Bruckner-Tuderman, L y Has, C; Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes, *J Biol Chem.*, 2006, 281, 36082-36090). Recientemente, se ha descrito una afectación grave del tracto gastrointestinal con colitis hemorrágica en un paciente portador de una mutación que ocasiona la pérdida de función (Sadler, E, Klaussegger, A, Muss, W, Deinsberger, U, Pohla-Gubo, G, Laimer, M, Lanschuetzer, C, Bauer, JW y Hintner, H; Novel KIND! gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement, *Arch. Dermatol.*, 2006, 142, 1619-1624).

En el contexto del cáncer, el C20orf42 se ha descrito en estudios que investigaban la expresión génica en entornos relevantes para el cáncer. Se descubrió que se sobreexpresaba en el 70 % de los carcinomas de colon y en el 60 % de los carcinomas de pulmón analizados (n=10). La expresión en tejidos normales, estudiada con transferencia de Northern, se limitó a tejidos neuromusculares (Weinstein, EJ, Boumer, M, Head, R, Zakeri, H, Bauer, C y Mazzarella, R; 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*, 2003, 1637,207-216). Asimismo, el gen de C20orf42 se ha identificado como un gen implicado en la migración celular y en la invasión tumoral mediadas por el TGF- β (Kloeker, S, Major, MB, Calderwood, DA, Ginsberg, MH, Jones, DA y Beckerle, MC; The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 6824-6833).

20 **Homólogo 1 de NADPH-oxidasa (NOX1)**

La enzima NOX1 responde a factores de crecimiento y cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Su expresión se detectó inicialmente en el colon, en la próstata y en el útero, así como en los miocitos lisos vasculares en proliferación (Suh, Y. A. y col. 1999; Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401, 79-82). Su expresión está vinculada a diversas respuestas biológicas, tales como la proliferación celular, la angiogénesis y la activación de vías de señalización celular (Harper, R. W., Xu, C, Soucek, K., Setiadi, H. & Eiserich, J. P. A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 435, 323-330).

La NOX1 presenta una elevada expresión en el colon, pero su función en la fisiología y la patología del colon se conocen muy poco. En los tejidos normales, la expresión de NOX1 parece ser baja en el íleon, intermedia en el colon derecho y elevada en el colon izquierdo. No hubo diferencias estadísticas en la expresión de NOX1 entre muestras procedentes de adenomas y adenocarcinomas de colon diferenciados o poco diferenciados. NOX1 se expresa mucho en las células epiteliales del colon, tanto en las del interior de las criptas como en las de la superficie luminal. En conclusión, NOX1 es una enzima que se expresa de forma constitutiva en el epitelio del colon y no está directamente relacionada con la oncogénesis (Szanto, I. y col. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2005, 207,164-176).

El análisis inmunohistoquímico ha demostrado que la NOX1 se expresa de forma constitutiva en las células mucosas superficiales. Los adenomas y los adenocarcinomas bien diferenciados presentan expresión de NOX1 regulada positivamente.

El factor nuclear (NF)-kappaB se activó predominantemente en células de adenoma y adenocarcinoma que expresaban NOX1 en abundancia, lo cual indica que la NOX1 podría estimular las vías antiapoptóticas que dependen del NF-kappaB en los tumores de colon (Fukuyama, M. y col. Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett.* 2005, 221, 97-104).

Se ha descrito que la señalización de Wnt3a/beta-catenina induce la expresión de NOX1 (Petropoulos, H. & Skerjanc, I. S. Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem.* 2002, 277, 15393-15399).

Recientemente se ha planteado que las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) inducen la apoptosis endotelial, fenómeno que a su vez induce la expresión de varias moléculas de adhesión para las células tumorales. Esto significaría que bloqueando la producción de ROS tal vez se podría impedir la recidiva del tumor en sitios distantes (Ten, KM, van der Wal, JB, Sluiter, W, Hofland, LJ, Jeekel, J, Sonneveld, P y van Eijck, CH; The role of superoxide anions in the development of distant tumor recurrence, *Br J Cancer*, 2006, **95**,1497-1503).

Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

El PCNA se halla en el núcleo y es un cofactor de la ADN-polimerasa delta. La proteína codificada actúa como un homotrímero y ayuda a mejorar la procesividad de la síntesis de la hebra conductora durante la replicación del ADN. Así pues, se expresa en todas las células en proliferación, especialmente en las células tumorales y se usa como marcador para detectar la proliferación.

ADN-topoisomerasa II

Los genes TOP2A y TOP2B codifican isoformas de una ADN-topoisomerasa, enzima que controla y altera los estados topológicos del ADN durante la transcripción. Esta enzima nuclear interviene en procesos como la condensación cromosómica, la separación de las cromátidas y el alivio de la tensión torsional que aparece durante la replicación y la transcripción del ADN. Las ADN-topoisomerasas catalizan la rotura transitoria y el religamiento de las dos hebras de la doble hélice de ADN, lo que les permite girar libremente una respecto a la otra, alterando de ese modo la topología del ADN. Las dos isoformas de esta enzima son probablemente el producto de un fenómeno de duplicación génica. El gen que codifica la forma alfa está localizado en el cromosoma 17 y el gen beta en el cromosoma 3.

El gen TOP2A es la diana de varios fármacos antitumorales y diversas mutaciones del mismo han sido vinculadas con el desarrollo de resistencia farmacológica.

TOP2A es adyacente a HER-2, el oncogén amplificado con más frecuencia en el cáncer de mama, en el sitio cromosómico 17q12-q21 y aparece amplificado o eliminado, con igual frecuencia, en casi el 90 % de los tumores primarios de mama HER-2 amplificados (Jarvinen, TA y Liu, ET; Topoisomerase II alpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer-more common than anticipated, *Cytopathology*, 2003, 14, 309-313). También se han descrito amplificaciones de TOP2A en otros tipos de cáncer.

Sin TOP2A la replicación del ADN y la división celular son imposibles. Ello lo ha convertido en la diana principal de muchos regímenes de tratamiento antitumoral, aunque el mecanismo exacto con el que destruye las células aún escapa a nuestro conocimiento (Kellner, U, Sehested, M, Jensen, PB, Gieseler, F, y Rudolph, P; Culprit and victim - DNA topoisomerase II, *Lancet Oncol.*, 2002, 3, 235-243). El éxito de esta estrategia se ve limitado por el desarrollo de resistencia espontánea y los daños del ADN causados por los fármacos pueden aumentar la malignidad. Datos recientes apuntan a que la amplificación y la delección de TOP2A podrían representar tanto la sensibilidad como la resistencia vinculadas a la quimioterapia con inhibidores de TOP2A, dependiendo del defecto genético específico en el *locus* de TOP2A.

No está claro si la implicación de TOP2B en el cáncer es similar a la de TOP2A o si existe una diferencia importante entre ambas isoformas. TOP2B puede al menos complementar parte de la actividad de TOP2A (Sakaguchi, A y Kikuchi, A; Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase, *J Cell Sci.*, 2004, 117, 1047-1054).

Molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA = CEACAM5) es una proteína de membrana de 180 kDa fuertemente glucosilada compuesta por tres unidades de repetición similares a la región C2 de Ig flanqueadas por una región N-terminal similar a la región V de Ig y una región C-terminal que incluye una región de enlace con glucofosfatidilinositol (Hegde, P, Qi, R, Gaspard, R, Abernathy, K, Dharap, S, Earle-Hughes, J, Gay, C, Nwokekeh, NU, Chen, T, Saeed, AI, Sharov, V, Lee, NH, Yeatman, TJ y Quackenbush, J; Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, *Cancer Res.*, 2001, 61, 7792-7797).

Como antígeno oncofetal, el CEA se expresa durante el desarrollo del feto, pero también en el epitelio gastrointestinal del adulto, aunque a niveles bajos. Sin embargo, el CEA aparece sobreexpresado en un alto porcentaje de tumores humanos, entre ellos el 90 % de los tumores de cáncer gastrointestinal, colorrectal y pancreático, en el 70 % de las células del cáncer de pulmón no microcítico y el 50 % de los tumores de mama (Thompson, JA, Grunert, F, y Zimmermann, W; Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives, *J Clin Lab Anal.*, 2005, 5, 344-366). Debido a su alta expresión en las células tumorales y su secreción en el suero, el CEA se ha usado ampliamente como marcador tumoral (Sikorska, H, Shuster, J, and Gold, P; Clinical applications of carcinoembryonic antigen, *Cancer Detect. Prev.*, 1988, 12, 321-355) y es el marcador sérico estándar para el seguimiento del cáncer colorrectal (Locker, GY, Hamilton, S, Harris, J, Jessup, JM, Kemeny, N, Macdonald, JS, Somerfield, MR, Hayes, DF y Bast, RC, Jr.; ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer, *J Clin Oncol*, 2006, 24, 5313-5327).

A pesar de su sobreexpresión en las células tumorales, los pacientes oncológicos no suelen mostrar una respuesta inmunitaria contra este antígeno (Orefice, S, Fossati, G, Pietrojusti, E, y Bonfanti, G; Delayed cutaneous hypersensitivity reaction to carcinoembryonic antigen in cancer patients, *Tumori*, 1982, 68, 473-475). El sistema inmunitario suele desarrollar tolerancia al CEA, porque habitualmente se expresa a niveles bajos en el organismo. Sin embargo, en una serie de ensayos clínicos con vacunas, se ha demostrado la inmunogenicidad del CEA (Sarobe, P, Huarte, E, Lasarte, JJ, and Borrás-Cuesta, F; Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses, *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2004, 4, 443-454), especialmente en el carcinoma colorrectal (CCR) (Mosolits, S, Ullenhag, G, y Mellstedt, H; Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results, *Ann. Oncol.*, 2005, 16, 847-862), siendo el CEA el antígeno asociado a tumor (AAT) con el mayor número de plataformas vacunales probadas en este tipo de tumor (von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, *Semin. Oncol.*, 2005, 32, 76-84).

En el caso del CEA se han descrito varios epítomos para los linfocitos T cooperadores y citotóxicos (Crosti, M, Longhi, R, Consogno, G, Melloni, G, Zannini, P, y Protti, MP; Identification of novel subdominant epitopes on the carcinoembryonic antigen recognized by CD4+ T-cells of lung cancer patients, *J Immunol.*, 2006, 176, 5093-5099; Novellino, L, Castelli, C, y Parmiani, G; A listing of human tumor antigens recognized by T-cells: March 2004 update, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004, 54, 187-207; Ruiz, M, Kobayashi, H, Lasarte, JJ, Prieto, J, Borrás-Cuesta, F, Celis, E, y Sarobe, P; Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10, 2860-2867), lo que ha dado pie a una serie de ensayos con vacunas peptídicas en el marco del CCR (Babatz, J, Rollig, C, Lobel, B, Folprecht, G, Haack, M, Gwither, H, Kohne, CH, Ehninger, G, Schmitz, M, y Bornhauser, M; Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006, 55, 268-276; Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, y Engleman, EG; Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 8809-8814; Liu, KJ, Wang, CC, Chen, LT, Cheng, AL, Lin, DT, Wu, YC, Yu, WL, Hung, YM, Yang, HY, Juang, SH, y Whang-Peng, J; Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A*0201 and HLA-A*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10, 2645-2651; Matsuda, K, Tsunoda, T, Tanaka, H, Umamo, Y, Tanimura, H, Nukaya, I, Takesako, K, y Yamaue, H; Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004, 53, 609-616; Ueda, Y, Itoh, T, Nukaya, I, Kawashima, I, Okugawa, K, Yano, Y, Yamamoto, Y, Naitoh, K, Shimizu, K, Imura, K, Fuji, N, Fujiwara, H, Ochiai, T, Itoi, H, Sonoyama, T, Hagiwara, A, Takesako, K, y Yamagishi, H; Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas, *Int. J. Oncol.*, 2004, 24, 909-917; Weihrach, MR, Ansen, S, Jurkiewicz, E, Geisen, C, Xia, Z, Anderson, KS, Gracien, E, Schmidt, M, Wittig, B, Diehl, V, Wolf, J, Bohlen, H, y Nadler, LM; Phase I/II combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer, *Clin Cancer Res.*, 2005, 11, 5993-6001). Estos y otros ensayos clínicos realizados hasta ahora han demostrado la seguridad de las vacunaciones con CEA y han aportado pruebas de la inducción de una respuesta inmunitaria contra este antígeno (von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, *Semin. Oncol.*, 2005, 32, 76-84).

30 **Gen inducido por el factor de crecimiento transformante, beta (TGFBI)**

El TGFBI fue identificado por primera vez como un gen inducible por el TGF-beta en una estirpe celular de adenocarcinoma de pulmón humano. Codifica una proteína segregada en la matriz extracelular, que se piensa que actúa en la fijación celular y en la composición de dicha matriz.

35 También se ha demostrado que el TGFBI es uno de los genes cuya expresión es más elevada en el cáncer colorrectal, además de expresarse a altos niveles en adenomas. Los resultados obtenidos con la PCR cuantitativa demuestran la fuerte elevación tanto en tumores sin purificar como en células epiteliales tumorales purificadas. En consonancia, los experimentos de hibridación *in situ* revelan que el TGFBI se expresa en muchos tipos de células, tanto en el compartimento estromal como en el epitelial (Buckhaults, P, Rago, C, St, CB, Romans, KE, Sana, S, Zhang, L, Vogelstein, B, y Kinzler, K. W; Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors, *Cancer Res.*, 2001, 61, 6996-7001).

En un metanálisis de estudios que investigó la expresión génica en el carcinoma colorrectal, el TGFBI fue identificado como uno de los nueve únicos genes que aparecían reiteradamente regulados positivamente (4 estudios de TGFBI) (Shih, W, Chetty, R, y Tsao, MS; Expression profiling by microarrays in colorectal cancer, *Oncol. Rep.*, 2005, 13, 517-524).

45 En tejidos de páncreas humano se apreció un incremento de 32,4 veces en los niveles del ARNm del TGFBI en tumores pancreáticos en comparación con los tejidos de control normales. Los análisis de hibridación *in situ* revelaron que el ARNm del TGFBI se expresaba principalmente en células cancerosas del interior de la masa tumoral pancreática (Schneider, D, Kleeff, J, Berberat, PO, Zhu, Z, Korc, M, Friess, H, y Buchler, MW; Induction and expression of betaig-h3 in pancreatic cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1588, 1-6).

50 El TGFBI se ha identificado como un gen promotor de la angiogénesis en un modelo *in vitro*. Además, en varios tumores se ha detectado un aumento drástico de su expresión. Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el TGFBI bloquearon tanto la expresión génica como la formación del tubo endotelial *in vitro*, lo cual parece indicar que el TGFBI puede desempeñar un papel esencial en las interacciones entre la matriz y la célula endotelial (Aitkenhead, M, Wang, SJ, Nakatsu, MN, Mestas, J, Heard, C, y Hughes, CC; Identification of endothelial cell genes expressed in an *in vitro* model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM, *Microvasc. Res.*, 2002, 63, 159-171).

Proteína tirosina fosfatasa, de tipo receptor, Zeta 1 (PTPRZ1)

La PTPRZ1 es un miembro de la familia de proteínas tirosina fosfatasa de tipo receptor y codifica una proteína de membrana de un solo paso de tipo 1 dotada de dos dominios citoplasmáticos de tirosina fosfatasa, un dominio alfa-anhidrasa carbónica y un dominio de fibronectina de tipo III. La expresión de este gen se induce en células de

cáncer gástrico (Wu, CW, Li, AF, Chi, CW, y Lin, WC; Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues, *Cancer Lett.*, 2006, 242, 95-103), en los oligodendrocitos remielinizantes de lesiones de esclerosis múltiple (Harroch, S, Furtado, GC, Brueck, W, Rosenbluth, J, Lafaille, J, Chao, M, Buxbaum, JD, y Schlessinger, J; A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions, *Nat. Genet.*, 2002, 32,411-414), y en células reñales embrionarias humanas en condiciones hipóxicas (Wang, V, Davis, DA, Haque, M, Huang, LE, y Yarchoan, R; Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in HEK293T-cells, *Cancer Res.*, 2005, 65, 3299-3306).

Tanto la proteína como el transcrito se sobreexpresan en las células de glioblastoma, promoviendo su migración haptotáctica (Lu, KV, Jong, KA, Kim, GY, Singh, J, Dia, EQ, Yoshimoto, K, Wang, MY, Cloughesy, TF, Nelson, SF, y Mischel, PS; Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin, *J Biol Chem.*, 2005, 280,26953-26964).

Además, la PTRPZ1 aparece amplificada con frecuencia a nivel del ADN genómico en el glioblastoma (Mulholland, PJ, Fiegler, H, Mazzanti, C, Gorman, P, Sasieni, P, Adams, J, Jones, TA, Babbage, JW, Vatcheva, R, Ichimura, K, East, P, Poullikas, C, Collins, VP, Carter, NP, Tomlinson, IP, y Sheer, D; Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme, *Cell Cycle*, 2006, 5, 783-791).

Janus Quinasa y proteína 2 de interacción con microtúbulos (JAKMIP2)

La JAKMIP2 se identificó como una de las muchas dianas aguas abajo conocidas y presuntas de PAX3-FKHR que aparecen muy sobreexpresadas en el rhabdomyosarcoma pediátrico de subtipo alveolar o ARMS (Lae, M, Ahn, E, Mercado, G, Chuai, S, Edgar, M, Pawel, B, Olshen, A, Barr, F, y Ladanyi, M; Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas, *J Pathol.*, 2007, 212,143-151).

Fibronectina 1 (FN1)

La fibronectina es una glucoproteína de alto peso molecular que contiene alrededor de un 5 % de glúcidos y que se une a proteínas receptoras que atraviesan la membrana celular, denominadas integrinas. Además de unirse a las integrinas, también se une a componentes de la matriz extracelular, tales como el colágeno, la fibrina y la heparina. Existen varias isoformas de la fibronectina, todas ellas producto del mismo gen. Las fibronectinas desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la morfología celular normal, la adhesión y la migración celular, la hemostasia, la trombosis, la cicatrización de heridas, la diferenciación y la proliferación (Hynes, RO; *Fibronectins*, *Sci. Am.*, 1987, 254, 42-51).

La fibronectina polimérica, sFN, se forma *in vitro* tratando la fibronectina soluble con un péptido de 76 aa, el III1-C (denominado anastelina), que procede de la primera repetición de tipo III de la fibronectina. Estudios *in vivo* realizados con ratones portadores de tumores, han demostrado que la aplicación sistémica de la anastelina o de sFN suprime el crecimiento, la angiogénesis y la metástasis tumoral (Yi, M y Ruoslahti, E; A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 620-624). Anginex es un péptido sintético de 33 aminoácidos que se modeló inicialmente para reproducir la estructura en lámina beta de proteínas antiangiogénicas. Se ha demostrado que el anginex inicia la polimerización de la fibronectina y es inactivo en ratones que carecen de fibronectina plasmática (Akerman, ME, Pilch, J, Peters, D, y Ruoslahti, E; Angiostatic peptides use plasma fibronectin to home to angiogenic vasculature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102, 2040-2045). Un estudio examinó los efectos de la FN sobre la insuficiencia hepática fulminante inducida con D-galactosamina (GalN)/lipopolisacárido (LPS) en ratones. Los resultados sugieren que la FN protegió contra la insuficiencia hepática provocada por GalN/LPS a través de un mecanismo que implica la inhibición de la activación del NF-kappaB, lo que causó la regulación negativa del TNF-alfa y la regulación positiva de la IL-10, así como la elevación del Bcl-xL que indujo el bloqueo de las señales apoptóticas, procesos que culminaron en la supresión de la apoptosis de los hepatocitos causada por GalN/LPS (Qiu, Z, Kwon, AH, Tsuji, K, Kamiyama, Y, Okumura, T, y Hirao, Y; Fibronectin prevents D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced lethal hepatic failure in mice, *Shock*, 2006, 25, 8087). Otros resultados indican que la FN estimula la proliferación de las células de carcinoma de pulmón humano y disminuye la apoptosis *in vitro* al inducir la expresión del gen COX-2 y la biosíntesis de PGE2 (Han, S, Sidell, N, Roser-Page, S, y Roman, J; Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, *Int. J Cancer*, 2004, 111,322-331).

Se ha demostrado que la fibronectina (FN) sufre un corte y empalme alternativo únicamente durante la organogénesis y la oncogénesis. Una de esas variantes de corte y empalme, la FN con dominio extra B (ED-B), normalmente no aparece en los tejidos adultos normales y se ha propuesto como marcador de la angiogénesis tumoral (Khan, ZA, Caurtero, J, Barbin, YP, Chan, BM, Uniyal, S, y Chakrabarti, S; ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma, *Exp. Lung Res.*, 2005, 31, 701-711). Mhaweck y col. demostraron que los pacientes afectados por tumores de cabeza y cuello con tinción positiva para la EDB tienden a tener una supervivencia significativamente más corta (Mhaweck, P, Dulguerov, P, Assaly, M, Ares, C, y Allal, AS; EB-D fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Oral Oncol.*, 2005, 41, 82-88).

La expresión de la fibronectina regula la angiogénesis y la vasculogénesis y participa en las respuestas del tejido

cerebral a la isquemia y a las crisis epilépticas. La expresión génica de la fibronectina apareció significativamente elevada ($p < 0,05$) en los fibroblastos SWS (Síndrome de Sturge y Weber) en comparación con la de los fibroblastos de piel normal de individuos afectados por el síndrome (Comi, AM, Hunt, P, Vawter, MP, Pardo, CA, Becker, KG, y Pevsner, J; Increased fibronectin expression in sturge-weber syndrome fibroblasts and brain tissue, *Pediatr. Res.*, 2003, 53, 762-769). La concentración de fibronectina era notablemente superior en cáncer de ovario en comparación con tumores benignos de ovario y ovarios normales. La concentración de fibronectina aparece significativamente elevada en pacientes con cáncer de ovario recidivante frente al mismo tipo de pacientes sin recidiva. La expresión de enzimas matriolíticas y de fibronectina procedentes de tumor son importantes en el crecimiento de tumores de ovario (Demeter, A, Szirmai, K, Olah, J, Papp, Z, y Jeney, A; Elevated expression of matrix metalloproteinase-9, and fibronectin concentration in recurrent epithelial ovarian cancer, *Orv. Hetil.*, 2004, 145, 1617-1624). El hecho de que la FN fuera uno de los dos únicos genes regulados negativamente de un modo significativo entre 1176 genes analizados en un estudio, refuerza la hipótesis de su actuación como un importante gen supresor de las metástasis en el cáncer mamario (Urtreger, AJ, Werbajh, SE, Verrecchia, F, Mauviel, A, Puricelli, LI, Kornbliht, AR, y Bal de Kier Joffe ED; Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential, *Oncol. Rep.*, 2006, 16, 1403-1410).

Un artículo publicado describe que tres péptidos solubles de la fibronectina (RGD, CS-1 y FN-C/H-V) inducen la apoptosis en fibroblastos de pulmón. La apoptosis se produjo por interrupción de la adhesión (anoikis). El uso de péptidos pequeños de fibronectina para promover la apoptosis de los fibroblastos merece ser estudiado en profundidad como posible tratamiento antifibrótico (Hadden, HL y Henke, CA; Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides, *Am. J Respir. Crit Care Med*, 2000, 162, 1553-1560). Otro estudio ha demostrado que la fibronectina estimula la proliferación de las células del carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) humano. Han demostrado que la FN aumenta la proteína MMP-9, la expresión de ARNm y la actividad gelatinolítica en células de NSCLC (Han, S, Ritzenthaler, JD, Sitaraman, SV, y Roman, J; Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells, *J Biol Chem.*, 2006, 281, 29614-29624). Un estudio investigó si los efectos supresores de tumores de compuestos de la vitamina D (VD) también podían estar mediados por mecanismos que rigen la adhesividad celular. La introducción de ARN pequeño de interferencia contra la FN redujo negativamente su expresión, así como la adhesividad de las células a una matriz de colágeno de tipo I. Sus hallazgos ponen de manifiesto la trascendencia de la FN en la modulación de la adhesividad de las células de cáncer de tiroides y, al menos en parte, en la mediación de las acciones de la vitamina D en el crecimiento de las células neoplásicas (Liu, W, Asa, SL, y Ezzat, S; α ,25-Dihydroxyvitamin D3 targets PTEN-dependent fibronectin expression to restore thyroid cancer cell adhesiveness, *Mol. Endocrinol.*, 2005, 19, 2349-2357).

La generación de isoformas de la FN asociadas a tumor permite el desarrollo de ligandos específicos (p. ej., anticuerpos), que pueden usarse para la administración selectiva de agentes terapéuticos en el entorno tumoral. La FN es una diana de la intervención biomolecular, tanto en el desarrollo de moléculas inhibitoras que bloqueen su interacción con las integrinas y con otros receptores de la superficie celular como en el diseño de estrategias de diagnóstico por imagen y de tratamientos dirigidos basados en ligandos (Kaspar, M, Zardi, L, y Neri, D; Fibronectin as target for tumor therapy, *Int. J Cancer*, 2005, 118, 1331-1339). Un estudio demostró que el tratamiento mediante la expresión *in vivo* de un polipéptido CBD-HepII recombinante de la fibronectina, denominado CH50, inhibe fuertemente el crecimiento, la invasión y la angiogénesis tumoral. La terapia génica con CH50 no solo prolongó la supervivencia de ratones portadores de hepatocarcinoma en el hígado, sino que también suprimió el crecimiento y la capacidad invasiva del tumor en el bazo y sus metástasis en el hígado. En conjunto, tales hallazgos sugieren la posible utilidad del CH50 en la terapia génica contra el cáncer hepático (Liu, Y, Huang, B, Yuan, Y, Gong, W, Xiao, H, Li, D, Yu, ZR, Wu, FH, Zhang, GM, y Feng, ZH; Inhibition of hepatocarcinoma and tumor metastasis to liver by gene therapy with recombinant CBD-HepII polypeptide of fibronectin, *Int. J Cancer*, 2007 121 (1) 184-192). La fibronectina posee un sitio funcional oculto (secuencia YTIYVIAL dentro de la decimocuarta repetición de tipo III) que se opone a la adhesión de la célula a la matriz extracelular. Un péptido de 22 unidades monoméricas de la FN que contiene este sitio, denominado FNIII14, inhibe la adhesión mediada por la integrina beta-1 sin unirse a las integrinas. El estudio demuestra que el FNIII14 podría impedir la metástasis de las células de linfoma (Kato, R, Ishikawa, T, Kamiya, S, Oguma, F, Ueki, M, Goto, S, Nakamura, H, Katayama, T, y Fukai, F; A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin, *Clin Cancer Res.*, 2002, 8, 2455-2462).

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células normales. Por esa razón el estado del EGFR suele aparecer alterado en una serie de tipos de tumores humanos y en general tiene correlación con un pronóstico malo. Contribuye al crecimiento y supervivencia de las células neoplásicas a través de diversas vías divergentes (Maehama, T y Dixon, JE; The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J Biol Chem.*, 1998, 273, 13375-13378). Las anomalías del EGFR constituyen una de las aberraciones moleculares más habituales en el glioblastoma (Zawrocki, A y Biernat, W; Epidermal growth factor receptor in glioblastoma, *Folia Neuropathol.*, 2005, 43, 123-132).

La amplificación del EGFR y la sobreexpresión de su ARNm son frecuentes en los gliomas de alto grado de origen astrocítico, y siempre están estrechamente asociadas con un nivel elevado de la proteína EGFR (Wong, AJ, Bigner,

SH, Bigner, DD, Kinzler, KW, Hamilton, SR, y Vogelstein, B; Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 1987, 84, 6899-6903; Chaffanet, M, Chauvin, C, Laine, M, Berger, F, Chedin, M, Rost, N, Nissou, MF, y Benabid, AL; EGF receptor amplification and expression in human brain tumors, 1992, Eur. J Cancer, 28, 11-17). La sobreexpresión de la proteína sin amplificación génica se ha descrito hasta en el 27 % de los glioblastomas, pero también se ha descrito que los astrocitomas y los oligodendrogliomas, menos malignos, también la presentan sin la amplificación del gen en cuestión (Reifenberger, J, Reifenberger, G, Ichimura, K, Schmidt, EE, Wechsler, W, y Collins, VP; Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors, Am. J Pathol., 1996, 149, 29-35).

Las implicaciones pronósticas de la amplificación/sobreexpresión del EGFR en los tumores cerebrales son controvertidas. Algunos autores no han hallado ninguna influencia de la amplificación/sobreexpresión del EGFR en la supervivencia de los pacientes (Olson, JJ, Barnett, D, Yang, J, Assietti, R, Cotsonis, G, y James, CD; Gene amplification as a prognostic factor in primary brain tumors, Clin Cancer Res., 1998, 4, 215-222; Newcomb, EW, Cohen, H, Lee, SR, Bhalla, SK, Bloom, J, Hayes, RL, y Miller, DC; Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes, Brain Pathol, 1998, 8, 655-667; Waha, A, Baumann, A, Wolf, HK, Fimmers, R, Neumann, J, Kindermann, D, Astrahantseff, K, Blumcke, I, von, DA, y Schlegel, U; Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas, J Neurosurg, 1996, 85, 634-641) mientras que otros han llegado a la conclusión de que tales alteraciones influyeron negativamente en el pronóstico (Etienne, MC, Formento, JL, Lebrun-Frenay, C, Gioanni, J, Chatel, M, Paquis, P, Bernard, C, Courdi, A, Bensadoun, RJ, Pignol, JP, Francoual, M, Grellier, P, Frenay, M, y Milano, G; Epidermal growth factor receptor and labelling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome, Clin Cancer Res., 1998, 4, 2383-2390; Jaros, E, Perry, RH, Adam, L, Kelly, PJ, Crawford, PJ, Kalbag, RM, Mendelow, AD, Sengupta, RP, y Pearson, AD; Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumors, Br. J Cancer, 1992, 66, 373-385; Schlegel, J, Merdes, A, Sturmm, G, Albert, FK, Forsting, M, Hynes, N, y Kiessling, M; Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma, Int. J Cancer, 1994, 56, 72-77; Zhu, A, Shaeffer, J, Leslie, S, Kolm, P, y El-Mahdi, AM; Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation, Int. J Radiat. Oncol. Biol Phys., 1996, 34, 809-815).

Existen algunas estrategias terapéuticas relacionadas con la molécula del EGFR en las células cancerosas. Las más ampliamente estudiadas son: el tratamiento con anticuerpos específicos mediante anticuerpos desnudos o conjugados con toxinas, liposomas o núclidos, y el uso de inhibidores de la tirosina-quinasa receptora. Existen varios tipos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFRwt. Unos bloquean el acceso de los ligandos al receptor (cetuximab) y otros provocan la rápida internalización del receptor (ABX-EGF) (Sridhar, SS, Seymour, L, y Shepherd, FA; Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer, Lancet Oncol., 2003, 4, 397-406). Pero como el EGFRwt también aparece en la superficie de las células normales, los efectos secundarios pueden limitar su uso.

El EGFR aparece sobreexpresado en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) en el que sus niveles de expresión se correlacionan con la disminución de la supervivencia. Los tratamientos que bloquean el EGFR han demostrado eficacia limitada en los ensayos clínicos y básicamente en combinación con el tratamiento estándar. El EGFRvIII se expresa en el HNSCC, donde contribuye a reforzar el crecimiento y la resistencia frente a los tratamientos dirigidos contra el EGFR natural (*wild type*). La eficacia antitumoral de las estrategias dirigidas contra el EGFR podría mejorar con la adición del bloqueo específico del EGFRvIII (Sok, JC, Coppelli, FM, Thomas, SM, Lango, MN, Xi, S, Hunt, JL, Freilino, ML, Graner, MW, Wikstrand, CJ, Bigner, DD, Gooding, WE, Furnari, FB, y Grandis, JR; Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting, Clin Cancer Res., 2006, 12, 5064-5073).

Otra estrategia consiste en inducir, de manera selectiva, la muerte de células de glioblastoma y de otras células cancerosas que sobreexpresen el receptor del EGF. Con un vector no viral que reconoce específicamente el receptor del EGF se ha conseguido introducir de forma selectiva en células cancerosas un ARNdc sintético antiproliferativo (poliinosina-citosina [poli-IC]). La poli-IC dirigida contra el EGFR indujo con rapidez la apoptosis en las células diana tanto *in vitro* como *in vivo*. La liberación en el tumor de la poli-IC dirigida contra el EGFR indujo la regresión completa de tumores intracraneales preestablecidos en ratones atímicos, sin que se apreciaran efectos adversos tóxicos en el tejido cerebral normal. Un año después de finalizar el tratamiento, los ratones tratados seguían sanos y sin cáncer (Shir, A, Ogris, M, Wagner, E, y Levitzki, A; EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice, PLoS. Med, 2006 Jan; 3(1):e6. Epub 2005 Dec 6).

La aplicación de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) se ha convertido en una herramienta eficaz y muy específica para modular la expresión génica, y se ha silenciado de un modo satisfactorio una gran variedad de oncogenes. La regulación negativa del EGFR mediante ARNsi se demostró en dos estirpes celulares de glioma establecidas que presentaban diferentes niveles de expresión de este receptor (U373 MG, LN18). La expresión del ARNm y de la proteína del EGFR se reguló negativamente un 70 % - 90 %. Sin embargo, el tratamiento con ARNsi no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre la proliferación, migración y estado de activación celular de las cascadas de señalización acopladas al EGFR. En concordancia con estos resultados, los análisis de la expresión génica con micromatrices solo revelaron pequeños cambios, aunque específicos, en los patrones de expresión. En suma, estos

datos indican que la regulación negativa del EGFR podría no bastar como monoterapia contra el glioma maligno (Vollmann, A, Vornlocher, HP, Stempf, T, Brockhoff, G, Apfel, R, y Bogdahn, U; Effective silencing of EGFR with RNAi demonstrates non-EGFR dependent proliferation of glioma cells, *Int. J Oncol.*, 2006, 28, 1531-1542).

5 Diversos estudios clínicos han ofrecido resultados prometedores. Por ejemplo: El h-R3 es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el dominio externo del EGFR con alta afinidad, inhibiendo así la activación de la tirosina quinasa. Con el fin de evaluar la seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia preliminar del h-R3 en pacientes con glioma de alto grado recién diagnosticado, se llevó a cabo un estudio de fase I/II (Ramos, TC, Figueredo, J, Catala, M, Gonzalez, S, Selva, JC, Cruz, TM, Toledo, C, Silva, S, Pestano, Y, Ramos, M, Leonard, I, Torres, O, Marinello, P, Perez, R, y Lage, A; Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial, *Cancer Biol Ther.*, 2006, 5, 375-379).

10 El EKB-569 es un potente inhibidor de bajo peso molecular, selectivo e irreversible del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que se está desarrollando como antineoplásico. Se ha llevado a cabo un estudio de fase 1 de aumento de la dosis en pacientes japoneses. De acuerdo con los criterios RECIST (criterios de respuesta a la evaluación de tumores sólidos), estos pacientes presentaron enfermedad estable pero regresión radiográfica del tumor (Yoshimura, N, Kudoh, S, Kimura, T, Mitsuoaka, S, Matsuura, K, Hirata, K, Matsui, K, Negoro, S, Nakagawa, K, y Fukuoka, M; EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib, *Lung Cancer*, 2006, 51, 363-368).

15 Gefitinib, un inhibidor específico de la tirosina quinasa acoplada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ha demostrado su eficacia en un subgrupo de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) que fracasan con la quimioterapia convencional. También se le ha atribuido un efecto antitumoral en metástasis cerebrales de NSCLC. Además, las mutaciones del EGFR han demostrado una fuerte asociación con la sensibilidad del NSCLC al gefitinib. Asimismo se ha evaluado su eficacia en metástasis cerebrales de NSCLC, así como el vínculo entre dicha eficacia y mutaciones del EGFR. Gefitinib parece ser eficaz como tratamiento contra las metástasis cerebrales en un subgrupo de pacientes. Los datos apuntan a la posible relación entre la eficacia del gefitinib en el tratamiento de las metástasis cerebrales y las mutaciones del EGFR (Shimato, S, Mitsudomi, T, Kosaka, T, Yatabe, Y, Wakabayashi, T, Mizuno, M, Nakahara, N, Hatano, H, Natsume, A, Ishii, D, y Yoshida, J; 2006, EGFR mutations in patients with brain metastases from lung cancer: association with the efficacy of gefitinib, *Neuro. Oncol.*, 8, 137-144).

30 Quitinasa 3 de tipo 2 (CHI3L2)

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

Doblecortina y CaM quinasa de tipo 2 (DCAMKL2)

45 La proteína DCX asociada a los microtúbulos (MT) desempeña un papel esencial en el desarrollo de la corteza cerebral en los mamíferos. Se ha publicado la identificación de una proteína quinasa, la doblecortina quinasa-2 (DCAMKL2), dotada de un dominio (DC) altamente homólogo a la DCX. La DCAMKL2 tiene actividad de unión a los MT a través de su dominio DC y actividad de proteína quinasa mediada por un dominio quinasa, organizada en una estructura en la que ambos dominios son funcionalmente independientes.

50 La sobreexpresión de la DCAMKL2 estabiliza el citoesqueleto de los microtúbulos contra la despolimerización inducida por el frío. La autofosforilación de la DCAMKL2 reduce de forma acusada su afinidad por los MT. Los ARNm de la DCAMKL2 y de la DCX son específicos del sistema nervioso y se expresan durante el período de laminación de la corteza cerebral. La DCX está regulada negativamente después del nacimiento, en tanto que la DCAMKL2 persiste en abundancia en la edad adulta, lo que sugiere que la secuencia DC tiene funciones desconocidas hasta el momento en el sistema nervioso maduro. En las neuronas simpáticas, la DCAMKL2 se localiza en el cuerpo celular y en los segmentos terminales de los axones y las dendritas.

55 Es posible que la DCAMKL2 actúe como un interruptor dependiente de la fosforilación en el control reversible de la dinámica de los MT CERCA de los conos de crecimiento neuronales. Los patrones de expresión, las actividades funcionales, la regulación y la localización de la DCAMKL2 sugieren que actúa en paralelo, o conjuntamente con, otros miembros de la familia de genes DC (genes que codifican el dominio DC) en acontecimientos importantes para el desarrollo neural y, posiblemente, en aquellos que son característicos del sistema nervioso maduro. La DCAMKL2

está compuesta de dos dominios funcionales e independientes, un dominio de unión y de estabilización de MT (la secuencia DC) y un dominio quinasa con actividad de proteína-fosfotransferasa.

Se ha planteado que la secuencia DC jugaría un papel esencial en la transducción de las señales extracelulares y de las señales intracelulares derivadas de ellas en cambios en la dinámica de los MT. En particular, dada su capacidad para interactuar con los MT regulada por la fosforilación y su localización en los segmentos terminales de los axones y de las dendritas, regiones en las que los MT sufren inestabilidad dinámica, la DCAMKL2 debería considerarse como un posible mediador de las reorganizaciones rápidas del citoesqueleto que se producen en respuesta a los acontecimientos de transmisión de señales neuronales (Edelman, AM, Kim, WY, Higgins, D, Goldstein, EG, Oberdoerster, M, y Sigurdson, W; Doublecortin kinase-2, a novel doublecortin-related protein kinase associated with terminal segments of axons and dendrites, *J Biol Chem.*, 2005, 280, 8531-8543).

Canal de potasio rectificador de entrada sensible al ATP 10 (KCNJ10)

La función principal de los canales de potasio rectificadores de entrada (Kir) consiste en crear la elevada selectividad hacia el potasio (K⁺) de la membrana de los gliocitos y el potencial de membrana en reposo (PMR) intensamente negativo, ambas propiedades fisiológicas características de la glía. La propiedad clásica de los canales Kir consiste en que el K⁺ fluye hacia el interior cuando el PMR es negativo respecto al potencial de equilibrio del K⁺ (E(K)), pero con potenciales más positivos inhiben las corrientes de salida. Una característica de la glía del SNC es la expresión específica del subtipo KCNJ10, un actor importante en la conductancia del K⁺ en las membranas de los gliocitos y clave en el ajuste del PMR glial. Así pues, los canales Kir, y en particular el KCNJ10, son reguladores clave de las funciones gliales, que a su vez determinan la excitabilidad neuronal y la conducción axonal (Butt, AM y Kalsi, A; Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4. 1 in glial functions, *J Cell Mol. Med.*, 2006, 10, 33-44).

La disminución de la capacidad de amortiguación del potasio y del glutamato en los astrocitos provoca la hiperexcitabilidad de las neuronas y la alteración de la transmisión sináptica. Los canales KCNJ10 son básicamente responsables de la hiperpolarización de los astrocitos corticales y probablemente juegan un papel importante en la amortiguación del potasio. La supresión tangible de la depuración del glutamato en los astrocitos a través de la atenuación de la expresión génica del KCNJ10 pone de manifiesto el papel de la hiperpolarización de la membrana en este proceso (Kucheryavykh, YV, Kucheryavykh, LY, Nichols, CG, Maldonado, HM, Baksi, K, Reichenbach, A, Skatchkov, SN, y Eaton, MJ.; Downregulation of Kir4. 1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes, *Glia* 2006, 55 (3), 274 - 281).

La amortiguación espacial por parte del KCNJ10 del K⁽⁺⁾ extracelular en el sistema nervioso central solo es posible debido a la distribución desigual del canal en la superficie del gliocito. En diversos tumores cerebrales humanos (astrocitomas y oligodendrogliomas de alto y bajo grado), se ha observado la localización anómala del KCNJ10, lo cual indica que la capacidad de amortiguación de los gliocitos podría estar alterada y provocaría la entrada de agua (edema citotóxico) (Warth, A, Mittelbronn, M, y Wolburg, H; Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K⁺ channel protein Kir4. 1 differs in low- and high-grade human brain tumors, *Acta Neuropathol.* (Berl), 2005, 109, 418-426). El KCNJ10 también apareció regulado positivamente en los astrocitos de cerebros dañados. Se ha propuesto la hipótesis siguiente: en condiciones normales en los astrocitos la AQP4 acopla el transporte de agua con el bombeo del K⁺ mediado por el KCNJ10, pero en estados patológicos, la AQP4 facilita el flujo del líquido edematoso cerebral y el KCNJ10 amortigua el K⁺ extracelular elevado (Saadoun, S, Papadopoulos, MC, y Krishna, S; Water transport becomes uncoupled from K⁺ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumors: immunohistochemical case review, *J Clin Pathol.*, 2003, 56, 972-975).

Es sabido que los péptidos que son presentados por MHC de clase II están compuestos por una "secuencia central" que tiene un motivo de aminoácidos específico de un HLA determinado y, opcionalmente, 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 de todos o de un subconjunto de clones de linfocitos T que reconocen el homólogo natural). Las extensiones N y/o C-terminales pueden tener, por ejemplo, entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, respectivamente. Estos péptidos se pueden utilizar directamente para cargar las moléculas de MHC de clase II o bien la secuencia se puede clonar en vectores de acuerdo con la descripción ofrecida más adelante 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.

En consecuencia, las variantes naturales o artificiales que inducen la reacción cruzada de los linfocitos T con un péptido como el descrito, son a menudo variantes de longitud. La Tabla 1 ofrece ejemplos de tales variantes de longitud naturales en las SEC ID NO 11 y 12, y 21 y 24, respectivamente.

Si un péptido más largo de aproximadamente 12 restos de aminoácidos se utiliza directamente para unirse a una molécula de MHC de clase II, es preferible que los restos que flanquean la región de unión a HLA central sean restos 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 CTL. No obstante, como se ha indicado anteriormente, se apreciará que es posible usar péptidos más grandes, p. ej. los codificados por un polipéptido, ya que estos péptidos más grandes pueden fragmentarse por células presentadoras de antígeno adecuadas.

También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 10 aminoácidos de longitud, se generen mediante el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítomo real. A semejanza de los epítomos de MHC de clase II, es preferible que los restos que flanquean la región de unión, no alteren sustancialmente la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula de MHC de clase I o para presentar el péptido al CTL ni enmascarar los sitios de escisión proteolítica necesarios para exponer el auténtico epítomo durante el procesamiento.

Por supuesto, el péptido de acuerdo con la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I. La unión de un péptido a un complejo MHC puede analizarse con procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, los descritos en el ejemplo 4 de la presente invención o los descritos en la bibliografía para diferentes alelos de MHC de clase II (p. ej. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R; Ligand motifs of HLA-DRB5*0T01 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides; J Immunol. 1994; 153(4): 1665-1673; Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A; Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands; J Immunol. 1994; 153(3):1141-1149; Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP; Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11; J Exp Med. 1999; 189(5): 871876; Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasini P, Nagy ZA, Sinigaglia F; Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association; J Exp Med. 1995 181(5):1847-1855; Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE; A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins; J Immunol Methods. 1993; 163(2): 209-216; Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Haider T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavelli RA, Altmann DM; 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. 1998 (12):1765-1776).

No obstante, estos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido dado a conocer en las células. En una realización de la presente invención, el péptido es parte de una proteína de fusión que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (li) (p33, en lo sucesivo "li") como la derivada del NCBI, número de referencia de GenBank X00497 (Strubin, M., Mach, B. and Long, E. O. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity EMBO J. 1984 3 (4), 869-872).

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{-S}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}$, $-\text{COCH}_2$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ y $-\text{CH}_2\text{SO}$ -. La patente de Estados Unidos 4. 897. 445 proporciona un procedimiento para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos ($-\text{CH}_2\text{-NH}$) 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 NaCNBH_3 .

Pueden sintetizarse péptidos que comprendan las secuencias descritas anteriormente con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, pueden añadirse grupos hidrófobos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo 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, el grupo hidrófobo t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden añadirse en los extremos carboxilo de los péptidos.

Adicionalmente, los péptidos como los descritos pueden sintetizarse para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el D-isómero de uno o más de los restos de aminoácidos del péptido en lugar del L-isómero habitual. Y aún más, al menos uno de los restos de aminoácidos de los péptidos como los descritos puede sustituirse por uno de los consabidos restos 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 como el descrito puede modificarse químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. En la técnica se conocen ejemplos de tales modificaciones y aparecen resumidos, por ejemplo, en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3ª ed. CRC Press, 2005. La modificación química de aminoácidos incluye, pero sin limitación, la modificación por acilación, amidación, 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 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 al experto en la técnica al Capítulo 15 de Current Protocols In Protein Science, Eds. Coligan y col. (John Wiley & Sons NY 1995-2000), donde hallará una metodología más exhaustiva relacionada con la modificación química de las proteínas.

En resumen, la modificación de, p. ej., los restos arginilos de las proteínas, se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes tales como fenilgloxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal con restos 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 Pierce Chemical Company, Sigma-Aldrich y otras ofrecen información sobre reactivos concretos.

5 La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos puede formar y oxidar puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar restos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un resto de lisina y un resto de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de restos histidilo en proteínas. La histidina también puede modificarse con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los restos de lisina y otros grupos α -amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etileno)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. Los restos de metionina de las proteínas se pueden modificar, por ejemplo, con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T. Los restos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede efectuar con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

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

20 El éxito de la modificación de proteínas y péptidos terapéuticos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que el entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos para inmunoterapia se consigue a menudo mediante carbamilación con cianato potásico.

En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los restos de aminoácidos) pueden sintetizarse utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el procedimiento de Fmoc-poliámida, como muestran Lu y col J. Org. Chem. 1981, 46, 3433 y las referencias que aparecen en dicho documento. 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 podrían protegerse 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 restos 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), bisacriloilendiamina (reticulante) y acriloisarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es el derivado del ácido 4-hidroximetil-fenoxiacético, 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 al 50 %. Los capturadores utilizados normalmente son etandiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. Además es posible optar por una combinación de procedimientos en fase sólida y fase en solución para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future Curr Pharm Biotechnol. 2004 Feb; 5(1):29-43 y referencias citadas en su interior).

50 El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación al vacío, con trituración posterior con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores presentes se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Para la síntesis de péptidos los reactivos pueden obtenerse, generalmente, por ejemplo, en Calbiochem-Novabiochem (RU) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

La purificación puede efectuarse mediante una sola técnica o mediante una combinación de diversas técnicas, tales como 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.

55 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.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (p. ej. un polinucleótido) que codifica un péptido de la

invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, de ADN, ADNc, ARN, ARNm y ARNsi o combinaciones de los mismos, mono y/o bicatenarios. Por supuesto, solo los péptidos que contengan restos 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 de acuerdo con la invención.

5 Se han desarrollado diversos procedimientos para unir funcionalmente 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 después mediante puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

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

15 Un procedimiento deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa, tal y como exponen Saiki y col (1988) Science 239, 487-491. Este procedimiento puede utilizarse para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede emplearse 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.

20 El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) puede expresarse después en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido de la invención puede utilizarse de acuerdo con 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 para que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las desveladas en las patentes de EE. UU. N.º 4. 440. 859 expedida el 3 de abril de 1984 a Rutter y col., 4. 530. 901 expedida el 23 de julio de 1985 a Weissman, 4. 582. 800 expedida el 15 de abril de 1986 a Crowl, 4. 677. 063 expedida el 30 de junio de 1987 a Mark y col., 4. 678. 751 expedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel, 4. 704. 362 expedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura y col., 4. 710. 463 expedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray, 4. 757. 006 expedida el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. y col., 4. 766. 075 expedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel y col. y 4. 810. 648 expedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker.

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.

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

45 Las células hospedadoras que se hayan transformado con el ADN recombinante de la invención se cultivarán después durante un tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que los expertos en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas desveladas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, recuperarse.

50 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 de cáncer colorrectal o de glioblastoma disponibles en la ATCC Cell Biology Collection.

55 Un típico plásmido que sirve como vector para células de mamífero es el pSVL disponible en 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 que resultan útiles son pRS403-406 y pRS413-416, en general disponibles en 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). En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión adecuados para su uso con una variedad de células hospedadoras.

5 La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención siendo dicha célula hospedadora una célula presentadora de antígeno.

10 La transformación de células hospedadoras apropiadas con una construcción de ADN de la presente invención se realiza con procedimientos bien conocidos que normalmente dependen del tipo de vector que se utilice. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariontas, véanse, por ejemplo, Cohen y col. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook y col. (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 y col (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. El procedimiento de Beggs, Nature 1978, 275,104-109 también resulta útil. En lo que se refiere a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo, el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, de bacterias, de insectos y de vertebrados.

15 Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan una construcción de ADN de la presente invención, pueden identificarse con técnicas bien conocidas, tales como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

20 Se pueden utilizar células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, para expresar los péptidos de la invención, de tal forma que puedan cargarse en las moléculas de MHC apropiadas.

25 La célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o una célula presentadora de antígeno. Actualmente se están investigando las células presentadoras de antígeno, cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP), como tratamiento para el cáncer de próstata (Sipuleucel-T) (Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM.; Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; J Clin Oncol. 2006; 24(19):3089-3094; Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ; Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; Cancer. 2006; 107(1):67-74).

30 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para producir un péptido. El procedimiento comprende el cultivo de la célula hospedadora y el aislamiento del péptido de dicha célula o de su medio de cultivo.

35 En otra realización, el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención, se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido puede prepararse para inyección por vía intravenosa (i. v.), subcutánea (s. c.), intradérmica (i. d.), intraperitoneal (i. p.) o intramuscular (i. m.). Las vías preferidas para la inyección del péptido son s. c, i. d., i. p., i. m. e i. v. Los procedimientos preferidos para la inyección del ADN son i. d., i. m., s. c., i. p. e i. v. Según el péptido o el 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. En ensayos anteriores se han utilizado con éxito dosis de este intervalo (Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G; Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12):1553-1564; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Resumen N. ° 3017).

40 Un aspecto importante de la presente invención es un procedimiento *in vitro* para producir CTL activados. El procedimiento comprende la puesta en contacto *in vitro* de CTL con moléculas de MHC de clase I humanas cargadas con antígeno y expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un periodo de tiempo suficiente para activar los CTL de una manera específica de antígeno. El antígeno es un péptido de acuerdo con la invención. Preferentemente se emplea una cantidad de antígeno suficiente con una célula presentadora de antígeno.

45 Cuando se utilice como antígeno un epítipo de MHC de clase II, los CTL serán linfocitos cooperadores CD4 positivos, preferiblemente del tipo T_{H1}. Las moléculas de MHC de clase II pueden expresarse en la superficie de cualquier célula adecuada pero es preferible que la célula no exprese de forma natural moléculas de MHC de clase II (en cuyo caso la célula será transfectada para expresar dicha molécula). Si, en cambio, la célula expresa de forma natural moléculas de MHC de clase II es preferible que sea defectuosa en los mecanismos de procesamiento o de presentación de los antígenos. De ese modo será posible que la célula que expresa la molécula de MHC de clase II quede completamente sensibilizada con un antígeno peptídico escogido antes de activar al CTL.

La célula presentadora de antígeno (o célula estimuladora) normalmente posee moléculas de MHC de clase II en su superficie y es preferible que sea 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.

5 Preferiblemente, la célula de mamífero carecerá del transportador de péptidos TAP o bien este estará presente en un nivel reducido o escasamente funcional. 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.

10 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 se describe en Karre y Ljunggren (1985) J. Exp. Med. 162,1745.

Es preferible que la célula hospedadora no exprese moléculas de MHC de clase I antes de la transfección. Preferiblemente la célula estimuladora expresará una molécula importante para la coestimulación de los linfocitos T, como cualquiera de las siguientes: B7. 1, B7. 2, ICAM-1 o LFA3.

15 Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas de MHC de clase II y de las moléculas coestimuladoras están disponibles al público en las bases de datos del GenBank y del EMBL.

20 De forma similar, en el caso del epítipo de MHC de clase I usado como antígeno, las CTL son linfocitos cooperadores CD8 positivos. Las moléculas de MHC de clase I pueden expresarse en la superficie de cualquier célula adecuada y es preferible que la célula no exprese de forma natural moléculas de MHC de clase I (en cuyo caso la célula se transfecta para expresar dicha molécula). Como alternativa, si la célula expresa de forma natural moléculas de MHC de clase I, es defectuosa en las rutas de procesamiento de antígenos o de presentación de los mismos.

De ese modo, es posible que la célula que expresa la molécula de MHC de clase I, quede completamente sensibilizada con el antígeno peptídico escogido antes de activar el CTL.

25 Si una célula presentadora de antígeno se transfecta para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga la secuencia ALFVRLALLA de acuerdo con la SEC ID N.º 8.

30 Pueden usarse diversos procedimientos distintos para generar CTL *in vitro*. Por ejemplo, los procedimientos descritos en Peoples y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 432-436 y Kawakami y col (1992) J. Immunol. 148, 638-643 usan linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski y col (1995) Eur. J. Immunol. 25, 1783-1787 recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los CTL. Jochmus y col (1997) J. Gen. Virol. 78, 1689-1695 describen la producción de CTL autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de infección con virus recombinantes. Hill y col (1995) J. Exp. Med. 181, 2221-2228 y Jerome y col (1993) J. Immunol. 151, 1654-1662 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 y col. (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Burning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T-cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15; 171 (10):4974-8) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales, que es también un modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección.

35 40 En la preparación de los CTL también se pueden utilizar células alogénicas; en el documento WO 97/26328 se describe detalladamente un procedimiento a modo de ejemplo. Además de células de *Drosophila* y células T2, para presentar antígenos pueden utilizarse, por ejemplo, otros tipos tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras o células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo pueden utilizarse virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta y col., Virology, 1994, 202, 449-955, que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

Los CTL activados que están dirigidos contra el péptido de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona CTL activados obtenibles con los procedimientos de la invención anteriormente citados.

50 Los CTL activados producidos con el procedimiento anterior, reconocerán selectivamente una célula que exprese de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 8.

55 Preferiblemente, el CTL reconoce la célula interactuando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido (por ejemplo, mediante unión). Los CTL son útiles en un procedimiento de destrucción de células diana en un paciente, en el que las células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención. Al paciente se le administrará un número eficaz de CTL activados. Los CTL administrados al paciente pueden proceder del mismo paciente y activarse del modo descrito anteriormente (es

decir, son CTL autólogos). Otra alternativa consiste en que los CTL no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que el donante sea un individuo sano. Por "individuo sano" los autores de la invención entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, que no padezca ninguna enfermedad que pueda detectarse fácilmente mediante análisis.

Las células diana *in vivo* para los CTL CD4 positivos de acuerdo con la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales que envuelven el tumor (células tumorales) (que a veces también expresan MHC de clase II; (Dengjel, J, Nastke, MD, Gouttefangeas, C, Gitsioudis, G, Schoor, O, Altenberend, F, Mulier, M, Kramer, B, Missiou, A, Sauter, M, Hennenlotter, J, Wernet, D, Stenzl, A, Rammensee, HG, Klingel, K, and Stevanovic, S; Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas, Clin Cancer Res., 2006, 12, 4163-4170)).

Los CTL de la invención pueden usarse como principios activos de una composición terapéutica. Así pues, la invención también describe un procedimiento 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. El procedimiento comprende la administración al paciente de un número eficaz de CTL tal y como se ha definido antes.

Por "expresado de forma aberrante" los autores de la invención 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 autores de la invención quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel presente en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

Los CTL pueden obtenerse a través de procedimientos conocidos en la materia, tales como, por ejemplo, los descritos anteriormente.

Los protocolos para esta transferencia de CTL, denominada adoptiva, se conocen perfectamente en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo en: (Rosenberg, SA, Lotze, MT, Muul, LM, Chang, AE, Avis, FP, Leitman, S, Linehan, WM, Robertson, CN, Lee, RE, Rubin, JT, y col., 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., 1987, 316, 889-897; Rosenberg, SA, Packard, BS, Aebersold, PM, Solomon, D, Topalian, SL, Toy, ST, Simon, P, Lotze, MT, Yang, JC, Seipp, CA, y col.; Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report, N. Engl. J Med, 1988, 319, 1676-1680; 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, y Rosenberg, SA; Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, Science, 2002, 298, 850-854; Yee, C, Thompson, JA, Byrd, D, Riddell, SR, Roche, P, Celis, E, and Greenberg, PD; 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, 2002, 99, 16168-16173; 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, y Rosenberg, SA; Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma, J. Clin. Oncol., 2005, 23, 2346-2357); y aparecen revisados en (Gattinoni, L, Powell, DJ, Jr., Rosenberg, SA, y Restifo, NP; Adoptive immunotherapy for cancer: building on success, Nat. Rev. Immunol., 2006, 6, 383-393) y (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, y Rosenberg, SA; Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, Science, 2006, 314 (5796): 126-129).

Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, vector de expresión, célula o CTL activado es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención puede utilizarse como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede utilizarse sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o con cualquier molécula o moléculas conocidas.

Preferiblemente, el medicamento es una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica, o aplicarse *ex vivo* a células procedentes del paciente o a una estirpe celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias procedentes del paciente, que después vuelven a administrarse al mismo. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células se transfecten para que expresen simultáneamente citocinas inmunostimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunostimulador (véase más adelante) o utilizarse en combinación con citocinas inmunostimuladoras, o administrarse mediante un sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también puede conjugarse con un transportador adecuado, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH)

o manano (véase el documento WO 95/18145 y Longenecker y col. (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690, 276-291). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos de la presente invención estimulen a los CTL CD4 o CD8. No obstante, la estimulación es más eficiente si se cuenta con la ayuda de los linfocitos T positivos para el CD opuesto. Así pues, en el caso de los epítomos de MHC de clase II que estimulan a los CTL CD4, el compañero de fusión, o las secciones de una molécula híbrida adecuada, proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD8 positivos. Por otro lado, en el caso de 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 los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto de la invención, la vacuna comprende al menos un péptido, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 15 y más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece péptidos como los dados a conocer o péptidos adicionales. El péptido, o los péptidos, pueden proceder de uno o más AAT específicos y pueden unirse a moléculas de MHC de clase I y/o II.

Preferiblemente, cuando el péptido de la invención se usa en una vacuna o medicamento de la invención, está presente en forma de sal, tal como, por ejemplo, pero sin limitación, una sal de acetato o una sal de cloruro. El ejemplo 7 presenta estudios con la vacuna IMA-910, que contiene algunos de los péptidos dados a conocer y describe la preparación de la misma usando péptidos en su forma de sal y su tamaño de partícula.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, ARN o una combinación de los mismos. En la técnica, los procedimientos para diseñar e introducir dicho ácido nucleico, son muy conocidos. Se puede obtener una visión general, por ejemplo, en S. Pascolo: Vaccination with messenger RNA Methods Mol Med 2006, 127; 23-40; R. Stan, JD Wolchok y AD Cohen DNA vaccines against cancer Hematol Oncol Clin North Am 2006, 3; 613-636 o en A Mahdavi y BJ Monk Recent advances in human papillomavirus vaccines Curr Oncol Rep 2006, 6, 465-472. Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el modo de acción por el cual tales vectores inducen una 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 adenoasociados o híbridos que contienen elementos de más de un virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos y se conocen bien en las técnicas de liberación de ADN. También puede utilizarse la liberación física, tal como la "pistola génica". El péptido o péptido codificado por el ácido nucleico, puede ser una proteína de fusión, por ejemplo, con un epítomo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto, tal y como se ha indicado anteriormente.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej. respuestas inmunitarias mediadas por CTL y por linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y por tanto, podrían considerarse útiles en el medicamento de la presente invención. Como adyuvantes adecuados se incluyen, pero sin limitación: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS 15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila, que procede de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared celular bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren adyuvantes tales como e, adyuvante de Freund o el GM-CSF. Anteriormente se han descrito diversos adyuvantes inmunitarios (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas y su preparación (Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM; Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison AC; The mode of action of immunological adjuvants; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les 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. ° 5. 849. 589) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12) (Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las 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 que produce una mayor activación de los linfocitos T_{H1} y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta T_{H1} provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund

incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta T_{H2}. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, June 2006, 471-484). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes que no son 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 comercial 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.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen, pero sin limitación, CpG químicamente modificados (p. ej. CpR, Idera), Poli(I:C), como AmpliGen, ADN o ARN bacteriano sin CpG, así como pequeñas moléculas inmunoactivas y anticuerpos como ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, sorafinib, XL-999, CP-547632, pazopanib, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4 y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son dSLIM, BCG, OK432, ALDARA, PeviTter y JuvImmune.

Preferiblemente los medicamentos de la presente invención son activos contra el cáncer. El cáncer puede ser no metastásico o metastásico, en concreto cáncer de la cavidad bucal o la faringe, cáncer del tubo digestivo, cáncer de colon, recto o ano, cáncer de las vías respiratorias, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, vagina o vulva, cáncer del cuerpo uterino y de ovario, cáncer de las vías genitales masculinas, cáncer de las vías urinarias, cáncer de hueso y tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, melanoma cutáneo, melanoma ocular, y cáncer ocular no melanómico, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de tiroides y de otras glándulas endocrinas, linfoma de hodgkin, linfoma no hodgkiniano y mieloma. Más preferiblemente el trastorno neoplásico tratado con el procedimiento de la presente invención es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de estómago, GIST o glioblastoma.

Como el péptido de la invención se aisló de glioblastoma y de cáncer colorrectal, pancreático, pulmonar, renal y gástrico, el medicamento de la invención será especialmente útil si el cáncer a tratar es un glioblastoma o un cáncer colorrectal, pancreático, pulmonar, renal o gástrico.

Además de ser útil para el tratamiento del cáncer, los péptidos como los descritos, son útiles para el diagnóstico. Puesto que los péptidos se generaron de glioblastoma y se ha determinado que no están presentes en los tejidos normales, dichos péptidos pueden utilizarse para diagnosticar la presencia de un cáncer

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

La detección de los péptidos como los descritos, 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 espera que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo muy conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de los péptidos como los descritos, indica que las células analizadas no utilizan este mecanismo.

Los péptidos dados a conocer, pueden utilizarse para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las respuestas de los linfocitos T o de los anticuerpos contra los péptidos como los descritos o los péptidos como los descritos formando complejos con moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden utilizarse como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden utilizarse como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, tales 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 como los descritos pueden tenerse en cuenta para la evaluación de efectos secundarios. El control 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.

Los péptidos de la presente invención pueden utilizarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra

complejos MHC/péptido. Estos pueden utilizarse como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otro uso de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por imagen, como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o a determinar el tamaño y la ubicación exacta de los tejidos enfermos. Además, los péptidos pueden utilizarse para verificar el diagnóstico histopatológico de un cáncer basado en una muestra de biopsia.

Se describe un kit que comprende (a) un envase que contiene una composición farmacéutica como la descrita anteriormente, 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) la reconstitución y/o el uso de la formulación liofilizada. Dicho kit 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.

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

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

Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El kit también puede incluir 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.

Los kits que se describen pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, acompañado o no de otros componentes (p. ej. otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden tener un envase distinto para cada componente.

Preferiblemente, los kits como los descritos incluyen una formulación de la invención acondicionada para su uso y que se administra conjuntamente con un segundo compuesto (tal como un adyuvante (p. ej. GM-CSF), un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o un agente antiangiogénesis, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del kit pueden agruparse previamente o cada componente puede estar en un envase distinto separado antes de la administración al paciente. Los componentes del kit pueden proporcionarse en una o más soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del kit también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

El envase de un kit terapéutico puede ser un vial, un tubo de ensayo, un matraz, un frasco, una jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o un líquido. Si hay más de un componente, normalmente el kit contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El kit también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el kit 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 kit.

La formulación farmacéutica de la presente invención es 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. Preferiblemente la administración será por vía subcutánea, y más preferiblemente intradérmica. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

Ejemplos

1. Síntesis y estructura

Los péptidos se sintetizaron mediante procedimientos convencionales y bien establecidos de síntesis en fase sólida utilizando química Fmoc. Después de la purificación con HPLC preparativa, se aplicó un procedimiento de intercambio iónico para incorporar contraiones (acetato o cloruro) fisiológicamente compatibles. Por último, se sometieron a liofilización y se obtuvo una sustancia sólida blanca o casi blanca. Todos los TUMAP se administran en forma de sales de acetato excepto el IMA-CCN-001 que se administra en forma de sal de cloruro por razones

técnicas durante el proceso de fabricación.

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

Muestras de tejido

5 Los tejidos tumorales y sanos procedentes de pacientes fueron facilitados por varios centros clínicos (véase la Tabla más adelante). Los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

10 Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos según un protocolo ligeramente modificado (Falk, K. Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. y Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature 351, 290-296 (1991); Seeger, F. H. y col. The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. Immunogenetics 49, 571-576 (1999)) usando 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
15 ultrafiltración.

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

20 Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad por cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 5 µm (Dionex). El disolvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El disolvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80 %/agua. El pH de los dos disolventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15 % al 60 % de B en 90
25 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema de fraccionamiento. Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. A continuación se reveló la identidad de las secuencias peptídicas mediante espectrometría de masas (ESI-LCMS/MS) con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica.
30

Las Figuras 1 y 2 muestran a modo de ejemplo espectros obtenidos de tejido tumoral de varios TUMAP asociados a MHC de clase I (Fig. 1a-1h) y a MHC de clase II (Fig. 2a-2f).

3. Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos

35 Los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas de MHC probablemente son capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual proceden. A fin de minimizar el riesgo de que la vacuna con tales péptidos genere autoinmunidad los autores de la invención se centraron en los péptidos procedentes de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

40 El péptido ideal sería el procedente de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que procedían de genes dotados con una expresión ideal, los péptidos identificados se asignaron a las proteínas y a los genes, respectivamente, de los que procedían y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

Fuentes de ARN y preparación

45 Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por diversos centros clínicos (véase Tabla 2); todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

50 Las muestras de tejido tumoral se congelaron instantáneamente 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 purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos procedimientos 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) utilizando el Kit de RNA 6000 Pico LabChip (Agilent).

Experimentos con micromatrices

5 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 (http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx). En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó
10 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 Kit de BioArray High Yield RNA Transcript Labelling (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el Kit de GeneChip IVT Labelling (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y con un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A
15 GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el programa informático GCOS (Affymetrix), utilizando los ajustes predeterminados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos suministrados por Affymetrix (http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx). Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de las proporciones logarítmicas de las señales dadas por el programa informático y la muestra normal se estableció de forma arbitraria a 1,0.
20

Los perfiles de expresión de todos los péptidos como los descritos muestran una elevada expresión del correspondiente gen en el tejido tumoral, mientras que el gen no se expresa o lo hace muy poco en los tejidos normales.

25 La Fig. 3 muestra los perfiles correspondientes a los genes de los péptidos específicos del glioblastoma PTP-001 (gen: PTPRZ1, Fig. 3a), y CHI-001 (gen: CH3L2, Fig. 3b).

4. Redetección de los TUMAP identificados mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas ESI (CL-EM-ESI) en muestras de tumor adicionales

Se emprendió una búsqueda sistemática de los TUMAP identificados con el procedimiento del Ejemplo 1 en muestras de tumores colorrectales mediante espectrometría de masas.

30 Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de 5 µm (Dionex). El solvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El solvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80 %/agua. El pH de los dos solventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15 % al 60 % de B en 90 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema fraccionamiento. Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. Para la detección de los péptidos definidos se efectuó un cribado de alta sensibilidad con este tipo de experimentos con CL-EM-ESI en función de las masas moleculares y los tiempos de retención conocidos de los péptidos en el sistema cromatográfico. Así pues, para la selección del precursor se aplicó una lista que contenía los valores m/z de los péptidos identificados previamente (carga sencilla y/o doble). A continuación se reveló la identidad de la secuencia mediante espectrometría de masas (CL-EM-ESI/EM) con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica. La evaluación del rendimiento de la purificación del péptido HLA y de la reproducibilidad del sistema analítico, incluida la estabilidad del tiempo de retención se llevó a cabo usando la intensidad y el tiempo de retención de un péptido HLA-A*02 endógeno
45 abundante (YLLPAIVHI derivado de DDX5) como patrón interno. Por consiguiente, el criterio de admisión de la muestra de cáncer colorrectal (CCR) para la detección de los TUMAP previamente identificados en dichos experimentos consistió en una intensidad mínima de 650 cuentas por barrido de la señal del patrón interno con carga doble (YLLPAIVHI) en el experimento de CL-EM/EM para asegurar el éxito en el aislamiento del péptido HLA y el rendimiento correcto del sistema analítico.
50

55 La Tabla 2 expone los resultados de un análisis de muestras de cáncer de colon y recto en diversos estadios así como de metástasis originadas a partir del tumor primario. En la mayoría de las muestras se hallaron todos los TUMAP HLA-A*02. Las frecuencias de redetección de los TUMAP HLA-DR son por lo general menores. Esto era previsible porque en el caso de los péptidos HLA de clase II pueden existir diversas variantes de longitud de la

secuencia principal. Como control positivo se empleó el ODC-001, un TUMAP identificado anteriormente (M. Diehl, tesis doctoral 1998, Universidad de Tubinga) y presente en un gran número de tumores de colon.

Tabla 2 Redetección de los TUMAP en muestras de cancer colorrectal

N.º	Muestra de CCR	Localización del tumor	Estadio tumoral	TUMAP redetectados (+) o no detectados (-)										Clase II TGFB1-004
				Clase I										
				C20-001	TGFB1-001	TOP-001	NOX-001	PCN-001	ODC-001					
1	CCA062	Colon	I	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
2	CCA740	Colon	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
3	CCA165	Colon	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	CCA712	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
5	CCA707	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
6	CCA718	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
7	CCA739	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
8	CCA166	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	CCA734	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
10	CCA719	Colon	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
11	CCA725	Colon	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
12	CCA164	Colon	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
13	CCA167	Colon	IV	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
14	CCA056	Colon	?	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
15	CCA305	Colon	?	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
20	CCA708	Metástasis de colon	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	CCA160	Recto	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	CCA754	Recto	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
18	CCA170	Recto	III	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	+
19	CCA171	Recto	IV	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
21	CCA724	Metástasis de recto	IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% de detección en las muestras analizadas				100 %	100 %	87 %	67 %	80 %	100 %	100 %	33 %	33 %		

n. a.: no analizado

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

El ensayo de unión a HLA se realizó con el Kit ELISA Epl (proporcionado por Sceren Buus, Instituto de Inmunología y Microbiología Médicas de la Universidad de Copenhague, Dinamarca) siguiendo las indicaciones de Sylvester-Hvid (Sylvester-Hvid, C, Kristensen, N, Blicher, T, Ferre, H, Lauemoller, SL, Wolf, XA, Lamberth, K, Nissen, MH, Pedersen, LO, y Buus, S; Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction, Tissue Antigens, 2002, 59, 251-258) y del manual del fabricante del Kit ELISA Epl.

Preparación de las soluciones de péptidos

Los péptidos se disolvieron en DMSO + TFA al 0,5 % (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta una concentración de 10 mg/ml. La solución de trabajo más alta usada en este ensayo fue de 200 μ M, resultado de diluir la solución madre a 1:50 con tampón de dilución para péptidos (PBS con Lutrol-F68 al 0,1 % y rojo de fenol 10 mg/l) hasta un volumen final de 100 μ l. Se hizo una dilución seriada 5x con tampón de dilución para péptidos.

*Replegamiento de los complejos de HLA-A*0201/péptido*

De acuerdo con las indicaciones del manual de instrucciones, se preparó una solución de HLA-A*0201 concentrada 2x mezclando tampón pH 3x (pH 6,6), Lutrol-F68, β 2m humana y HLA-A*0201 recombinante (todos incluidos en el Kit ELISA Epl) con PBS.

Para el proceso de replegamiento se mezclaron 15 μ l de las diluciones seriadas del péptido con 15 μ l de la mezcla de MHC concentrada 2x en placas de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.) que se incubaron a 18 °C durante 48 horas.

Cuantificación de los complejos mediante ELISA

Se recubrieron placas Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.) con anticuerpo w6/32 5 μ g/ml diluido en tampón de recubrimiento (pH 9,6), se incubaron durante 24 h a 4 °C y se bloquearon con PBS al que se había añadido leche en polvo desnatada al 5 % (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta el día siguiente a 4 °C.

El patrón del complejo MHC (Kit ELISA Epl) se diluyó con PBS al que se había añadido leche en polvo desnatada (LPD) al 2 % (LPD/PBS) hasta una concentración de 10 nM. Se preparó una dilución seriada 3,16 x y se transfirió a una placa Maxisorp recubierta y bloqueada. Los complejos de péptido-MHC se diluyeron 10x con LPD/ PBS al 2 %, se transfirieron a la misma placa Maxisorp y se incubaron durante 2 horas a 4 °C. Se añadió anticuerpo de conejo anti-h β 2m (Kit ELISA Epl) diluido 1:2500 en una solución de LPD/ PBS al 2 %, y se incubó 1 hora a 4 °C. El tampón de amplificación (polímero de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP) y suero de ratón (ambos suministrados con el Kit ELISA Epl) se diluyeron con LPD/PBS al 2 %, se añadieron a las placas y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió el tampón de desarrollo (tetrametilbencidina, TMB; Kit ELISA Epl) y las placas se incubaron a oscuras durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 0,2 M (VWR, Darmstadt, Alemania). Las placas se leyeron a una D.O. de 450 nm con el lector de ELISA VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.).

Los datos se interpretaron con Excel y Prism®, Graphpad 3.0.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Cuanto más bajo es el valor de K_D mayor es la afinidad hacia el HLA-A*0201. Las afinidades de unión abarcaron un amplio abanico de aproximadamente cuatro décadas, pero la mayoría de los péptidos presentaron afinidades similares dentro de una década (C20-001, ODC-001, PCN-001, TOP-001). La afinidad de MUC-001 se sitúa alrededor de una década por debajo de la mayoría de los ligandos incluidos, pero pese a ello dicho péptido fue capaz de inducir la respuesta de los linfocitos T en una vacuna empleada contra el carcinoma renal (Wiarecky, J, Muller, MR, Wirths, S, Haider-Oehler, E, Dorfel, D, Schmidt, SM, Hantschel, M, Brugger, W, Schroder, S, Horger, MS, Kanz, L, y Brossart, P; Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients, Cancer Res., 2006, 66, 5910-5918). Por otra parte, NOX-001 presenta una afinidad de unión ligeramente mayor y TGFBI-001 presenta la afinidad más potente, con un valor K_D unas 100 veces menor que la mayoría de los demás péptidos.

En términos absolutos, los valores K_D comprendidos entre 0,01 y 0,1 nM como los que se observan en la mayoría de estos péptidos ya representan una unión potente. También se han observado afinidades similares en péptidos contenidos en la vacuna contra el carcinoma de células renales IMA901, que ha sido probada con éxito (H. Singh-Jasuja, S. Walter, T. Weinschenk, A. Mayer, P. Y. Dietrich, M. Staehler, A. Stenzl, S. Stevanovic, H. Rammensee, J. Frisch; Correlation of T-cell response, clinical activity and regulatory T-cell levels in renal cell carcinoma patients treated with IMA901, a novel multi-peptide vaccine; Reunión de ASCO 2007 Póster n.º 3017; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Póster n.º 3017). En definitiva, las propiedades de unión de los péptidos como los descritos son bastante similares a las de los péptidos que han demostrado generar una respuesta de los linfocitos T *in vivo*.

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

Sensibilización in vitro de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con un complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, en primer lugar se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocíticas HLA-A*02+ recién obtenidas con un medio de separación en gradiente de densidad convencional (PAA, Cölbe, Alemania). Las capas leucocíticas procedían del banco de sangre de Tubinga y del Katharinen hospital de Stuttgart. Las PBMC aisladas se incubaron hasta el día siguiente con medio para linfocitos T (TCM) para la sensibilización humana *in vitro*. El medio consistía en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10 % (PAA, Cölbe, Alemania), penicilina 300 U/ml/estreptomina 100 µg/ml (Cambrex, Verviers, Bélgica), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Neustadt, Alemania) y gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Los linfocitos CD8+ se aislaron con un kit de selección positiva MACS para CD8+ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8+ obtenidos se incubaron hasta su uso en TCM complementado con IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Chiron, Munich, Alemania). La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros con pequeñas modificaciones (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Werner, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, y Stevanovic, S; Cutting edge; predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 2003, 171, 4974-4978). En suma, se sintetizaron moléculas recombinantes y biotiniladas de HLA-A*0201 desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada según el procedimiento descrito por Altman y col. (Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Wilkams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, y Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 1996, 274, 94-96). El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9. 3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humana (Jung G, y col. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84, 4611-4615) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,60 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los complejos pMHC usados como controles positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5) o A*0201/HBV-001 (FLPSDFFFPSV), respectivamente.

Se revistieron placas de 96 pocillos con 800. 000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng del pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad) o de 2 ng del relevante más 200 ng de MHC irrelevante (biblioteca de pMHC) (microperlas de baja densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM complementado +-con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM reciente complementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, se llevaron a cabo análisis tetraméricos de los tetrameros MHC fluorescentes (producidos del modo descrito por Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Williams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 1996, 274, 94-96) más anticuerpo CD8-FITC del clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) en un citómetro LSR II FACSCalibur (BD). Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis tetramérico se hizo con el programa FCS Express (De Novo Software). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ tetramero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetramero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetramero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Péptidos como los descritos se analizaron junto con péptidos cuya inmunogenicidad *in vivo* es conocida a efectos comparativos. En la Figura 5 se expone una tinción representativa que muestra la generación de estirpes de linfocitos T específicas para NOX-001 y ODC-001. Los resultados se resumen en la tabla 3.

50 **Tabla 3: Comparación de la inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos con la de péptidos vacunales**

Antígeno	Inmunogenicidad detectada
TGFBI-001	sí
NOX-001	sí
PCN-001	sí
TOP-001	sí
C20-001	sí

(continuación)

Antígeno	Inmunogenicidad detectada
ODC-001	sí
CCN-001	sí
PTP-001	sí
CHI-001	sí
JAK-001	sí

Tabla 3a: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos

Antígeno	Donantes positivos / donantes analizados	Pocillos positivos / pocillos analizados
IMA-HBV-001	7/16(44 %)	10/107(9 %)
IMA-TGFBI-001	3/4 (75 %)	4/22 (18 %)
IMA-NOX-001	3/5 (60 %)	9/60 (15 %)
IMA-PCN-001	3/4 (75 %)	4/42 (10 %)
IMA-TOP-001	2/5 (40 %)	7/72 (10 %)
IMA-C20-001	1/5 (20 %)	1/60 (2 %)
IMA-ODC-001	1/5 (20%)	1/60 (2%)
IMA-HBV-001	2/5 (40%)	10/54 (19%)
IMA-CEA-004	4/4 (100%)	50/60 (83%)
IMA-CCN-001	5/5 (100%)	42/54 (78%)
IMA-MET-001	4/6 (67%)	30/72 (42%)

- 5 Aquí se resumen los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por los autores de la invención. Los resultados se han obtenido mediante estimulación de linfocitos CD8+ con microperlas de alta densidad. La variabilidad de los lotes de suero humano puede influir, y mucho, en los resultados de las pruebas de inmunogenicidad, por lo que solo se evaluaron los ensayos en los que se usó un único lote de suero.

7. Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase II

- 10 Los linfocitos T cooperadores desempeñan una importante función de apoyo a los CTL para activar y mantener la respuesta inmunitaria contra las células tumorales. Por tanto, en la vacuna IMA910 se incluyeron péptidos MHC de clase II. El TGFBI-004, uno de los tres péptidos de clase II presentes en IMA910, se analizó para determinar su potencial inmunogénico *in vitro* y demostró ser un inductor de linfocitos T específicos tanto CD4+ como CD8+. La generación de linfocitos T CD4+ y CD8+ funcionales se demostró en experimentos con estimulaciones realizados en un sistema autólogo.

Principio de la prueba

- La sensibilización y la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos específicos se analizó *in vitro* mediante la sensibilización de PBMC carentes de monocitos con células dendríticas autólogas y la reestimulación con PBMC autólogas. En resumen, para generar los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno se estimularon PBMC desprovistas de monocitos procedentes de un donante sano (genotipo HLA de clase I: A1/A25/B8/B18 y clase II: DQB1*02/DQB1*06/DRB1*03/DRB1*15/DRB3/DRB5) con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido y se reestimularon con PBMC autólogas más péptido. Como sistema de lectura se evaluó la producción de IFN- γ con ELISPOT y citometría de flujo tras la reestimulación de corta duración. Tras ocho estimulaciones, los linfocitos T se analizaron con ELISPOT y tinción intracelular del IFN- γ más CD4-FITC y CD8-PerCP para determinar el porcentaje de células productoras de dicho interferón en las diversas subpoblaciones de linfocitos T. Como control negativo del experimento se usaron células estimuladas con el péptido TGFBI-004 recogidas de pocillos distintos, agrupadas e incubadas con el péptido irrelevante.

Generación de células dendríticas (CD)

- Las células dendríticas (CD) humanas se obtuvieron de monocitos cultivados en medio para CD consistente en RPMI 1640-Glutamax/25mM Hepes (Invitrogen, Alemania) complementado con plasma autólogo al 10 %/penicilina

100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. En primer lugar, de la sangre de un donante sano (Banco de sangre de Tubinga) se extrajeron la capa leucocítica y el plasma por centrifugación. A continuación se aislaron las PBMC de la capa leucocítica mediante separación en gradiente de densidad convencional (Lymphocyte Separation Medium, PAA, Austria) y se resuspendió con medio de CD para contabilizar el número total de células. Se lavaron entre 100 y 120 millones de PBMC y después se resuspendieron con 15 ml de medio X-Vivo 20 (BioWhittaker, Bélgica) y se transfirieron a un matraz de cultivo celular. Dos horas después de permanecer a 37 °C, se extrajeron los medios que contenían los leucocitos de sangre periférica (PBL), los monocitos adherentes se separaron lavando dos veces con 10 ml de PBS y se cultivaron durante 6 días en 10 ml de medio para CD con GM-CSF 100 ng/ml e IL-4 30 ng/ml (ImmunoTools, Alemania) o 20 ng/ml (R&D Systems, Alemania). El tercer y quinto día se añadieron GM-CSF 100 ng/ml e IL-4 30 ng/ml (ImmunoTools) o IL-4 20 ng/ml (R&D Systems, Alemania). El séptimo día se activaron las CD inmaduras con TNF-alfa 10 ng/ml (R&D Systems, Alemania) y poli(IC) 20 µg/ml (Sigma Aldrich, Alemania) o LPS 100 ng/ml durante 24 horas. Las PBMC restantes y los PBL obtenidos se fraccionaron en alícuotas y se congelaron.

Sensibilización in vitro de linfocitos T específicos

Para generar linfocitos T CD4+ se procedió a estimular 3 millones de PBMC/PBL con 2×10^5 células dendríticas (CD) autólogas. Las células dendríticas se recogieron el día 8 (véase el apartado 3. 1, Generación de CD). Con el fin de recoger la mayor cantidad posible de células (incluidas las adherentes), se empleó PBS con EDTA 5 mM. Después de lavarlas con medio para CD se procedió al recuento. Para la carga con el péptido, las células dendríticas se resuspendieron en 1 ml de medio para CD y se incubaron con péptido 25 µg/ml durante 2 horas a 37 °C. Los péptidos usados para la sensibilización de las CD fueron: TGFBI-004, Posmix (mezcla de péptidos del EBV y de CMV), Padre y CMV. Las PBMC/PBL autólogas se descongelaron, se lavaron con medio para CD (al menos dos veces) y se sembraron en una placa de 24 pocillos con una densidad de 3 millones de céls. /ml en 1 ml. Acto seguido las CD cargadas con el péptido (en forma de 1 ml de suspensión que incluía el péptido) se añadieron a las PBMC/PBL sembradas y se incubaron durante 7 días a 37 °C. Tras la sensibilización, los CTL obtenidos volvieron a estimularse con PBMC autólogas cargadas con el péptido que habían permanecido criopreservadas y que se habían irradiado (30 Gy; Gammacell 1000 Elite, Nordion International, Canadá). Con tal fin, en cada pocillo se depositaron 5×10^5 CTL y $2,5 \times 10^6$ PBMC. La sensibilización repetida de las PBMC con el péptido se efectuó del mismo modo que con las células dendríticas. El día posterior a la primera reestimulación, se añadió IL-2 (R&D Systems, Alemania) a una concentración final de 2 ng/ml, así como IL-7 a razón de 5 ng/ml. Posteriormente, se siguió añadiendo al medio de cultivo IL-2 cada dos días e IL-7 cada siete. La segunda reestimulación se efectuó 7 días después, pero esta vez a los CTL cultivados se les añadió el péptido solo, sin PBMC. Las sucesivas reestimulaciones se efectuaron en ciclos de 7 días, añadiendo alternativamente las PBMC cargadas con el péptido y el péptido solo. Los análisis se llevaron a cabo tras la octava estimulación mediante tinción intracelular del IFN-γ y ELISPOT de IFN-γ.

Resultados

Se pudieron sensibilizar estirpes de linfocitos T CD4+ para que reaccionaran de forma específica ante el péptido de interés (Figura 6 y Figura 3). Con ELISPOT se detectó respuesta de los linfocitos T en 2 de las 4 estirpes analizadas, mientras que con la tinción intracelular de citocinas se detectaron linfocitos CD4+ y/o CD8+ que producían IFN-γ específicamente ante el TGFBI-004 en 3 de las 4 estirpes. Por tanto, el TGFBI-004 fue capaz de desencadenar respuestas por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en un donante analizado con el citado sistema experimental. De acuerdo con este resultado alentador, es probable que este péptido sea inmunogénico y capaz de inducir respuestas por parte de los linfocitos T.

8. Validación funcional ejemplificada por NOX-001 y TGFBI-001

La inmunogenicidad de los péptidos incluidos en la vacuna IMA910 quedó demostrada *in vitro* con la plataforma de validación de TUMAP de Immatics (Immatics Biotechnologies GmbH, Tubinga, Alemania). La inducción de los linfocitos T específicos constituye un indicador de la capacidad de los péptidos para activar el sistema inmunitario. Puesto que la respuesta inmunitaria antitumoral solo es posible si los linfocitos T activados hacen gala de una elevada avidéz y plena funcionalidad, se investigó la capacidad de los TUMAP para sensibilizarlos con esa avidéz y funcionalidad analizando su capacidad para producir IFN-γ o destruir células de diversas estirpes tumorales. Para la validación en profundidad se escogieron dos péptidos, NOX-001 y TGFBI-001, en función de su capacidad para inducir CTL dotados de gran avidéz *in vitro*. Los resultados demuestran que existen linfocitos T precursores con gran avidéz contra ambos péptidos en los seres humanos, y que NOX-001 permite generar estirpes de linfocitos T CD8+ funcionales.

Principio de la prueba

Para ahondar en la inmunogenicidad de los péptidos de IMA910 y en las propiedades de los linfocitos T específicos, se seleccionaron dos péptidos para proseguir la evaluación: NOX-001 y TGFBI-001. Los experimentos en cuestión se efectuaron en Immatics Biotechnologies GmbH, Tubinga, Alemania (la selección de las células se llevó a cabo en la Universidad de Tubinga, en el laboratorio del Dr. Bühring).

Según su capacidad para ser activadas por antígenos de alta o baja densidad, las estirpes de linfocitos T se pueden

dividir en linfocitos de alta y baja avidéz. Como se ha demostrado anteriormente (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, y Stevanovic, S; Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 2003, 171, 4974-4978), se pueden generar CTL humanos de gran avidéz usando menos péptido para la activación que en el caso de los linfocitos T CD8+ de baja avidéz. También se ha demostrado que las células expandidas de esa forma son más eficaces a la hora de reconocer las estirpes de células tumorales que expresan el antígeno, por lo que podrían constituir una herramienta importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

A fin de determinar la capacidad de los péptidos para generar estirpes de CTL de alta avidéz, los linfocitos CD8+ humanos aislados se sensibilizaron y expandieron mediante repetidas estimulaciones *in vitro* con perlas recubiertas de pMHC en baja densidad (complejo péptido-MHC) y anticuerpo anti-CD28 en presencia de IL-12 e IL-2. Al cabo de tres estimulaciones, una parte de los linfocitos T sensibilizados *in vitro* se sometió a tinción con tetrámeros de pMHC y a análisis por citometría. Las células tetrámero-positivas de cada donante se agruparon después según la especificidad hacia el antígeno, se tiñeron con tetrámeros de pMHCy con el anticuerpo anti-CD8-FITC humano y, por último, se sometieron a cribado por FACS en un citómetro FACSAria. Las células seleccionadas se cultivaron y expandieron en presencia de células nodriza irradiadas, citocinas y mitógeno. Para averiguar si se generaban linfocitos específicos de antígeno con alta avidéz sensibilizados, se procedió a la tinción con tetrámeros de pMHC. Y para determinar su funcionalidad se analizó la producción de IFN- γ con ELISPOT y se examinó la destrucción de estirpes de células tumorales con un ensayo de citotoxicidad con tinción vital después de reestimar a las células con el péptido correspondiente y las pertinentes estirpes tumorales.

Generación de estirpes de linfocitos T CD8+ específicos

Las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28 se realizaron del modo antes descrito. La única diferencia respecto al procedimiento anterior es que dichas estimulaciones se realizaron con perlas cargadas con 2 ng de una peptidoteca (pMHC)MHC relevante más 200 ng de una irrelevante (perlas de baja densidad) en lugar de con 200 ng de MHC relevante (perlas de alta densidad). De ese modo se generaron mayoritariamente linfocitos T con alta afinidad para la validación en profundidad de los péptidos. Después de tres estimulaciones, una parte de los linfocitos T sensibilizados *in vitro* se sometió a la tinción con tetrámeros de pMHC y a análisis por citometría. La inmunogenicidad de un antígeno determinado se detectaba si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una estirpe de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1 % de tetrámero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetrámero+ específicas era al menos 10 veces la mediana de las estimulaciones del control negativo). Las células tetrámero-positivas de cada donante se agruparon después según la especificidad hacia el antígeno, se tiñeron con el correspondiente tetrámero de pMHC y anticuerpo anti-CD8-FITC humano clon SK1 y, por último, se sometieron a selección por FACS en un citómetro FACSAria (BD Biosciences, Alemania). Las células seleccionadas se cultivaron en medio para linfocitos T (RPMI-Glutamax complementado con suero AB humano termoinactivado al 10 %, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μ g/ml, piruvato sódico 1 mM y gentamicina 20 μ g/ml) en presencia de 5×10^5 céls./ml de PBMC alogénicas recién extraídas e irradiadas, 5×10^4 céls./ml de células LG2-EBV irradiadas, IL-2 150 U/ml (Chiron, Munich, Alemania) y PHA-L 0,5 μ g/ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La expansión de dichas células tuvo lugar en medio para linfocitos T con IL-2 150 U/ml. Para averiguar si se generaban linfocitos específicos de antígeno con alta avidéz sensibilizados se efectuó la tinción con tetrámeros de pMHC del modo indicado antes y se analizaron en un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD Biosciences, Alemania).

Pruebas de funcionalidad

A fin de determinar su funcionalidad se evaluó la producción de IFN- γ con ELISPOT (IFN γ ELISPOT Set, BD, Alemania) tras la reestimulación de las células con el péptido correspondiente. Además, se investigó la citotoxicidad celular de los CTL específicos en la destrucción de estirpes tumorales con el Kit de citotoxicidad celular LIVE/DEAD ((L7010, Invitrogen, Alemania). Si no se indica otra cosa, ambos ensayos se realizan siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

Ambos péptidos, NOX-001 y TGFBI-001, fueron inmunogénicos *in vitro* tal y como demuestra la sensibilización lograda mediante las células aAPC con baja densidad de pMHC. Tanto con NOX-001 como con TGFBI-001 se detectaron estirpes de linfocitos T específicos en la citometría FACS, lo que demuestra la existencia de linfocitos T CD8+ precursores de alta avidéz en los donantes sanos.

Además, en el caso de NOX-001, se descubrió una estirpe de linfocitos T que demostró su funcionalidad en ELISPOT, puesto que expresó de forma específica el IFN- γ tras la reestimulación con este péptido (Fig. 8).

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

El objetivo del análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos de HLA de clase I CHI-001, DCA-001, JAK-001 y PTP-001 hacia la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A*0201. Las afinidades de todos los péptidos hacia el HLA-A*0201 resultaron comparables con las del péptido control bien conocida HBV-001, situándose las

constantes de disociación (K_D) en el intervalo de 0,05 a 1,6 nM.

Principio de la prueba

5 Los complejos estables de HLA/péptido constan de tres moléculas: cadena pesada de HLA, beta-2 microglobulina (b2m) y el ligando peptídico. La actividad de las moléculas de cadena pesada recombinantes y desnaturalizadas del HLA-A*0201 solas se puede conservar convirtiéndolas en equivalentes funcionales de “moléculas HLA-A*0201 vacías”. Cuando se diluyen en un tampón acuoso que contiene b2m y un péptido adecuado, estas moléculas se pliegan con rapidez y eficacia de un modo que depende totalmente del péptido. La disponibilidad de estas moléculas se emplea en un ensayo ELISA para medir la afinidad de la interacción entre el péptido y la molécula de HLA de clase I (Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferre H, Lauemoller SL, Wolf XA, Lamberth K, Nissen MH, Pedersen LO, Buus S. Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide -MHC class I interaction. Tissue Antigens 2002, 59, 251-258).

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

Resultados

20 Los resultados se muestran en la Figura 9. Cuanto más bajo es el valor de K_D mayor es la afinidad hacia el HLA-A*0201. Las afinidades de todos los péptidos hacia HLA-A*0201 fueron comparables con las del consabido péptido control HBV-001, situándose las constantes de disociación (K_D) en el intervalo de 0,05 a 1,6 nM.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immatix Biotechnologies GmbH

25 <120> Nuevos epítomos inmunogénicos para inmunoterapia

<130> FB22517/D

30 <160> 29

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Thr Leu
1 5

40 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile
1 5

50 <210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 3

ES 2 555 282 T3

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

5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

Ser Met Ser Ala Asp Val Pro Leu Val
 1 5

10
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 5

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

20
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 6

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

30
 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 7

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly
 1 5 10

40
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 8

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

50
 <210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

ES 2 555 282 T3

Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser
 1 5 10

5 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

Gly Lys Lys Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu
 1 5 10 15

10 Asn Ser

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro
 1 5 10 15

20 Asp

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser
 1 5 10 15

30 <210> 13
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 13

Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg Asp Leu
 1 5 10

40 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 14

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

50 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT

Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser
1 5 10 15

5 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 22

Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser
1 5 10 15

15 <210> 23
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly
1 5 10

20 <210> 24
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 24

Thr Thr Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu Phe Ile Lys Glu Ala Gln
1 5 10 15

Pro Gly

30 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 25

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

40 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 26

Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg Thr
1 5 10 15

50 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 555 282 T3

<400> 27

Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Val
1 5 10

5 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 28

Ser Leu Phe Asp Gln Val Val Lys Val
1 5

15 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 29

Ala Leu Leu Ser Glu Val Ile Gln Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia ALFVRLALA de acuerdo con la SEC ID N.º 8 que induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido es parte de una proteína de fusión, que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (li) asociada al antígeno HLA-DR.
3. Un ácido nucleico, que codifica un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es ADN, ADNc, ARN o combinaciones de los mismos, o un vector de expresión, en el que el vector está ligado operacionalmente con dicho ácido nucleico.
- 10 4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en medicina.
5. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno.
- 15 6. Un procedimiento de producción de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el procedimiento el cultivo de la célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5, y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
- 20 7. Procedimiento *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, comprendiendo el procedimiento la puesta en contacto *in vitro* de CTL con moléculas de MHC de clase I humanas cargadas con antígeno y expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, en el que dicho antígeno es un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, y en el que dicha célula presentadora de antígeno comprende preferiblemente un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3.
- 25 8. Un linfocito T citotóxico (CTL) activado, producido con el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que reconoce selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la reivindicación 1, mediante la interacción a través de su TCR con el complejo HLA/péptido de la célula.
9. Un número eficaz de linfocitos T citotóxicos (CTL) como los definidos en la reivindicación 8 para su uso en la destrucción de células diana en un paciente, cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en la reivindicación 1.
- 30 10. Un anticuerpo o fragmento del mismo, específico contra un complejo de MHC/péptido que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
11. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3, una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 5, un linfocito T citotóxico activado de acuerdo con la reivindicación 8, o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 35 12. El péptido, el linfocito T citotóxico activado o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho cáncer se selecciona entre glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer renal y cáncer gástrico.
- 40 13. El péptido, el linfocito T citotóxico activado o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que dicho tratamiento es una vacuna.

Figura 1a: PCN-002 (CCA707)

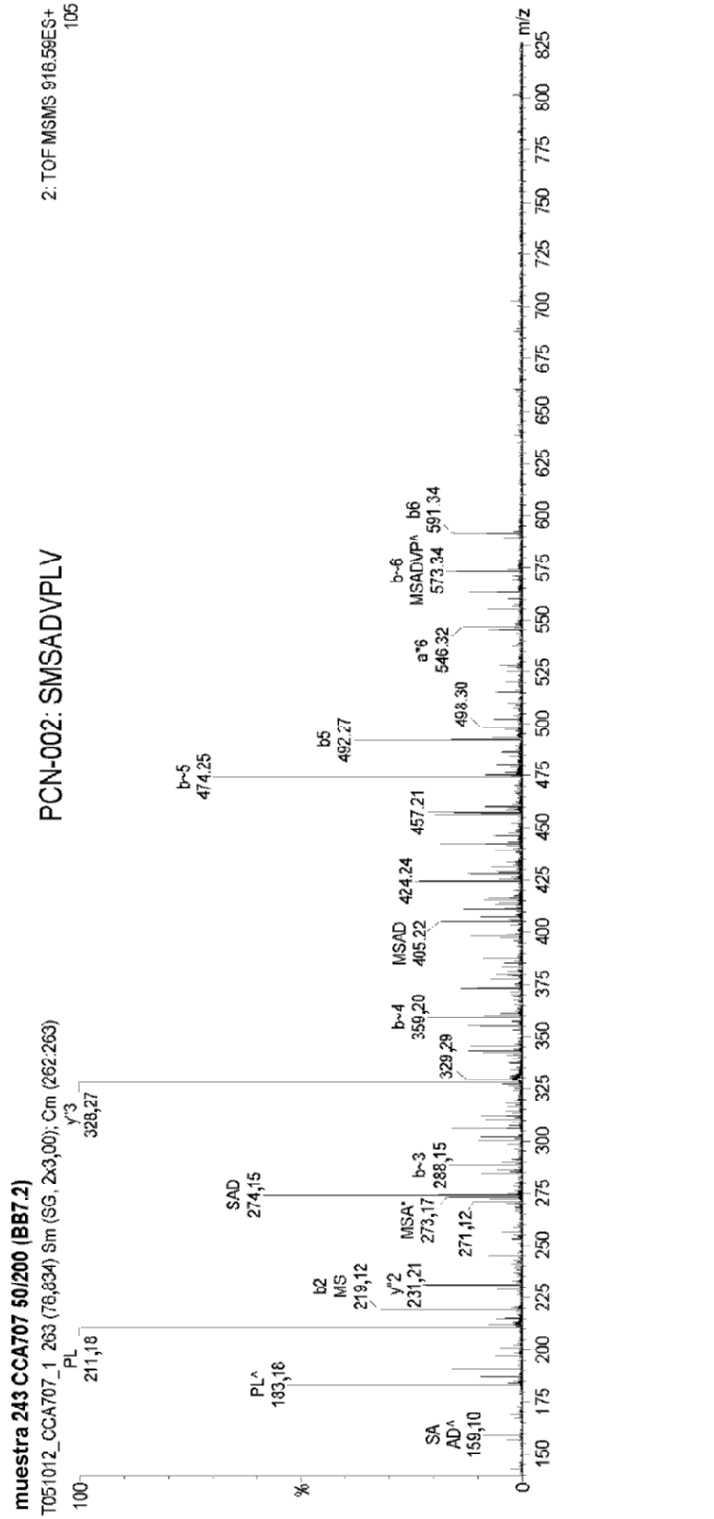


Figura 1b: TOP-002 (GB1006)

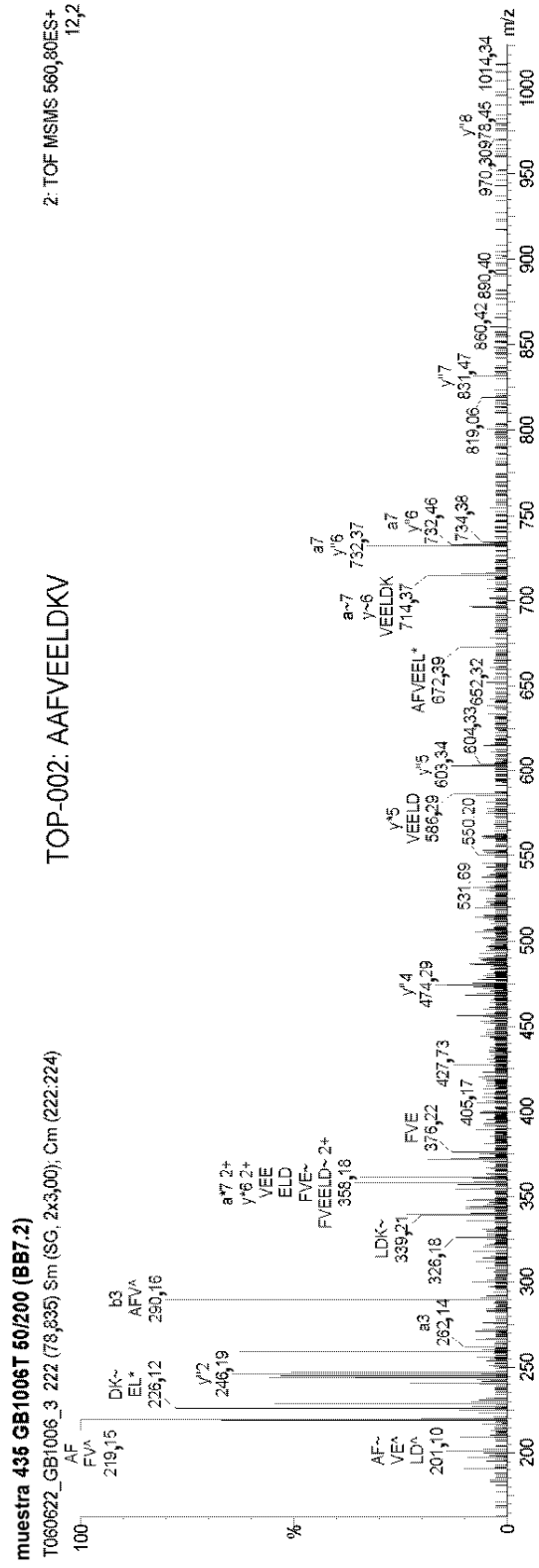


Figura 1c: PTP-001 (GB1006)

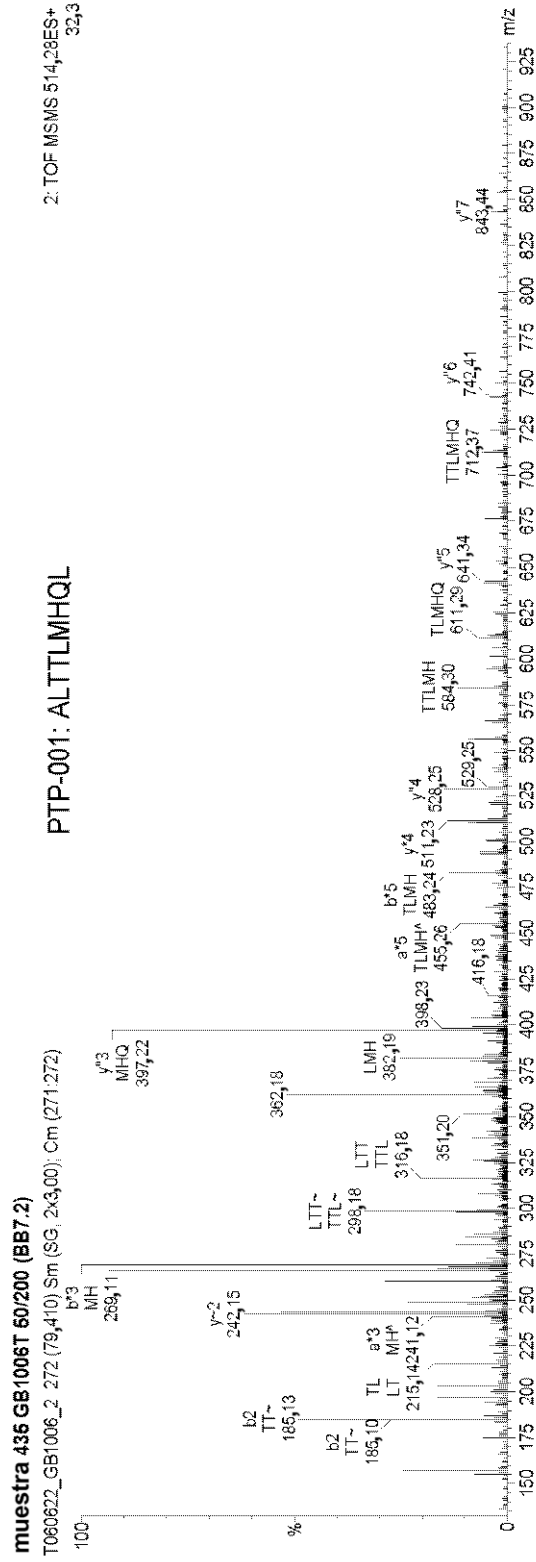


Figura 1d: GAL-001 (RCC190)

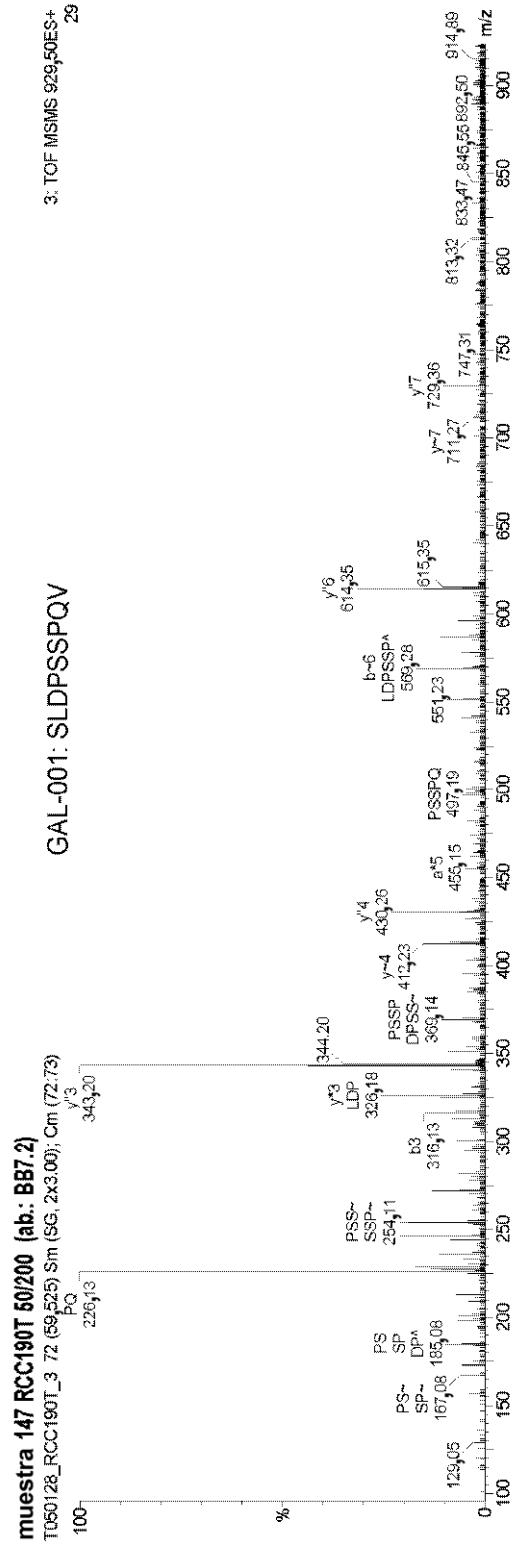


Figura 1e: CHI-001 (GB1002)

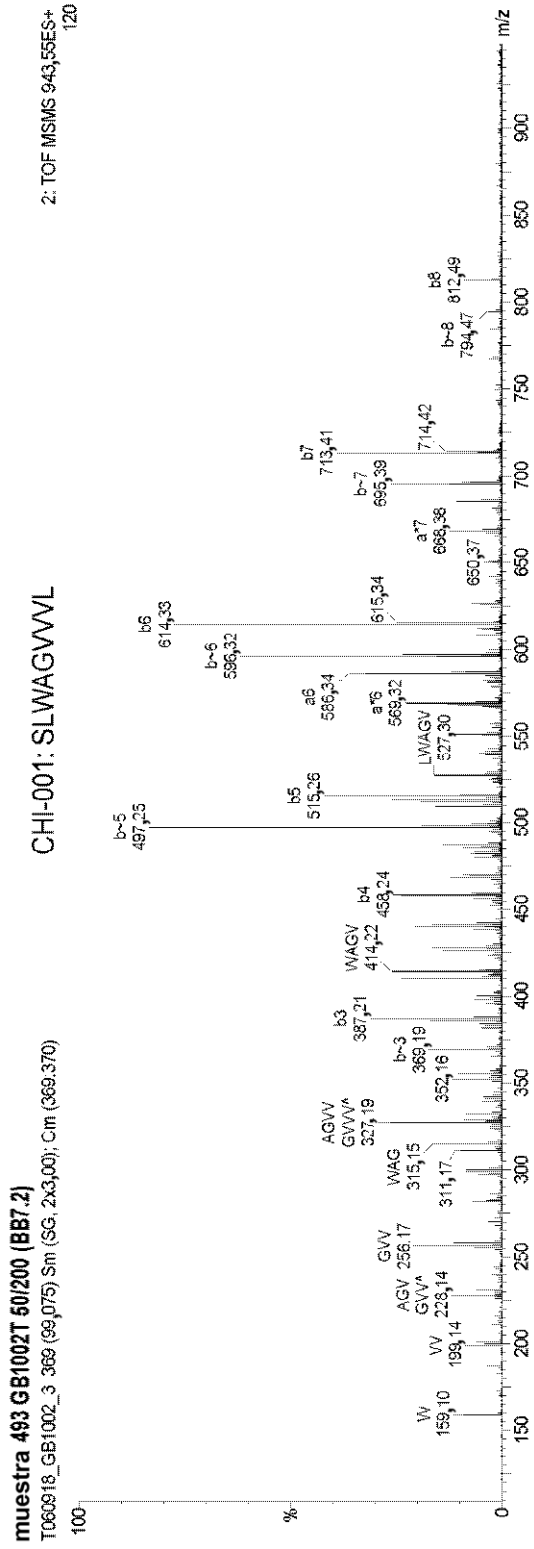


Figura 1f: JAK-001 (GB1002)

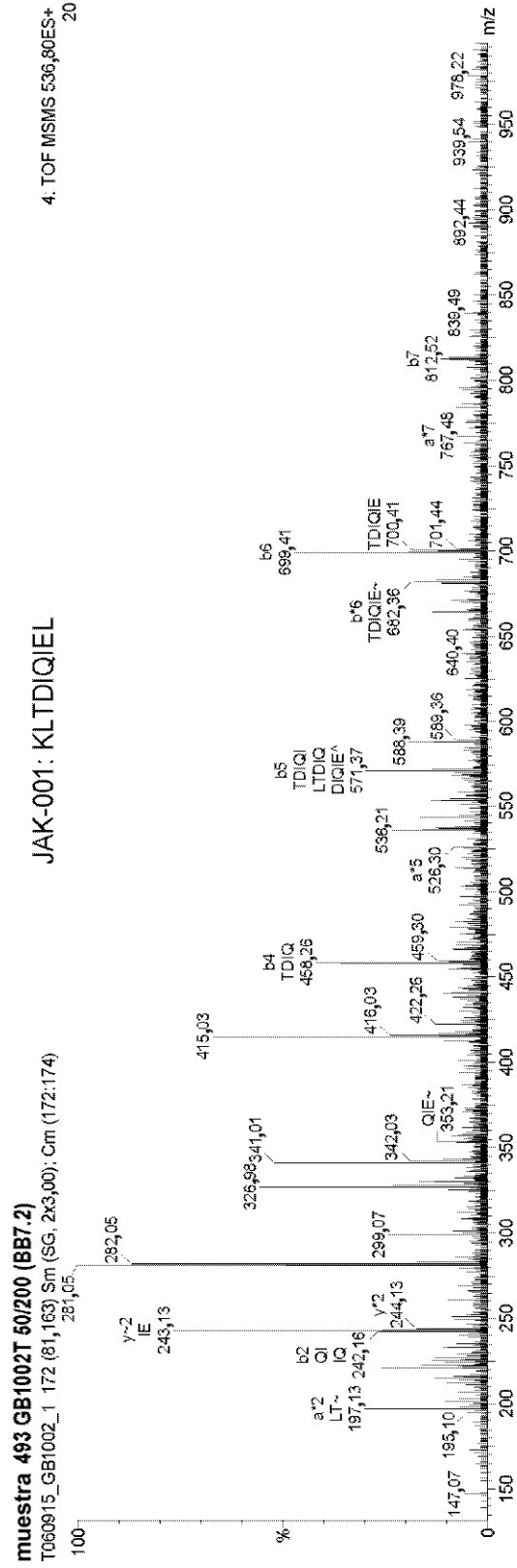


Figura 1g: AKR-001 (NSCLC-Grupo2)

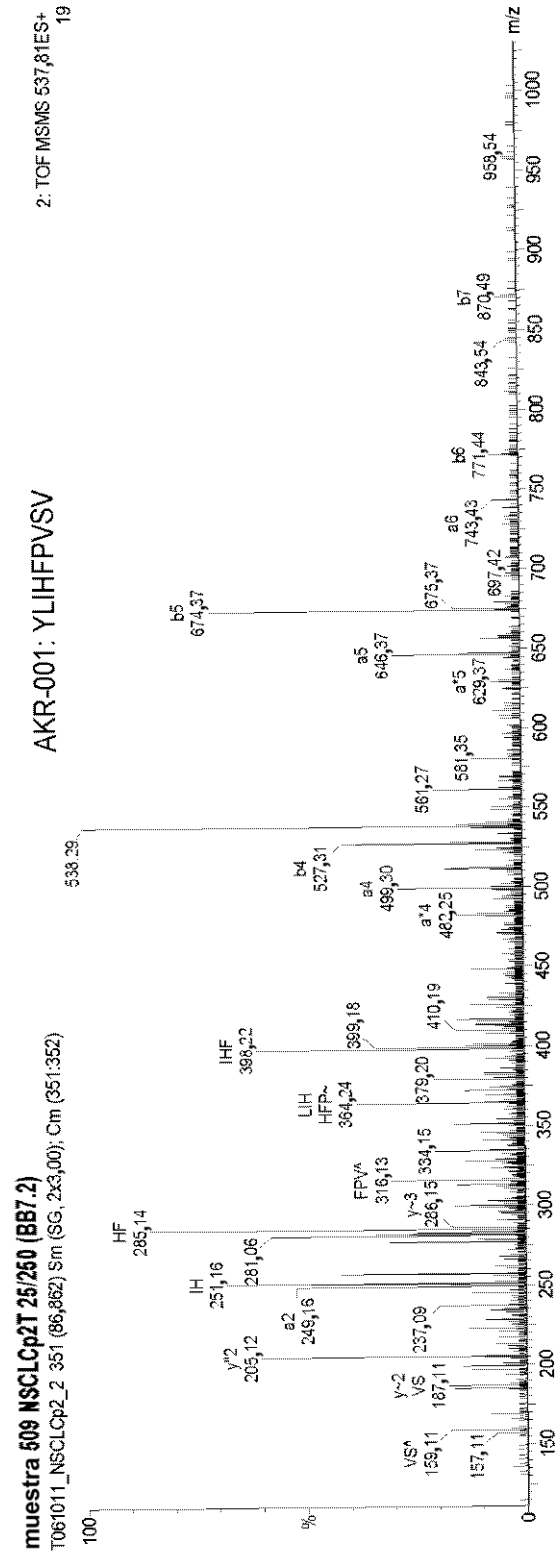


Figura 1h: FNI-001 (PC330)

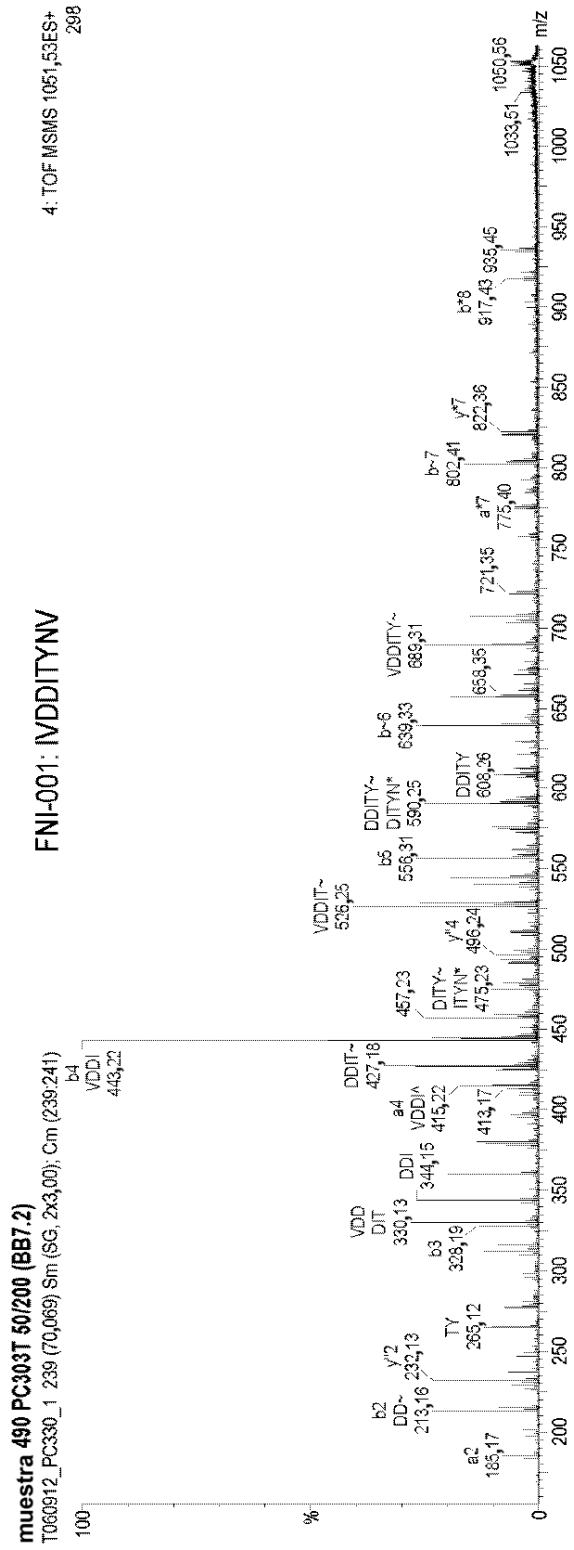


Figura 2a: CEA-009 (GC-Grupo2)

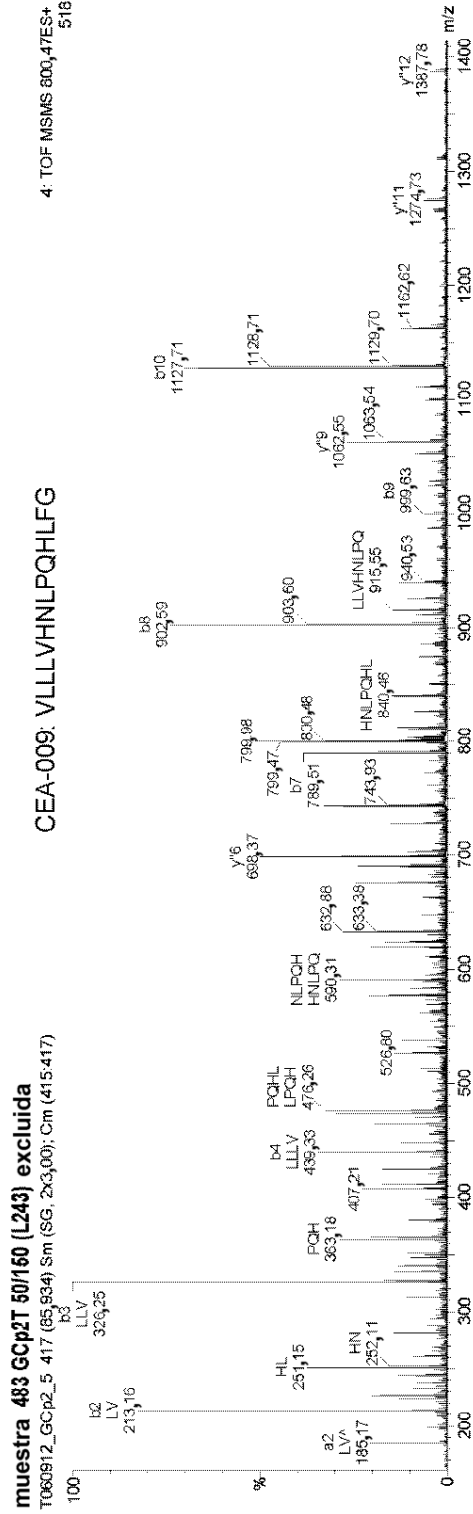


Figura 2b: TGFBI-006 (GC-Grupo1)

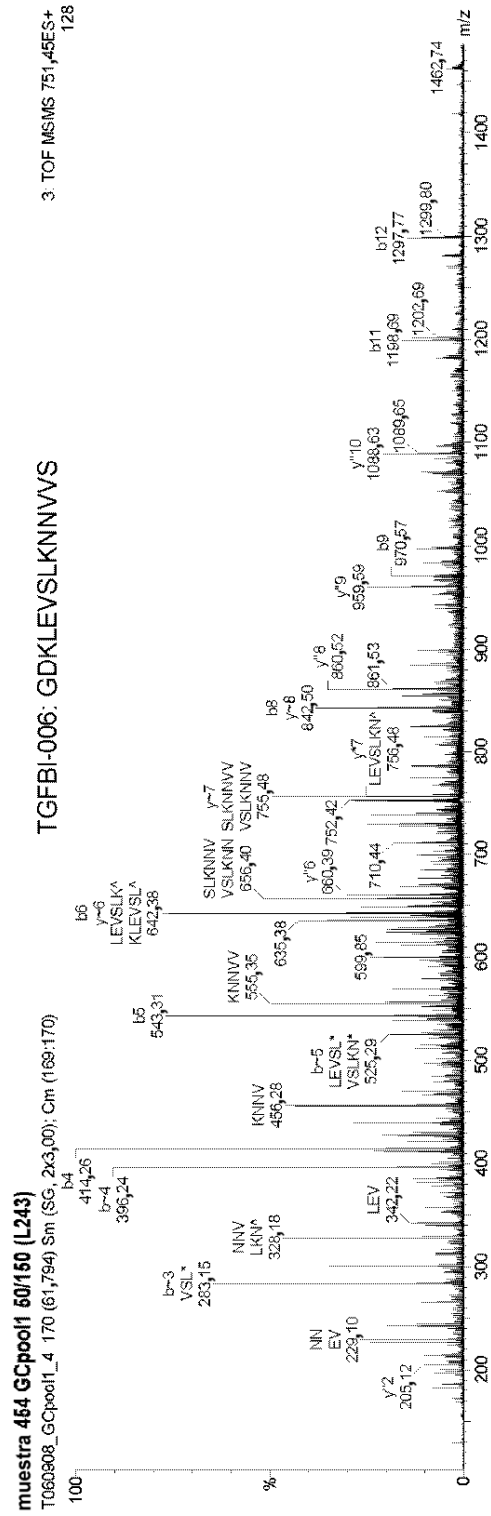


Figura 2c: TGFBI-007 (GB6002)

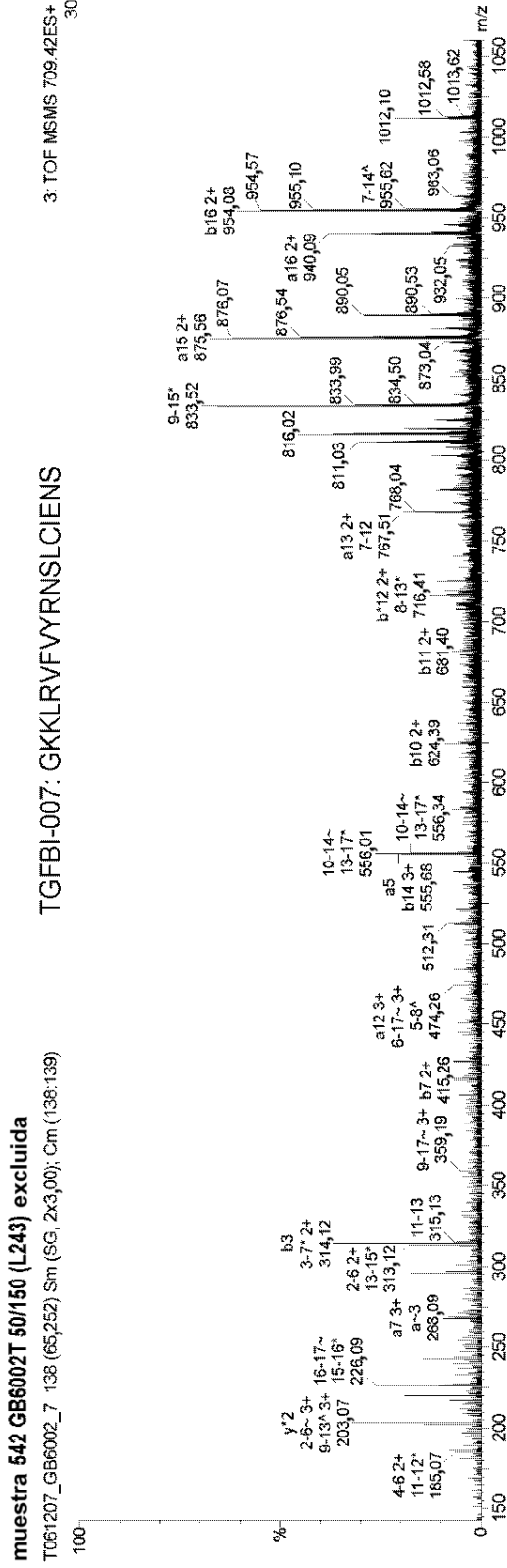


Figura 2d: TGFNI-008 (GB1004)

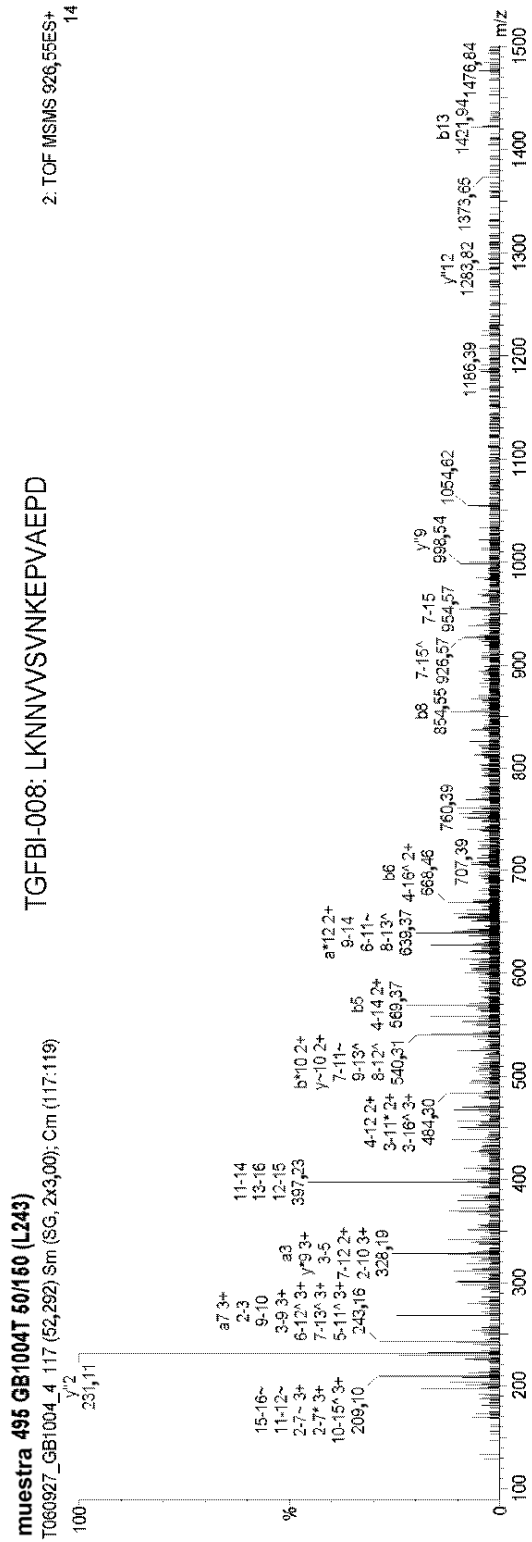


Figura 2e: TGFBI-009 (NSCLC-Grupo 1)

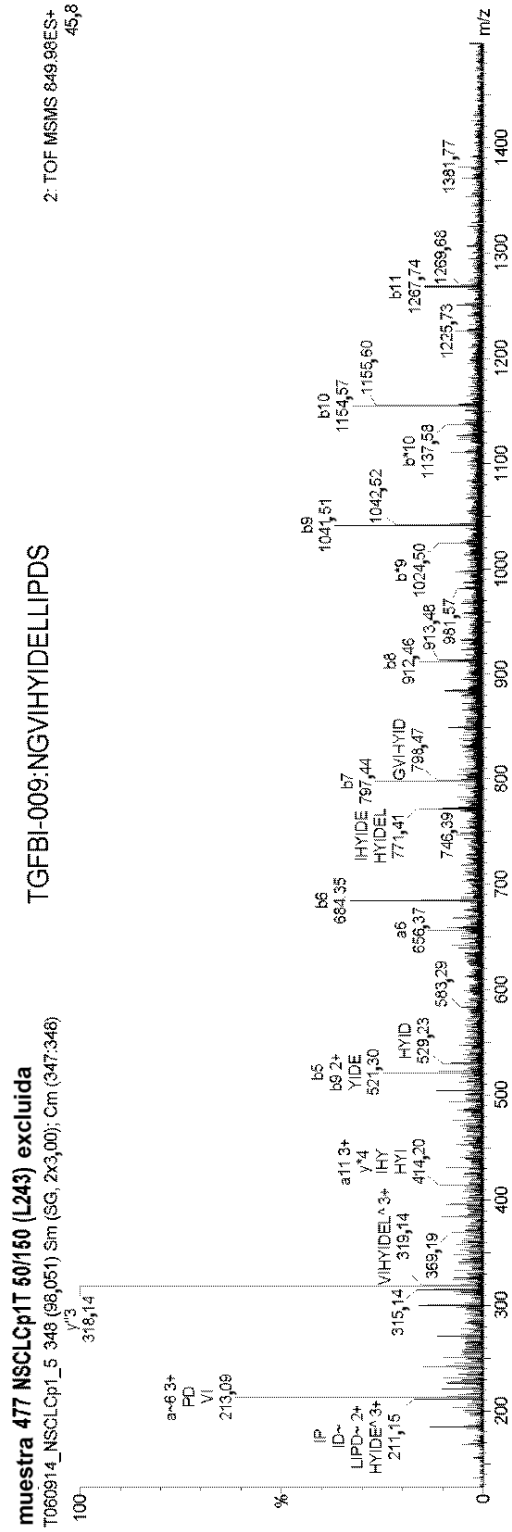


Figura 2f: TGFBI-010 (GB6002)

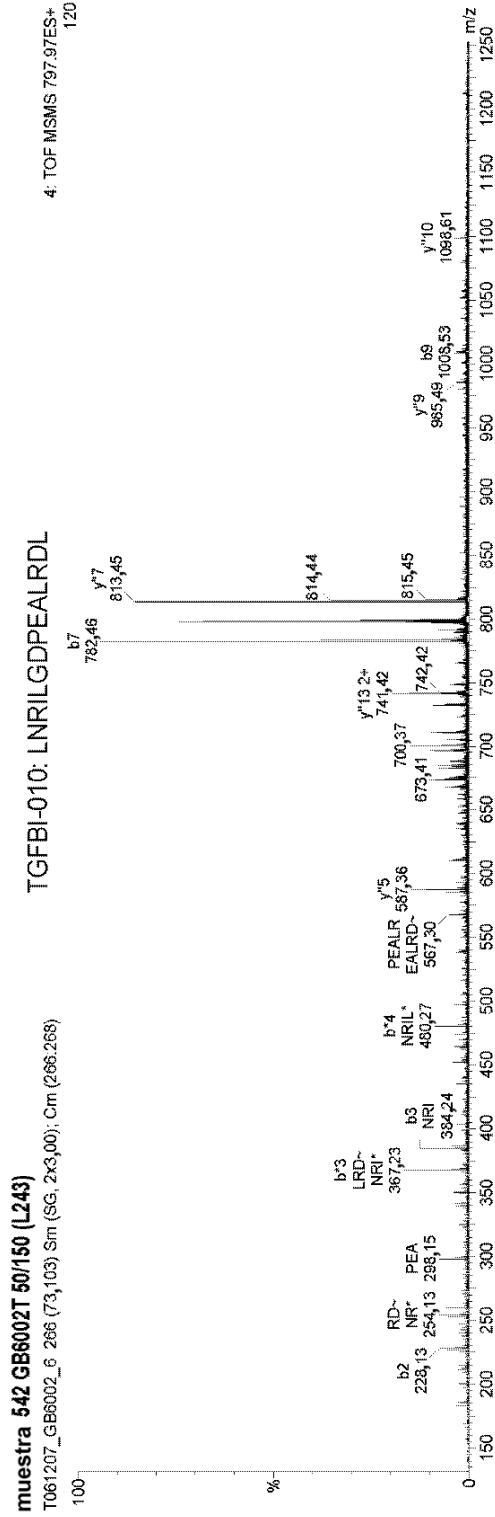


Figura 3a: Perfil de expresión de PTP

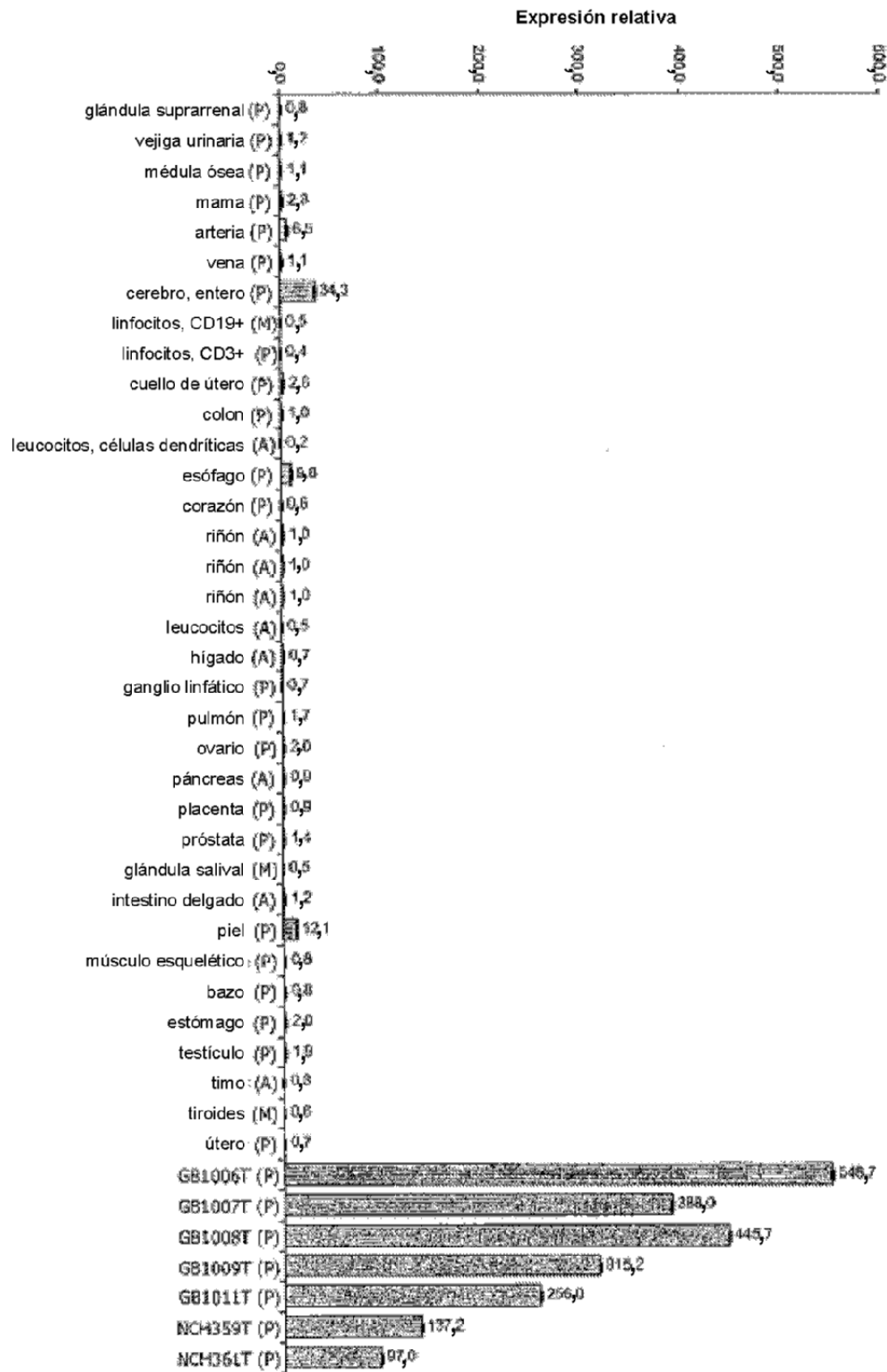


Figura 3b: Perfil de expresión de CHI

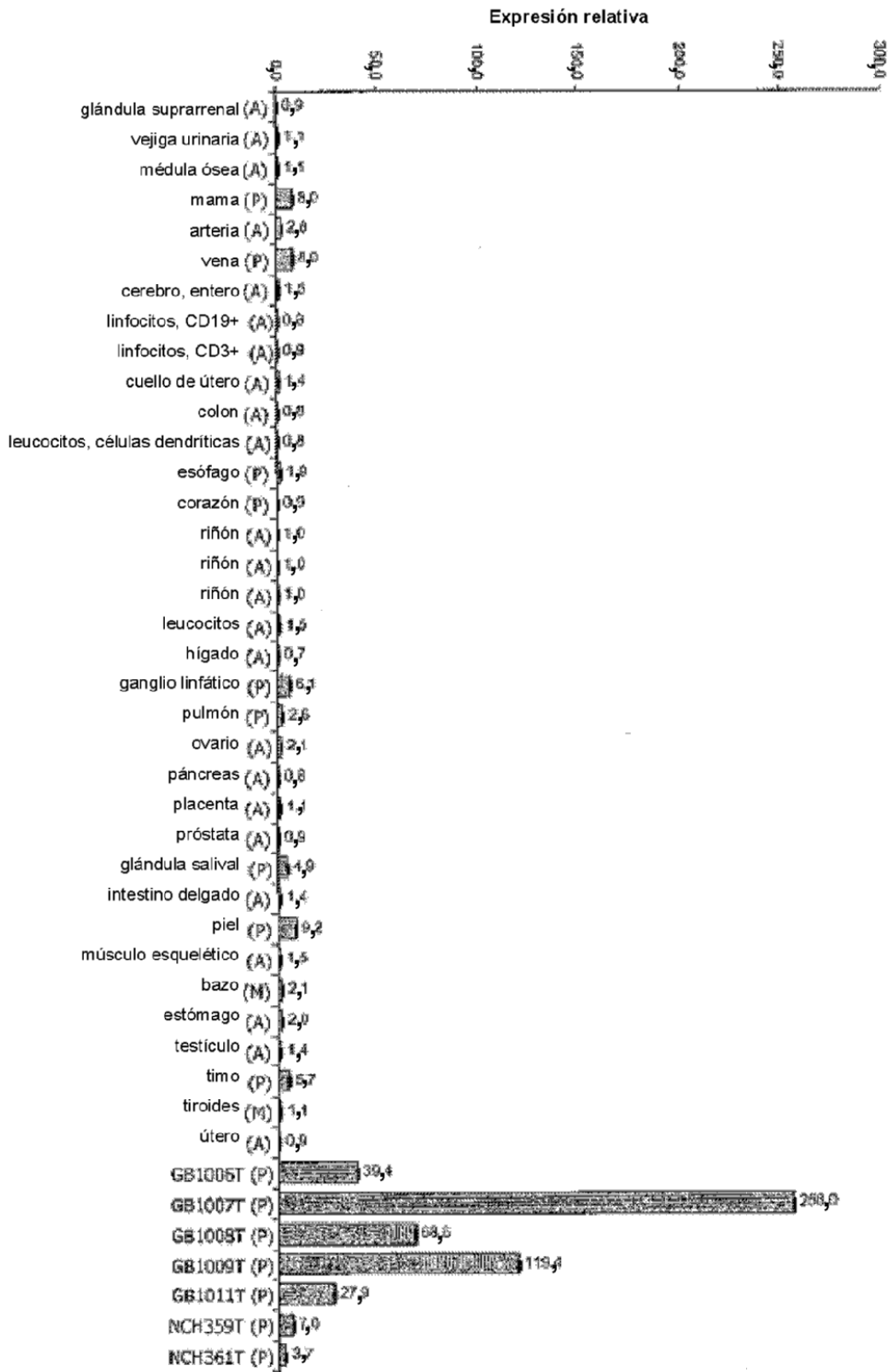


Figura 4: Afinidades de unión de la molécula de MHC de clase I

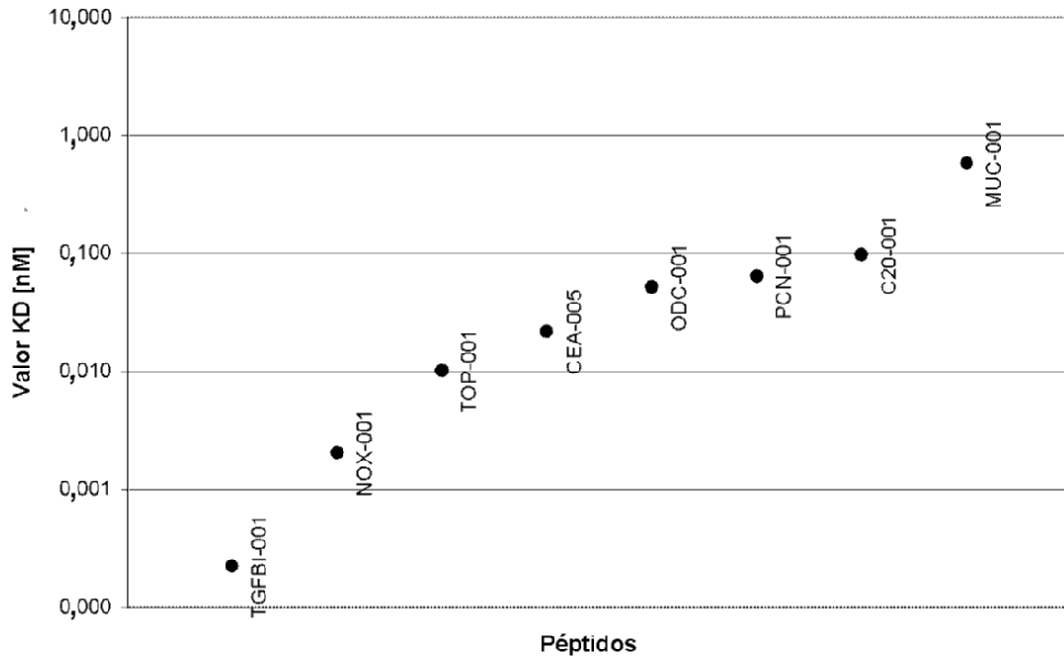


Figura 5

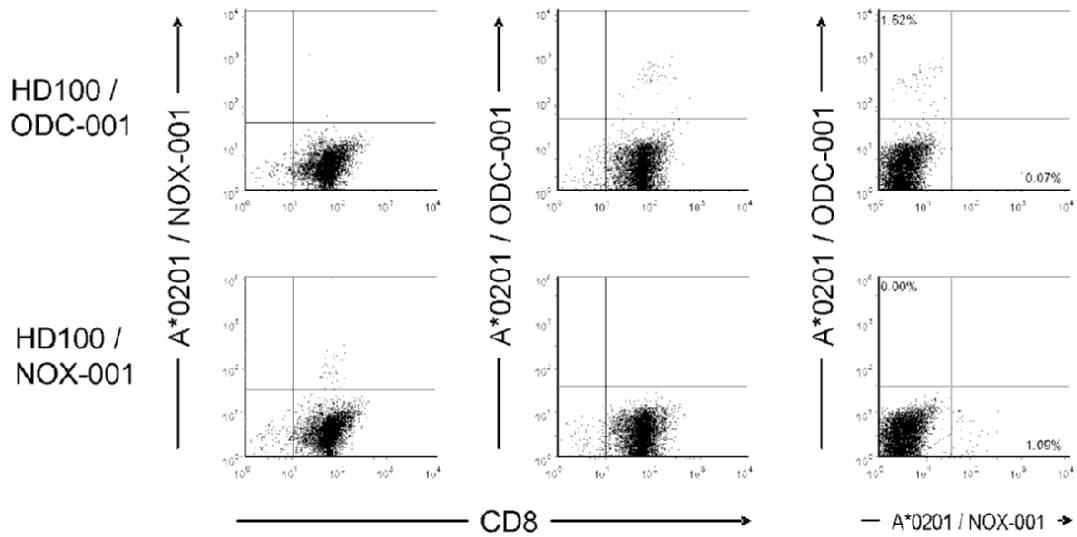


Figura 6

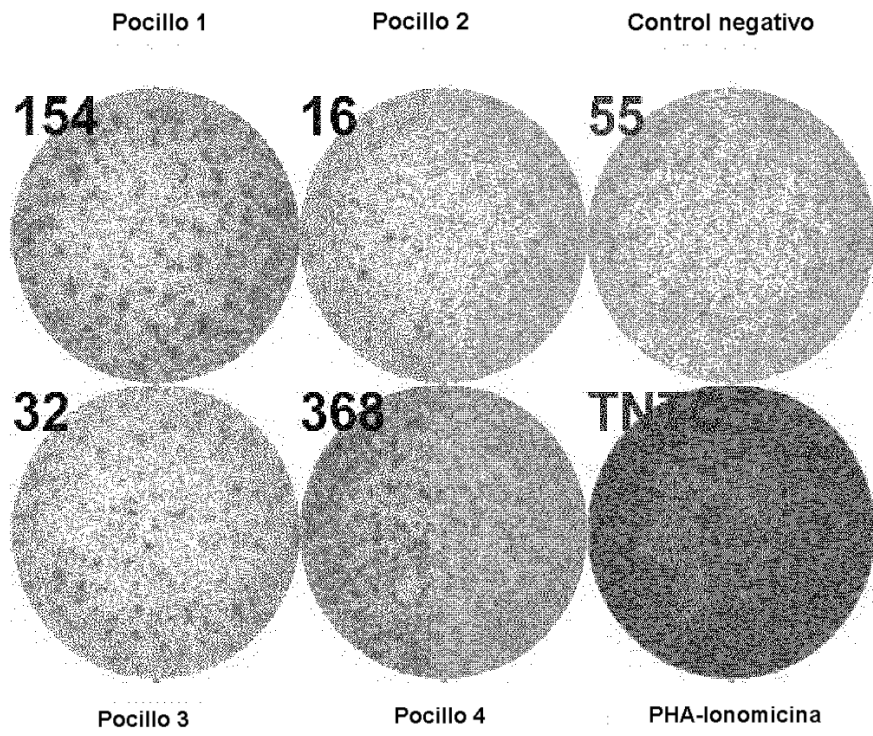


Figura 7

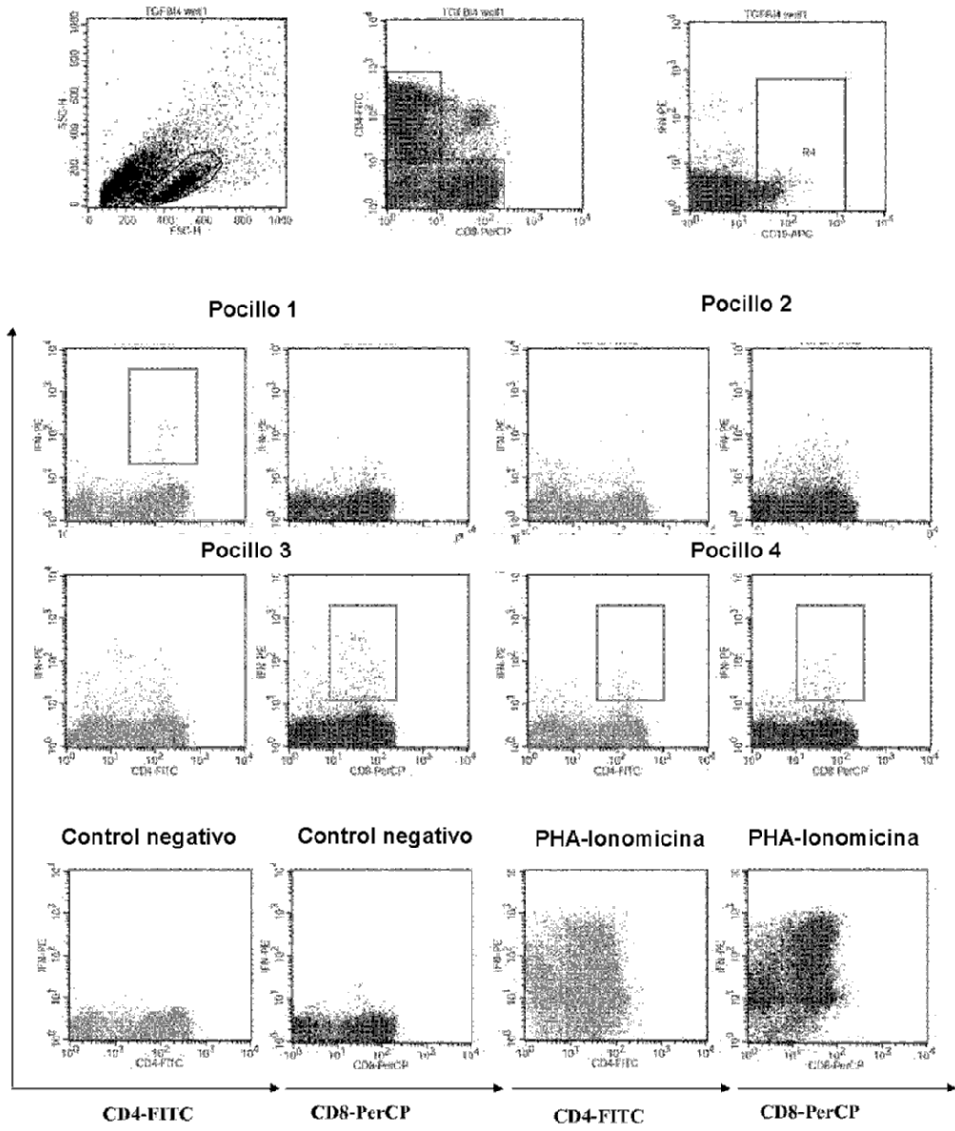


Figura 8

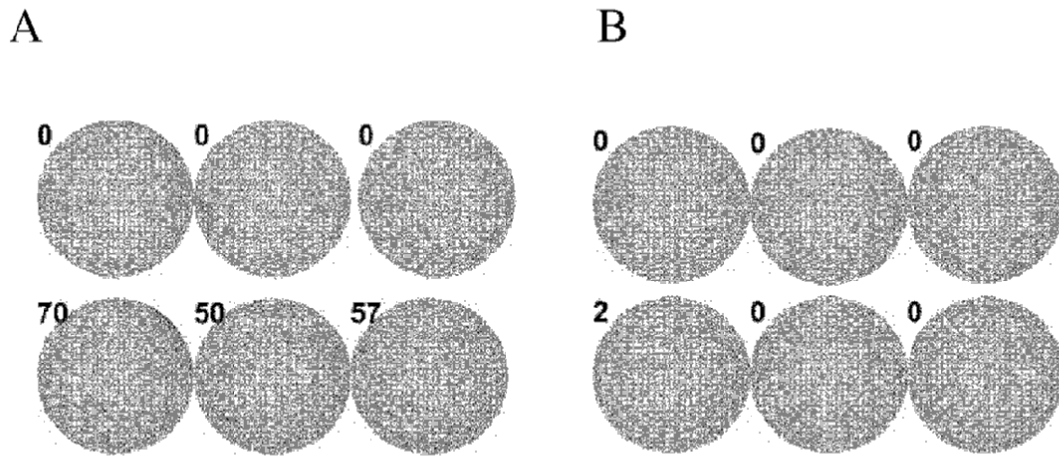


Figura 9

