

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 677**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007 E 12168585 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2570422**

54 Título: **Epítodos promiscuos de linfocitos T CD4 HER-2/Neu**

30 Prioridad:

11.08.2006 US 837209 P

09.08.2007 US 836645

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

29.02.2016

73 Titular/es:

**DENDREON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
400 Somerset Corporate Boulevard
Bridgewater, NJ 08807, US**

72 Inventor/es:

**WOLLAN, JAMI B. y
JONES, LORI A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 561 677 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

Epítomos promiscuos de linfocitos T CD4 HER-2/ Neu

5 Solicitudes relacionadas

Antecedentes de la invención

10 Los linfocitos T CD4+ restringidos por HLA de clase II desempeñan un papel crucial en la inmunidad celular y son un componente clave de las respuestas inmunitarias antitumorales. Los linfocitos T CD4+ proporcionan la ayuda necesaria a los LCT específicos de tumores (Topalian 1994. Curr Opin Immunol 6:741 - 745) y producen citocinas tales como interferón gamma (IFN γ), que pueden activar a las células presentadoras de antígeno y participar en otros efectos inmunológicos (Corthay y col., 2005. Immunity 22:371 - 383) Los resultados de experimentos en varios sistemas han demostrado que los linfocitos T CD4+ son necesarios para producir una respuesta inmunológica antitumoral eficaz. Dada la importancia de los linfocitos T CD4+ en la generación de una respuesta inmunológica sólida, una inmunoterapia para el cáncer o vacuna antitumoral diseñada de forma óptima debería inducir los linfocitos T CD4+ y CD8+ con máxima eficacia.

20 El diseño de inmunoterapias y vacunas para el cáncer se ha beneficiado considerablemente de la identificación de antígenos asociados con los tumores. Uno de estos antígenos, el HER-2/Neu, es un objetivo principal de dichas estrategias debido a su amplificación en varios tipos de cáncer, incluidos los cánceres de mama y de ovario. El oncogén HER-2/Neu codifica una glicoproteína transmembrana con homología con el receptor de factor de crecimiento epidérmico (Coussens y col., 1985. Science 230:1132 - 1139). La sobreexpresión de HER-2/Neu se produce en aproximadamente el 30 % de los adenocarcinomas de mama y se asocia con enfermedad agresiva y un mal pronóstico. Como resultado, en ensayos clínicos se han probado varios abordajes inmunológicos diseñados para aumentar el reconocimiento de los linfocitos T de la proteína HER-2/Neu. La caracterización de las respuestas de los linfocitos específicas de HER-2/Neu resultantes en estos estudios ha conducido a la identificación de varios epítomos de linfocitos T restringidos por el HLA de clase I y de clase II dentro de la proteína HER-2/Neu (Sotiriadou y col., 2001. Br J Cancer 85:1527 - 1534). A su vez, la identificación de estos epítomos ha potenciado nuestra capacidad para detectar y cuantificar la respuesta de linfocitos T específica de HER-2/Neu. Dicha información conduce a mejores diseños de inmunoterapias eficaces y proporciona mejor información sobre el papel de los linfocitos T específicos de HER-2/Neu en la erradicación de los tumores que expresan HER-2/Neu.

35 La utilidad de un epítomo de linfocitos Y definidos está limitada por su restricción por HLA. Normalmente, los epítomos peptídicos forman complejos de péptido-MHC productivos con un número pequeño de alelos de HLA y estimulan respuestas de linfocitos T únicamente en los individuos que expresan dichos alelos. Esto confina los estudios inmunológicos y los ensayos clínicos a individuos de un tipo de HLA específico, a menudo el 20 % o menos de la población general. Los denominados epítomos promiscuos de linfocitos T, que un gran número de alelos de HLA pueden presentar, se han descrito para varios antígenos tumorales. Los epítomos promiscuos de linfocitos T se pueden unir a varios alelos del HLA para estimular los linfocitos T específicos de antígeno, lo que permite la inducción y estudio de las respuestas de los linfocitos T en individuos de diferentes tipos de HLA. Adicionalmente, los epítomos promiscuos son valiosos porque las inmunoterapias y las vacunas a base de estos epítomos pueden aplicarse ampliamente a la población general para el tratamiento y la prevención del cáncer. Por tanto, existe una clara necesidad de información nueva relacionada con epítomos promiscuos antes desconocidos de antígenos tumorales.

El documento EP1 568 373 A2 predice una serie de epítomos de HER2/neu según un análisis de motivos y supermotivos de secuencias de epítomos.

50 Los presentes inventores han identificado una serie de nuevos epítomos promiscuos de linfocitos T en la secuencia proteica de HER-2/Neu. Estos epítomos, localizados dentro de la región de 270 - 284 o 268 - 286 de la proteína HER-2/Neu, son reconocidos por un clon de linfocitos T CD4+ generado a partir de un paciente tratado con una inmunoterapia autóloga celular activa para carcinomas que sobreexpresan HER-2/Neu (Valone y col., 2001. Cancer 17 Suppl 2:S53 - 61). El clon de linfocitos T reconoce estos epítomos peptídicos presentados en el contexto de al menos 25 alelos HLA- DRB1 * diferentes. Experimentos de bloqueo con anticuerpos confirman que el reconocimiento está restringido por HLA-DR. Además, estos epítomos están procesados y presentados de forma natural a partir de antígenos proteicos exógenos. La promiscuidad de estos epítomos para diferentes alelos HLA-DRB1* convierte a estos epítomos en una herramienta valiosa para evaluar las respuestas inmunitarias específicas de HER-2/Neu con independencia del tipo de HLA. Adicionalmente, estos epítomos se pueden usar con epítomo de linfocito T colaborador CD4 en vacunas o inmunoterapias a base de péptidos para el tratamiento de cánceres HER-2/Neu+.

Breve resumen de la invención

65 La presente invención describe nuevos epítomos de HER-2/Neu que pueden estar presentados por las células presentadoras de antígenos de una serie de alelos de HLA diferentes para inducir una respuesta de linfocitos T

específica de HER-2/Neu. Por tanto, la presente invención proporciona una composición para su uso en un método para inducir en un paciente una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu, en el que dicha composición comprende un péptido que consiste en la secuencia TYNTDTFESMPN y un excipiente fisiológicamente aceptable. La invención también proporciona una composición para su uso en un método para inducir en un paciente una respuesta inmune específica para una proteína HER-2/Neu, en el que dicha composición comprende un péptido que consiste en la secuencia ALVTYNTDTFESMPN, LVTYNTDTFESM, VTYNTDTFESMP, ALVTYNTDTFESM, LVTYNTDTFESMP, VTYNTDTFESMPN, ALVTYNTDTFESMP, LVTYNTDTFESMPN, PALVTYNTDTFESMPN, o CPALVTYNTDTFESMPN; y un excipiente fisiológicamente aceptable; en el que la ruta de administración de la composición es subcutánea, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. El péptido puede estar en forma de un producto de fusión que comprende uno de los péptidos derivados de HER-2/Neu anteriores fusionados a un polipéptido heterólogo. La invención se define además en las reivindicaciones. En algunos casos, el péptido se fusiona al polipéptido heterólogo a través de un enlace peptídico de un modo tal que el producto de la fusión es, en esencia, una proteína de fusión recombinante.

Preferentemente, el péptido aislado derivado de la secuencia HER-2/Neu o su producto de fusión es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T específicos de una proteína HER-2/Neu cuando es presentado por una célula presentadora de antígeno de al menos 10 alelos HLA-DR diferentes y, más preferentemente, al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más alelos HLA-DR diferentes.

En algunas realizaciones, los alelos HLA-DR se seleccionan del grupo que consiste en 0101, 0102, 0103, 1503, 160201, 0301, 0302, 0401, 0402, 040301, 040501, 1101, 1102, 1103, 1104, 110401, 1201, 1301, 1302, 1401, 1402, 0701, 080101, 080201 y 0901.

En algunas realizaciones, el péptido derivado de HER-2/Neu tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido derivado de HER-2/Neu descrito anteriormente o una proteína de fusión que une un péptido derivado de HER-2/Neu y un polipéptido heterólogo mediante un enlace peptídico, un casete de expresión que comprende el ácido nucleico y una célula huésped que comprende el casete de expresión.

En algunos casos, la secuencia polinucleotídica codifica el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En otros casos, la secuencia polinucleotídica codifica una proteína de fusión en la que el polipéptido heterólogo es GM-CSF.

En algunas realizaciones, el casete de expresión es un vector viral recombinante. En otras realizaciones, el casete de expresión dirige la expresión del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o una proteína de fusión recombinante en la que el polipéptido heterólogo es GM-CSF.

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un péptido derivado de HER-2/Neu como se ha descrito anteriormente o un producto de fusión del péptido fusionado con un polipéptido heterólogo, además de un excipiente fisiológicamente aceptable.

En algunas realizaciones, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En otras realizaciones más, la composición comprende además una célula presentadora de antígeno que tiene el péptido derivado de HER-2/Neu en forma de un complejo con la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de la célula.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para inducir en un paciente una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica de una proteína HER-2/Neu. Este procedimiento comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición que comprende un péptido derivado de HER-2/Neu como se ha descrito anteriormente o un producto de fusión del péptido fusionado con un polipéptido heterólogo, así como un excipiente fisiológicamente aceptable.

En algunas realizaciones, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) poner en contacto una célula presentadora de antígenos y un linfocito T, en una muestra que comprende sangre, infiltrado tumoral, nódulos linfáticos o fluidos linfáticos obtenidos de un paciente, con un péptido que consiste en la secuencia: ALVTYNTDTFESMPN, VTYNTDTFESMP, TYNTDTFESMPN, LVTYNTDTFESMP, VTYNTDTFESMP, VTYNTDTFESMPN, ALVTYNTDTFESMP, LVTYNTDTFESMPN, PALVTYNTDTFESMPN, o CPALVTYNTDTFESMPN; y (b) detectar una respuesta de linfocitos T, en el que la detección de una respuesta de linfocitos T indica la presencia de una

respuesta inmunitaria de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu en el paciente.

En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza mediante ELISPOT, ensayo de proliferación o citometría de flujo. En otras realizaciones, el péptido derivado de HER-2/Neu tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2.

5

Breve descripción de las figuras

Figura 1. El clon de linfocitos T HER500.23c21 es específico de HER-2/Neu. (A) HER500 (aminoácidos ■ y BA7072 (proteína de fusión HER500/GM-CSF) ♦ la producción específica de IFN γ por HER500.23c21 se midió usando ELISA tras la presentación de PBMC autólogos de los antígenos; también se analizó el fondo ▲. El ensayo se realizó por triplicado en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio IMDM completo con 10 % de PBS. Los PBMC autólogos se usaron a 2×10^5 células/pocillo y el clon de linfocitos T HER500.23c21 se añadió a 1×10^5 células/pocillo. Los antígenos estaban a las concentraciones finales mostradas. El ensayo se incubó durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO $_2$ y se extrajo el sobrenadante de los pocillos para analizar la producción de citocinas. (A) Producción de IFN γ . Los puntos de datos mostrados representan los pg/ml calculados para cada concentración de antígeno. (B) La producción de IL-2 para el mismo ensayo se midió usando la proliferación de células HT-2. Los puntos de datos representan los valores de CPM medios para cada concentración de antígeno.

Figura 2. El clon de linfocitos T HER500.23.21 es específico del péptido n° 63 (HERp270-284). El epítipo HER-2/neu se mapeó para el clon HER500.23.21 y la especificidad se determinó usando EBV-LcL autólogas y cada péptido HER500 individual n° 1-125 (15 aminoácidos de longitud). El ensayo se realizó en placas de fondo redondo de 96 pocillos con EBV-LcL autólogas a 2×10^5 células/pocillo y el clon de linfocitos T HER500.23.21 se añadió a 1×10^5 células/pocillo. Cada péptido se usó a una concentración final de 1 μ g/ml. El ensayo se incubó durante a 37 °C con 5 % de CO $_2$ durante 48 horas, tiempo tras el cual se extrajo el sobrenadante para analizar la producción de citocinas. (A) La producción de IFN γ por el clon HER500.23.21 se midió usando ELISA, los pg/ml calculados se muestran en cada péptido HER500. (B) La producción de IL-2 se midió usando la proliferación de células HT-2.

Figura 3. Restricción de HLA-DR. La línea EBV-LcL autóloga a 2×10^5 células/ml y HERp270-284 se usó para estimular el clon de linfocitos T HER500.23c21 (1×10^5 células/pocillo) con y sin la adición de anticuerpos bloqueantes anti-MHC de clase II. Anti-HLA-DR ♦ y anti-HLA-DQ/anti-HLA-DP ■ se titularon a las concentraciones mostradas en cRPMI+10 % de FBS. Los pocillos también contenían EBV-LcL, clon celular HER500.23c21T y péptido (1 μ g/ml). El ensayo se incubó durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO $_2$. Los sobrenadantes se recogieron y se congelaron a -20 °C y, en una fecha posterior, se analizó la producción de IFN γ usando ELISA. Se realizaron múltiples experimentos, se muestran los valores medios por triplicado para un experimento representativo.

Figura 4. HERp270-284 es un epítipo de HER-2/Neu del MHC de clase II. (A) En las líneas EBV-LcL homocigotas para varios alelos HLA-DR se analizó su capacidad para presentar HERp270-284 al clon HER500.23c21. La producción de IFN γ específica de antígeno por HER500.23c21 estaba por encima del límite de detección superior del ELISA de IFN γ (4.000 pg/ml) con las líneas EBV-LcL. Los controles negativos incluyeron un péptido HER500 irrelevante, ausencia de péptido y cada línea EBV-LcL (todos los valores no detectables, no mostrados). El ensayo se realizó en placas de fondo redondo de 96 pocillos en in cRPMI+10 % FBS con 2×10^5 EBV-LcL/pocillo y 1×10^5 de HER500.23c21 células/pocillo. Los péptidos se usaron a una concentración final de 1 μ g/ml. El ensayo se incubó durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO $_2$. Los sobrenadantes se recogieron, se congelaron a -20 °C y después se analizó la producción de IFN γ mediante ELISA. Se muestran los resultados de un experimento representativo. (B) HERp270-284 se tituló con cada línea EBV LcL para determinar la sensibilidad de HER500.23c21 a diferentes alelos. El ensayo se realizó como en (A) a excepción de que las concentraciones de HERp270-284 son: 10 ng/ml, 33 ng/ml, 66 ng/ml, 100 ng/ml y 250 ng/ml. Todas las concentraciones de HERp270-284 superiores a 250 ng/ml tuvieron como resultado la producción de IFN γ por HER500.23c21 por encima del límite de detección superior del ELISA de IFN γ ELISA (4.000 pg/ml). Se muestran los resultados de un experimento representativo.

Figura 5. Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 9 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 270 – 284.

Figura 6. Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 10 u 11 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 270 – 284.

Figura 7. Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 (medida mediante la absorbancia a 492 nm) tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 12 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 270 – 284.

65

Figura 8. Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 (indicada por la absorbancia a 492 nm) tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 13 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 270 – 284.

5 **Figura 9.** Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 (indicada por la absorbancia a 492 nm) tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 14 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 270 – 284.

10 **Figura 10.** Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 (indicada por la absorbancia a 492 nm) tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 16 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 268 – 286.

15 **Figura 11.** Representación gráfica de la producción de IFN γ por HER500.23c21 (indicada por la absorbancia a 492 nm) tras la exposición a los péptidos presentados por las líneas EBV LcL de varios alelos HLA-DRb1. Los péptidos tenían 17 unidades dentro del péptido HER-2/Neu 268 – 286.

Definiciones

20 El término “aislado”, cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína carece esencialmente de otros componentes celulares con los que está asociado en el estado natural. Preferentemente está en estado homogéneo aunque puede estar en una solución seca o acuosa. La pureza y la homogeneidad normalmente se determinan usando técnicas de química analítica, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de los marcos de lectura
25 abiertos que flanquean al gen y codifican una proteína distinta a la del gen de interés. El término “purificado” indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel de electroforesis. Particularmente, significa que el ácido nucleico o proteína tiene una pureza del al menos un 85 %, más preferentemente una pureza del al menos 95 %, y lo más preferentemente una pureza del al menos un 99 %.

30 En la presente solicitud, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican después, por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir un carbono α que
35 está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metilmetionina sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, peor conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos hacen referencia a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido pero que funciona de un modo similar a un aminoácido natural.

40 La expresión “ácido nucleico” o “polinucleótido” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de un modo similar a los nucleótidos naturales. A menos
45 que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta también abarca implícitamente variantes de la misma modificadas de forma conservadora (p. ej., sustituciones de codones degeneradas) y secuencias complementarias, así como la secuencia que se indica explícitamente. Específicamente se pueden conseguir sustituciones de codones degeneradas generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxinosina (Batzer y col., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260:26052608 (1985); y Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8:9198 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc o ARNm codificados por un gen.

55 Cuando se refiere a las localizaciones relativas de elementos en una secuencia de polinucleótidos, una localización “cadena abajo” es una en el extremo 3' de un punto de referencia y una localización “cadena arriba” es una en el extremo 5' de un punto de referencia.

60 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. Como se usa en el presente documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidas proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), en las que los residuos de aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos covalentes. En la presente solicitud, la secuencia de algunas realizaciones, la fructosil aminoácido
65 oxidasa comprende desde el extremo N al extremo C. En otras palabras, cuando se describe una secuencia de aminoácidos de un péptido, el primer aminoácido del extremo N se denomina “primer aminoácido”.

5 Cuando se usa en el contexto de describir patrones de un péptido de fusión, el término “heterólogo” hace referencia a la relación de una pareja de fusión peptídica con la otra pareja de fusión peptídica. el modo en el cual las parejas de fusión están presentes en el péptido de fusión no es uno que se pueda encontrar en una proteína de origen natural. Por ejemplo, un “polipéptido heterólogo” fusionado a un epítipo HER-2/Neu para formar un péptido de fusión puede ser uno que se origine de una proteína distinta a la proteína HER-2/Neu, tal como un factor estimulante de las colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF). Por otro lado, un “polipéptido heterólogo” puede ser uno derivado de otra porción de la proteína HER-2/Neu que no es inmediatamente contigua al epítipo HER-2/Neu. Un “polipéptido heterólogo” puede contener modificaciones de una secuencia de proteínas de origen natural o una porción de la misma, tales como deleciones, adiciones o sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos. Con independencia del origen del “polipéptido heterólogo” (es decir, cuando deriva de la proteína HER-2/Neu u otra proteína), el péptido de fusión no debería contener una subsecuencia de HER-2/Neu humana que abarca la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1 y tiene una longitud de más de 18 aminoácidos. En algunas realizaciones de ejemplo, un “polipéptido heterólogo” para uso en la presente invención tiene una longitud de más de 15-20 aminoácidos; en otras realizaciones, un “polipéptido heterólogo” tiene una longitud de de al menos 100 aminoácidos.

15 El término “fusionar” o “fusionado”, como se usa en el contexto de la descripción de un péptido que comprende un epítipo de HER-2/Neu unido a un polipéptido heterólogo, hace referencia a una conexión entre el epítipo y el polipéptido heterólogo mediante cualquier enlace covalente, incluido un enlace peptídico.

20 La expresión “una secuencia de ácido nucleico codificante” hace referencia a un ácido nucleico que contiene información de secuencia para un ARN estructural, tal como ARNr, un ARNt o la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína o péptido específico o un sitio de unión para un agente regulador de trans-acción. Esta frase abarca específicamente codones degenerados (Es decir, codones diferentes que codifican un único aminoácido) de la secuencia o secuencias nativas que se pueden introducir para adaptarse a la preferencia de codones en una célula huésped específica.

25 Un “casete de expresión” es una construcción de ácido nucleico generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de una secuencia polinucleotídica concreta en una célula huésped. Un casete de expresión puede formar parte de un plásmido, genoma viral o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, un casete de expresión incluye un polinucleótido a transcribir unido operablemente a un promotor.

30 El término “recombinante”, cuando se usa con referencia a, por ejemplo, una célula o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína de una fuente externa o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que, por otro lado, se expresan de forma anormal. se subexpresan o no se expresan en absoluto.

35 El término “administración” o “administrar” se refiere a varios procedimientos de poner en contacto a un mamífero, especialmente un ser humano, con una sustancia. Los modos de administración pueden incluir, entre otros, procedimientos que pueden implicar poner en contacto la sustancia por vía intravenosa, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, tópica, subcutánea, parenteral, intramuscular, oral o sistémica, o mediante inyección, ingestión, inhalación, implantación o adsorción por cualquier otro medio. Un medio de administración de ejemplo de un péptido HER-2/Neu o un péptido de fusión que comprende un péptido HER-2/Neu y un polipéptido heterólogo es mediante administración intravenosa, en la que el péptido o péptido de fusión puede formularse como una composición farmacéutica en forma adecuada para inyección intravenosa, tal como una solución acuosa, una suspensión o una emulsión etc. Otro medio para administrar un péptido HER-2/Neu o péptido de fusión incluye inyección transdérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular o aplicación transdérmica como un parche.

40 Una “cantidad eficaz” de una determinada sustancia hace referencia a una cantidad de la sustancia que es suficiente para efectuar un resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una composición que comprende un péptido que está destinado a inducir una inmunidad anti-Her-2/Neu es una cantidad suficiente para alcanzar el objetivo de inducir la inmunidad cuando se administra a un sujeto. El efecto a conseguir puede incluir la prevención, corrección o inhibición de la progresión de los síntomas de una enfermedad/afección y complicaciones relacionadas hasta cualquier medida detectable. La cantidad exacta de una “cantidad eficaz” dependerá del propósito de la administración y la puede determinar el experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1 - 3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); y Pickar, Dosage Calculations (1999)).

45 Un “excipiente fisiológicamente aceptable” es un ingrediente inerte usado en la formulación de una composición que contiene el o los ingredientes activos de un péptido HER-2/Neu o un péptido de fusión que comprende un péptido HER-2/Neu y un polipéptido heterólogo y es adecuado para usar, por ejemplo, mediante inyección en un paciente que lo necesite. Este ingrediente inerte puede ser una sustancia que, cuando está incluida en una composición, proporciona un pH, consistencia, color, olor o sabor deseados de la composición.

Como se usa en el presente documento, la expresión “**respuesta inmunitaria de linfocitos T**” hace referencia a la activación de linfocitos T específicos de antígeno medida mediante la proliferación o la expresión de moléculas sobre la superficie celular o la secreción de proteínas tales como citocinas.

5 Descripción detallada de la invención

I. Introducción

Los presentes inventores han identificado una serie de nuevos epítomos promiscuos de linfocitos T de la proteína HER-2/Neu. Estos epítomos peptídicos demuestran una promiscuidad considerable de HLA, ya que se pueden presentar en el contexto de al menos 25 alelos HLA-DRB1 diferentes. La presentación de estos epítomos mediante una gama tan amplia de alelos HLA-DRB1 hace que estos epítomos sean extremadamente valiosos como epítomos de linfocitos T colaboradores CD4 universales en la preparación de vacunas o inmunoterapias para el tratamiento de cánceres que sobreexpresan HER-2/Neu en la población humana general.

II. Síntesis química de péptidos

Los péptidos de la presente invención, en particular aquéllos de una longitud relativamente corta /p. ej., de no más de 50-100 aminoácidos) se pueden sintetizar químicamente usando síntesis peptídica convencional u otros protocolos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos se pueden sintetizar mediante procedimientos de síntesis peptídica en fase sólida usando procedimientos similares a los descritos en Merrifield y col., J. Am. Chem. Soc., 85:2149 - 2156 (1963); Barany y Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis, en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology Gross and Meienhofer (eds.), Academic Press, N.Y., vol. 2, pp. 3 - 284 (1980); y Stewart y col., Solid Phase Peptide Synthesis 2ª ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Durante la síntesis, los aminoácidos N- α -protegidos que tienen cadenas laterales protegidas se añaden de forma escalonada a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por su extremo C y a un soporte sólido, es decir esferas de poliestireno. Los péptidos se sintetizan mediante la unión de un grupo amino de un aminoácido N- α -desprotegido a un grupo α -carboxi de un aminoácido N- α -protegido que se ha activado haciéndolo reaccionar con un reactivo tal como dicitclohexilcarbodiimida. La unión de un grupo amino libre al carboxilo activado conduce a la formación de enlaces peptídicos. Los grupos N- α -protectores más usados incluyen Boc, que es lábil a ácidos, y Fmoc, que es lábil a bases.

Los materiales usados para uso como soporte sólido son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, los siguientes: resinas de halometilo, tales como la resina de clorometilo o resina de bromometilo, resinas de hidroximetilo, resinas de fenol, tal como resina 4-(α -[2,4-dimetoxifenil]-Fmoc-aminometil)fenoxi; resinas terc-alkuilo-x-carbonilhidrazidadas y similares. Dichas resinas están disponibles comercialmente y sus procedimientos de preparación son conocidos por los expertos en la técnica.

En resumen, el aminoácido N- α -protegido del extremo C se une primero al soporte sólido. Después se elimina el grupo N- α -protector. El grupo α -amino desprotegido está acoplado al grupo α -carboxilato activado del siguiente aminoácido N- α -protegido. El procedimiento se repite hasta que se sintetiza el péptido deseado. Los péptidos resultantes se escinden después del soporte polimérico insoluble y las cadenas laterales de aminoácidos quedan desprotegidas. Los péptidos más largos pueden derivar mediante condensación de los fragmentos peptídicos protegidos. Los detalles de las sustancias químicas, resinas, grupos protectores, aminoácidos protegidos y reactivos adecuados se conocen bien en la técnica y, por tanto, no se tratan con detalle en el presente documento (Véase, por ejemplo, Atherton y col., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1989), y Bodanszky, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2ª Ed., Springer-Verlag (1993)).

III. Producción recombinante de péptidos

A. Tecnología recombinante general

Los textos básicos que divulgan procedimientos y técnicas generales en el campo de la genética recombinante incluyen Sambrook y Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology (1994).

Para los ácidos nucleicos, los tamaños se proporcionan en kilobases (kb) o en pares de bases (pb). Estos son estimaciones derivadas de la electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida, a partir de ácidos secuenciados o a partir de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se proporcionan en kilodalton (kDa) o números de residuos de aminoácidos. Los tamaños de las proteínas se estiman a partir de la electroforesis en gel, a partir de proteínas secuenciadas, a partir de secuencias de aminoácidos secuenciados o a partir de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que están disponibles comercialmente se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo de acuerdo con el procedimiento del triéster de fosfoamidita de fase sólida descrita por primera vez por Beaucage &

Caruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859 - 1862 (1981), usando un sintetizador automático, como se describe en Van Devanter y col., Nucleic Acids Res. 12:6159 - 6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo electroforesis en gel de acrilamida nativa o HPLC de intercambio aniónico, como se describe en Pearson y Reanier, J. Chrom. 255:137 - 149 (1983).

5 La producción recombinante es un medio eficaz para obtener péptidos, en particular los de peso molecular relativamente grande, por ejemplo un péptido de fusión de un epítipo de HER-2/Neu y un GM-CSF. La secuencia de un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención y oligonucleótidos sintéticos se puede verificar después de clonar o subclonar usando, por ejemplo, el procedimiento de terminación de cadena para secuenciar
10 moldes bicatenarios de Wallace y col., Gene 16: 21 - 26 (1981).

B. Construcción de un casete de expresión

Obtención de una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido para usar en la invención

15 Una secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido se puede obtener mediante síntesis química o se puede adquirir de un proveedor comercial, que después se puede manipular adicionalmente usando técnicas estándar de clonación molecular.

Modificación de ácidos nucleicos para uso de codones preferidos en un organismo huésped

20 La secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido se puede alterar opcionalmente para coincidir con el uso de codón preferido de un huésped concreto. Por ejemplo, el uso de codón preferido de una cepa de células bacterianas se puede usar para derivar un polinucleótido que codifica un péptido e incluye los codones favorecidos por esta cepa. La frecuencia de uso de codón preferido exhibida por una célula huésped se puede calcular mediante el
25 promedio de la frecuencia del uso de codón preferido en un gran número de genes expresados por la célula huésped (p. ej., el servicio de cálculo está disponible en el sitio web del Kazusa DNA Research Institute, Japón). Este análisis se limita, preferentemente, a los genes con una elevada expresión en la célula huésped.

30 Al final de la modificación, las secuencias de codificación se verifican mediante secuenciación y después se subclonan en un vector de expresión adecuado para la producción recombinante de los péptidos.

Tras la verificación de la secuencia de codificación, el péptido se puede producir usando técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante.

35 C. Sistemas de expresión

Para obtener un nivel elevado de expresión de un ácido nucleico que codifica un péptido, normalmente se subclona un polinucleótido que codifica el péptido en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la
40 transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. En la técnica se conocen bien los promotores bacterianos adecuados y se describen en, por ejemplo, Sambrook y Russell, *supra*, y Ausubel y col., *supra*. Los sistemas de expresión bacterianos para expresar un péptido de la presente invención están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Salmonella*, y *Caulobacter*. Los kit para estos sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Los sistemas de expresión en eucariotas para
45 células de mamífero, levaduras y células de insectos son bien conocidos en la técnica y también están disponibles comercialmente. En una realización, el vector de expresión en eucariotas es un vector adenovirus, un vector adenoasociado o un vector retroviral.

50 EL promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación concreta. El promotor está opcionalmente colocado aproximadamente a la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heterólogo que del sitio de inicio de la transcripción en su contexto natural. No obstante, como se conoce en la técnica se puede acomodar alguna variación en esta distancia sin perder la función del promotor.

Además del promotor, el vector de expresión normalmente incluye una unidad de transcripción o casete de
55 expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión de un péptido en las células huésped. Por tanto, un casete de expresión típico contiene un promotor unido operablemente a la secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido y las señales requeridas para una eficiente poliadenilación del transcrito, sitios de unión al ribosoma y terminación de la traducción. La secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido normalmente está unida a una secuencia del péptido señal escindible para estimular la secreción del péptido por la
60 célula transformada. Dichos péptidos señal incluyen, entre otros, los péptidos señal del activador de plasminógeno tisular, insulina y el factor de crecimiento neuronal y la esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Ejemplos adicionales del casete pueden incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico como el gen estructural (p. ej., que codifica el polipéptido heterólogo), intrones con sitios donantes y aceptores de corte y empalme funcionales.

65 Además de una secuencia promotora, el casete de expresión deberá contener también una región de terminación de la transcripción cadena abajo del gen estructural para proporcionar una terminación eficiente. La región de

terminación se puede obtener a partir del mismo gen que la secuencia promotora o se puede obtener a partir de genes diferentes.

El vector de expresión concreto usado para transportar la información genética al interior de la célula no es particularmente crucial. Se puede usar cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacteriana estándar incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D, y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. También se pueden añadir marcadores de epítopos a las proteínas recombinantes para proporcionar procedimientos cómodos de aislamiento, por ejemplo c-myc.

En los vectores de expresión en eucariotas normalmente se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas, por ejemplo vectores de SV40, vectores del virus del papiloma y vectores derivados del virus de Epstein-Barr. Otros vectores eucarióticos de ejemplo incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor de la metalotioneína, el promotor del virus de tumor mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la poliedrina, y otros promotores que se han demostrado eficaces para la expresión en células eucariotas.

Algunos sistemas de expresión tienen marcadores que proporcionan amplificación génica, tales como timidina quinasa, hidromicina B fosfotransferasa y dihidrofolato reductasa. Como alternativa, también son adecuados los sistemas de expresión de alto rendimiento que no implican amplificación génica, tales como vector de baculovirus en células de insectos, con una secuencia polinucleotídica que codifica el péptido bajo la dirección del promotor de la poliedrina u otros promotores de baculovirus fuertes.

Los elementos que normalmente se incluyen en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica resistencia a antibióticos para permitir la selección de bacterias que alojan plásmidos recombinantes y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucarióticas. El gen de resistencia a antibióticos elegido no es crucial, son adecuados cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica. Las secuencias procarióticas se eligen, opcionalmente, de un modo tal que no interfieran en la replicación del ADN en las células eucariotas, en caso necesario. De un modo similar a los marcadores de selección de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección metabólicos basados en vías metabólicas conocidas también se pueden usar como medio para seleccionar las células huésped transformadas.

Cuando se desea la expresión periplásmica de una proteína recombinante (p. ej., un péptido para usar en la presente invención), el vector de expresión comprende además una secuencia que codifica una señal de secreción, tal como la señal de secreción OppA (proteína de unión al oligopéptido periplásmico) de *E. coli* o una versión modificada de la misma, que está conectada directamente al extremo 5' de la secuencia de codificación de la proteína a expresar. La secuencia señal dirige la proteína recombinante producida en el citoplasma a través de la membrana celular en el espacio periplásmico. El vector de expresión puede además comprender una secuencia de codificación para la peptidasa señal 1, que es capaz de escindir enzimáticamente la secuencia señal cuando la proteína recombinante entra en el espacio periplásmico. Una descripción más detallada de la producción periplásmica de una proteína recombinante se puede encontrar en, por ejemplo, Gray y col., *Gene* 39: 247 - 254 (1985), las patentes de EE.UU. Nº 6.160.089 y 6.436.674.

C. Procedimientos de transfección

Los procedimientos de transfección estándar se usan para producir líneas celulares de bacterias, mamíferos, levaduras, insectos i plantas que expresan cantidades grandes de un péptido, que después se purifican usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Colley y col., *J. Biol. Chem.* 264:17619 - 17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, in *Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariotas se realiza de acuerdo con técnicas estándar (véase, por ejemplo, Morrison, *J. Bact.* 132:349 - 351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, *Methods in Enzymology* 101:347 - 362 (Wu y col., eds, 1983).

Se puede usar cualquiera de los procedimientos para introducir secuencias nucleotídicas extrañas en las células huésped. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores virales y cualquiera de los otros procedimientos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genérico extraño en una célula huésped (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, *supra*). Solo es necesario que el procedimiento de ingeniería genérica concreta usado pueda introducir con éxito al menos un gen en la célula huésped capaz de expresar el péptido.

D. Detección de la expresión recombinante de un péptido en las células huésped

Una vez que el vector de expresión se ha introducido en las células huésped adecuadas, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del péptido. Después, las células se someten a detección

selectiva de la expresión del péptido recombinante, que después se recupera del cultivo usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); patente de EE.UU. N° 4.673.641; Ausubel y *col.*, *supra*; y Sambrook y Russell, *supra*).

5 Los expertos en la técnica conocen bien varios procedimientos generales para la detección selectiva de la expresión génica. En primer lugar, la expresión génica se puede detectar a nivel del ácido nucleico. Normalmente se usan diversos procedimientos de medición específica de ADN y ARN usando técnicas de hibridación de ácido nucleico (p. ej., Sambrook y Russell, *supra*). Algunos procedimientos implican una separación por electroporación (p. ej., transferencia Southern para detectar ADN y transferencia Northern para detectar ARN), pero la detección de ADN o
10 de ARN se puede llevar a cabo sin electroforesis también (tal como transferencia puntual). La presencia de ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención en células transfectadas también se puede detectar mediante PCR o RT-PCR usando cebadores específicos de secuencia.

15 En segundo lugar, la expresión génica se puede detectar a nivel de polipéptido. Los expertos en la técnica usan de forma rutinaria varios ensayos inmunológicos para medir el nivel de un producto génico, en particular usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan específicamente con un péptido, en particular uno que contiene un polipéptido heterólogo lo bastante grande (p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 - 497 (1975)). Dichas técnicas requieren preparación de anticuerpos seleccionando anticuerpos con especificidad elevada contra el péptido o una porción
20 antigénica del mismo. Los procedimientos de producir anticuerpos policlonales y monoclonales están bien establecidos y sus descripciones se pueden encontrar en la literatura, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*; Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511 - 519 (1976).

IV. Purificación de péptidos

25

A. Purificación de péptidos sintetizados químicamente

La purificación de péptidos sintéticos se consigue usando varios procedimientos de cromatografía, tal como HPLC de fase inversa, permeación en gel, intercambio iónico, exclusión por tamaño, afinidad, reparto o distribución
30 contracorriente. Las elecciones de las matrices y tampones adecuados son bien conocidas en la técnica.

B. Purificación de péptidos producidos de forma recombinante

1. Purificación de péptidos a partir de cuerpos de inclusión bacterianos

35

Cuando bacterias transformadas producen un péptido de forma recombinante en grandes cantidades, normalmente después de la inducción por un promotor, aunque la expresión puede ser constitutiva, los péptidos pueden formar agregados insolubles. Existen varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión proteicos. Por ejemplo, la purificación de proteínas agregadas (en lo sucesivo en el presente documento denominadas cuerpos de inclusión) normalmente implica la extracción, separación y/o purificación de los cuerpos de
40 inclusión rompiendo las células bacterianas, por ejemplo mediante incubación en un tampón de aproximadamente 100 - 150 µg/ml de lisozima y 0,1 % de Nonidet P40, un detergente no iónico. La suspensión celular se puede moler usando un molinillo Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Como alternativa, Las células se pueden sonicar en hielo. Procedimientos alternativos para lisar bacterias se describen en Ausubel y *col.*, y Sambrook y
45 Russell, ambos *supra*, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

Generalmente, la suspensión celular se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se resuspende en tampón, que no se disuelve pero lava los cuerpos de inclusión, por ejemplo Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y 2 % de Triton-X 100, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para eliminar cuantos más desechos celulares como sea posible. El sedimento restante de los cuerpos de
50 inclusión se puede resuspender en un tampón adecuado (p. ej., fosfato sódico 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM). Otros tampones adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica.

Tras la etapa de lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizan mediante la adición de un disolvente que es tanto un aceptor fuerte de hidrógenos como un donante fuerte de hidrógenos (o una combinación de disolventes, teniendo cada uno de ellos una de estas propiedades). Las proteínas que formaron los cuerpos de inclusión se pueden renaturalizar después mediante dilución o diálisis con un tampón compatible. Entre los disolventes adecuados se incluyen urea (de aproximadamente 4M a aproximadamente 8M), formamida (al menos aproximadamente un 80 %, basado en el volumen/volumen) y clorhidrato de guanidina (de aproximadamente 4M a aproximadamente 8M).
60 Algunos disolventes que son capaces de solubilizar las proteínas formadoras de agregados, tales como SDS (dodecilsulfato sódico) y 70 % de ácido fórmico, pueden no ser adecuados para usar en este procedimiento debido a la posibilidad de la desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañada de una falta de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y se puede producir la renaturalización tras la eliminación (mediante, por ejemplo, diálisis) o dilución del agente desnaturalizante, lo que permite que se vuelva a formar la proteína innumológicamente y/o
65 biológicamente activa de interés. Tras la solubilización, la proteína se puede separar de otras proteínas bacterianas

mediante técnicas de separación estándar. Para una descripción adicional la purificación de polipéptidos recombinantes de cuerpos de inclusión bacterianos, véase, por ejemplo, Patra y col., Protein Expression and Purification 18:182 - 190 (2000).

5 Como alternativa, es posible purificar polipéptidos recombinantes, por ejemplo un péptido para usar en la presente invención, del periplasma bacteriano. Cuando el polipéptido recombinante se exporta al periplasma de la bacteria, la fracción periplásmica de la bacteria se puede aislar mediante choque osmótico frío además de por otros procedimientos conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col. *supra*). Par aislar péptidos recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El
10 sedimento se resuspende en n tampón que contiene 20 % de sacarosa. Para lisar las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en MgSO₄ 5 mM helado y se mantiene en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Los péptidos recombinantes presentes en el sobrenadante se pueden separar de las proteínas huésped mediante técnicas de separación estándar bien conocidas para los expertos en la técnica.

15 2. Técnicas estándar de separación de proteínas para purificación

20 Cuando un polipéptido recombinante, por ejemplo un péptido para uso en la presente invención, se expresa en las células huésped en una forma soluble, su purificación puede seguir el procedimiento estándar de purificación de proteínas que se describe más adelante. Este procedimiento estándar de purificación también es adecuado para purificar péptidos obtenidos a partir de síntesis química.

i. Fraccionamiento por solubilidad

25 A menudo como etapa inicial, y si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento de sales inicial puede separar muchas de las proteínas indeseadas de la célula huésped (o proteínas derivadas de los medios de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés, por ejemplo un péptido para usar en la presente invención. La sal preferida es sulfato amónico. El sulfato amónico precipita las proteínas reduciendo de un modo eficaz la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Después, las proteínas precipitan basado en su solubilidad. Cuanto más hidrófoba
30 es una proteína, más probable es que precipite a concentraciones menores de sulfato amónico. Un protocolo típico es añadir sulfato amónico saturado a una solución proteica de modo que la concentración de sulfato amónico resultante está entre 20-30 %. Esto precipitará las proteínas más hidrófobas. El precipitado se desecha (a menos que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato amónico al sobrenadante hasta una concentración que se sabe que precipita la proteína de interés. Después, el precipitado se solubiliza en tampón y el exceso de sal se
35 elimina en caso necesario mediante diálisis o diafiltración. Otros procedimientos que dependen de la solubilidad de las proteínas, tales como precipitación en etanol frío, son bien conocidos para os expertos en la técnica y se pueden usar para fraccionar mezclas proteicas complejas.

ii. Filtración diferencial por tamaño

40 Basado en el peso molecular calculado se puede aislar una proteína de mayor y menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (p. ej., membranas Amicon o Millipore). Como primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un valor de corte del peso molecular inferior al peso molecular de una proteína de interés, por ejemplo un péptido para usar en la
45 presente invención. Lo que ha quedado retenido en la ultrafiltración se ultrafiltra después frente a una membrana con un valor de corte molecular superior al peso molecular del péptido de interés. La proteína recombinante atravesará la membrana hacia el filtrado. Después, el filtrado se puede someter a cromatografía como se describe a continuación.

iii. Cromatografía en columna

50 Una proteína de interés (tal como un péptido para usar en la presente invención) también se puede separar de otras proteínas según su tamaño, carga neta en la superficie, hidrofobicidad o afinidad por los ligandos. Además, los anticuerpos producidos contra un péptido de la presente invención se pueden conjugar con matrices de la columna y el péptido se inmunopurifica. En la técnica se conocen bien todos estos procedimientos.

55 Para un experto en la técnica será evidente que se pueden realizar técnicas cromatográficas a cualquier escala y usando equipo de muchos fabricantes diferentes (p. ej., Pharmacia Biotech).

60 C. Confirmación de la secuencia peptídica

La secuencia de aminoácidos de un péptido se puede confirmar mediante una serie de procedimientos bien establecidos. Por ejemplo, el procedimiento convencional de la degradación de Edman se puede usar para determinar la secuencia de aminoácidos de un péptido. Asimismo, con frecuencia se usan para este fin diversas variaciones de los procedimientos de secuenciación basados en la degradación de Edman, incluyendo
65 microsecuenciación, y procedimientos basados en espectrometría de masas.

D. Modificación de péptidos

Los péptidos se pueden modificar para conseguir propiedades más deseables. Es bien conocido el diseño de péptidos modificados químicamente y de imitadores peptídicos que son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas o que han mejorado su solubilidad o capacidad de unión.

Los aminoácidos modificados o derivados químicos de los péptidos o péptidos de fusión pueden contener restos químicos adicionales de aminoácidos modificados que normalmente no forman parte de la proteína HER-2/Neu. Las modificaciones covalentes de los péptidos están incluidas dentro del ámbito de la presente divulgación. Estas modificaciones se pueden introducir en un péptido haciendo reaccionar los residuos de aminoácidos del péptido con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Los ejemplos siguientes de derivados químicos se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

El diseño de imitadores peptídicos que son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas es conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sawyer, Structure-Based Drug Design, P. Verapandia, Ed., N.Y. (1997); patentes de EE.UU. N° 5.552.534 y 5.550.251. Ambas estructuras peptídicas y las modificaciones de las cadenas laterales se pueden usar en el diseño de imitación de la estructura secundaria. Posibles modificaciones incluyen la sustitución de D-aminoácidos, N^o-Me-aminoácidos, C_α-e-aminoácidos y ácidos deshidroamino. Hasta la fecha se han diseñado varios miméticos de la estructura secundaria y se incorporan en péptidos o peptidomiméticos.

Otras modificaciones incluyen la sustitución de un aminoácido natural con un aminoácido hidroxilado no natural, la sustitución de los grupos carboxi en aminoácidos ácidos con derivados de nitrilo, la sustitución de los grupos hidroxilo en aminoácidos básicos con grupos alquilo o la sustitución de metionina con sulfóxido de metionina. Además, un aminoácido de un péptido HER-2/Neu o un péptido de fusión se pueden sustituir con el mismo aminoácido pero de quiralidad opuesta, es decir un L-aminoácido de origen natural se puede sustituir por su configuración D.

V. Fusión de un epítipo her-2/neu con un polipéptido heterólogo

En un aspecto de esta divulgación, un péptido correspondiente a un epítipo promiscuo de linfocitos T HER-2/Neu se une a un polipéptido heterólogo mediante un enlace covalente para formar un péptido de fusión, de forma que se potencia la capacidad del epítipo HER-2/Neu para inducir una respuesta de linfocitos T. Con frecuencia, este enlace covalente es un enlace peptídico y el epítipo HER-2/Neu y el polipéptido heterólogo forman un polipéptido nuevo. Este enlace peptídico puede ser un enlace peptídico directo entre el epítipo HER-2/Neu y el polipéptido heterólogo o puede ser un enlace peptídico indirecto proporcionado a modo de ligador peptídico entre el epítipo HER-2/Neu y el polipéptido heterólogo.

Otros enlaces covalentes también son adecuados para el propósito de fusionar el péptido HER-2/Neu con el polipéptido heterólogo. Por ejemplo, un grupo funcional (tal como un grupo amina no terminal, un grupo de ácido carboxílico no terminal, un grupo hidroxilo y un grupo sulfhidrilo) de un péptido puede reaccionar fácilmente con un grupo funcional del otro péptido y establecer un enlace covalente, distinto a un enlace peptídico, que conjugue los dos péptidos. Un enlace covalente entre un péptido de un epítipo HER-2/Neu y un polipéptido heterólogo también se puede proporcionar mediante una molécula ligadora con uno o más grupos funcionales adecuados. Dicha molécula ligadora puede ser un ligador peptídico o un ligador no peptídico. Un ligador puede derivatizarse para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales antes de la conjugación. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de una serie de moléculas tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.

VI. Ensayos funcionales

Un epítipo HER-2/Neu de la presente divulgación (o un péptido de fusión que comprende un péptido HER-2/Neu y un polipéptido heterólogo) es útil por su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T específicos de una proteína HER-2/Neu cuando el epítipo es presentado por una célula presentadora de antígeno puede tener uno de al menos 10 alelos HLA-DR diferentes, más preferentemente al menos 15, 20 o 25 alelos HLA-DR diferentes. Se pueden usar varios ensayos funcionales para confirmar la capacidad de un epítipo HER-2/Neu para inducir dicha respuesta inmunitaria de linfocitos T específicos de HER-2/Neu de un modo promiscuo con respecto a las células presentadoras de antígeno de diferentes alelos HLA-DR, incluido el ensayo de proliferación y ensayos de citometría de flujo que detectan la unión entre un receptor de linfocitos T y un epítipo peptídico o la producción de citocinas por los linfocitos T.

El sistema de ensayos funcionales usados en los Ejemplos de esta solicitud es particularmente adecuado para este fin. En resumen, se usa un panel de al menos 10, preferentemente al menos 15, 20 o 25 líneas de células presentadoras de antígenos, cada una homocigota para un alelo HLA-DR diferente para presentar los péptidos derivados de HER-2/Neu a un clon de linfocitos T CD4⁺ (p. ej., el clon HER500.23c21) que responde específicamente a la proteína HER-2/Neu (p. ej., mediante la producción de citocinas tales como IFN γ o IL-2). El epítipo 270 - 284 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 3 se usa como control positivo, mientras que

un péptido derivado de HER-2/N irrelevante, sin péptido y cada línea de células presentadoras de antígenos sola se usan como controles negativos para los ensayos. Los ensayos se realizan en placas de cultivo de múltiples pocillos en un medio adecuado con las células presentadoras de antígeno y linfocitos y CD4⁺ en cada pocillo. Los péptidos se diluyen hasta una concentración adecuada y se añaden a cada pocillo. Tras la incubación de un periodo de tiempo adecuado, los sobrenadantes se recogen de los pocillos y se analiza la producción de citocinas, que se pueden medir mediante ELISA basado en la absorbancia a 492 nm. Normalmente, el efecto de un epítipo promiscuo de clase II HER-2/Neu descrito en el presente documento sobre la inducción de una respuesta de linfocitos T CD4⁺ específicos de HER-2/Neu es al menos un 25 % del efecto del epítipo HER-2/Neu 270 - 284 (que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2) en las mismas condiciones de ensayo, por ejemplo a la misma concentración molar y presentados por las células presentadoras de antígeno del mismo alelo HLA-DR individual. Más preferentemente, dicho efecto es al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o mayor del mostrado por el epítipo HER-2/Neu 270 - 284 en las mismas condiciones.

VII. Composiciones y administración

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden una cantidad eficaz de (1) un péptido HER-2/Neu o (2) un péptido de fusión que comprende un péptido HER-2/Neu y un polipéptido heterólogo o (3) una célula presentadora de antígeno (CPA) con el péptido de (1) o (2) que forma un complejo con una molécula del MHC sobre la superficie de la célula para inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T específicos de una proteína HER-2/Neu en aplicaciones tanto profilácticas como terapéuticas. Las composiciones farmacéuticas son adecuadas para usar en diversos sistemas de liberación de fármacos. Formulaciones adecuadas para usar en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a Ed. (1985). Para una breve revisión de los procedimientos para la liberación de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527 - 1533 (1990).

Se pueden generar células presentadoras de antígeno (CPA) para la carga peptídica mediante diversos procedimientos. La materia prima de partida es la sangre periférica o una leucaféresis con o sin movilización. Las CPA se pueden aislar mediante múltiples procedimientos, por ejemplo centrifugación en densidad de flotación, hidroseparación, perlas magnéticas y adherencia en plástico usados solos o en combinación. Después del aislamiento, las CPA se cultivan durante 1-14 días con o sin la presencia de citocinas, factores de crecimiento, agentes de activación y agentes de maduración. Las CPA se cargan con un péptido mediante la adición de péptido al cultivo en concentraciones de 1 µg a 1 mg/ml durante 6-48 horas. Las CPA se recogen, se lavan y se resuspenden en una formulación adecuada para infusión. Las CPA se pueden liberar frescas o se pueden mantener en conservación congeladas para liberar más adelante.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por varias vías, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Las vías preferidas de administración de las composiciones farmacéuticas son las vías subcutánea o intradérmica a dosis bisemanales de aproximadamente 1 µg - 10 mg, preferentemente 50 µg-1 mg, de un péptido para un ser humano adulto de 70 kg. La dosis adecuada se puede administrar a intervalos semanales, bisemanales o mensuales.

Las CPA pulsadas peptídicas se pueden administrar por varias vías, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal. Las CPA pulsadas peptídicas se liberan a intervalos semanales, bisemanales o mensuales a dosis de 1 millón-10 billones de células.

Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un péptido, se usan excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones, suspensiones y emulsiones adecuadas para administración intradérmica, subcutánea, parenteral o intravenosa. Las soluciones de agua estéril del componente activo (p. ej., un péptido HER-2/Neu o péptido de fusión) o soluciones estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, agua tamponada, solución salina, PBS, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tampón y agentes de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Las soluciones estériles se pueden preparar disolviendo el componente activo (p. ej., un péptido HER-2/Neu o péptido de fusión) en el sistema disolvente deseado y pasar después la solución resultante por un filtro de membrana para esterilizarlo o, como alternativa, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente esterilizado previamente en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes se pueden empaquetar para usar tal cual o liofilizadas, estando la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9 y lo más preferentemente de 7 a 8.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un péptido HER-2/Neu o péptido de fusión se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente ya afectado por una afección que puede agravarse por la proliferación de células tumorales que

sobreexpresan la proteína HER-2/Neu en una cantidad suficiente para prevenir, curar, invertir o al menos ralentizar o detener parcialmente los síntomas de la afección y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y el peso y estado general del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg del péptido HER-2/Neu o péptido de fusión bisemanalmente para un paciente de 70 kg, usándose con más frecuencia las dosis de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 1 mg del péptido bisemanalmente para un paciente de 70 kg. La dosis adecuada se puede administrar a intervalos semanales, bisemanales o mensuales.

Se pueden llevar a cabo administraciones sencillas o múltiples de las composiciones, de las que los niveles y el patrón de dosis son seleccionados por el médico encargado del tratamiento. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberán proporcionar una cantidad de un péptido HER-2/Neu o péptido de fusión suficiente para inhibir con eficacia la proliferación de células tumorales que sobreexpresan HER-2/Neu en el paciente con fines terapéuticos.

VIII. Procedimiento para detectar la respuesta de linfocitos T específicos de la proteína her-2/neu

La presente invención proporciona además un procedimiento *in vitro* para detectar si una respuesta inmunitaria de linfocitos T específicos de una proteína HER-2/Neu está presente en un paciente como se define en las reivindicaciones. Este procedimiento incluye las etapas siguientes: primera, se obtienen de un paciente los linfocitos, incluyendo al menos un linfocito T y una célula presentadora de antígeno. Muestras adecuadas que proporcionan dichos linfocitos incluyen sangre, infiltrados tumorales y ganglios linfáticos o fluidos linfáticos. Segunda, los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno se exponen a un péptido HER-2/Neu (o un péptido de fusión que comprende el péptido HER-2/Neu y un péptido heterólogo) de la presente invención en condiciones que permitirían la presentación adecuada de un epítipo de linfocitos por la célula presentadora de antígeno al linfocito T. Tercera, los signos de una respuesta de linfocitos T se miden *in vitro* por medios bien conocidos en la técnica, tales como ELISPOT, ensayo de proliferación o citometría de flujo. Cuando una respuesta de linfocitos T se detecta por cualquiera de estos procedimientos se puede concluir que existe una respuesta inmunitaria de linfocitos T específicos de una proteína HER-2/Neu en el paciente.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no como limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente varios parámetros no críticos que podrían modificarse o cambiarse para dar esencialmente resultados similares.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. BA7072 es una proteína de fusión recombinante patentada fabricada por Dendreon Corporation (Seattle, WA) para usar en la vacuna experimental APC8024, para el tratamiento de los cánceres HER-2/neu+. BA7072 contiene secuencias proteicas del dominio extracelular (DEC) y del dominio intracelular (DIC) de HER-2/neu. HER500 es una proteína recombinante también producida por Dendreon Corporation que contiene secuencias tanto del DEC como del DIC de HER-2/neu y es la porción HER-2/neu del antígeno BA7072. Para definir respuestas inmunitarias específicas HER500 *in vitro* se generaron 125 péptidos de la secuencia proteica HER500. Estos péptidos tenían una longitud de 15 aminoácidos, solapados por 11 unidades (Genemed Synthesis, South San Francisco, CA). El péptido HER500 n° 63 (HERp270-284, ALVTYNTDTFESMPN) de los 125 péptidos HER500 corresponde a los aminoácidos 270 - 284 de la secuencia HER-2/neu natural. Además de los péptidos de 15 unidades HER500 generados se sintetizaron péptidos de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16 y 17 unidades a partir de los residuos 268 - 286 de la secuencia de HER-2/Neu. Estos péptidos derivaron después de truncamientos en los extremos NH₂- y COOH o la adición de 1-2 aminoácidos a HERp270-284 para dar los péptidos descritos. Todos los péptidos HER500 se secuenciaron y se determinó que tenían una pureza >95 % mediante HPLC analítica y espectroscopia de masas (Genemed Synthesis).

Recolección de muestras de donantes sanos y del sujeto Todas las muestras de los donantes sanos y del suero se recogieron de acuerdo con los protocolos patrocinados por el investigador aprobados por la Junta de Revisión de la investigación adecuada. Después de recibir el consentimiento informado, se recogieron muestras de sangre entera mediante venopunción en tubos de tipo vacutainer heparinizados o jeringuillas preparadas para transporte y/o procesamiento. Después de recibir las muestras de sangre en nuestro laboratorio se recolectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en condiciones estériles mediante centrifugación por gradiente de densidades y se prepararon para usar en ensayos especificados.

Generación *in vitro* de clones de linfocitos T específicos de HER-2/neu . Las PBMC de un sujeto que está recibiendo APC8024, un tratamiento experimental para el cáncer positivo para HER-2/neu, se estimularon en un matraz de cultivo tisular T-24 con 10 µg/ml de BA7072 durante la noche en medio RPMI 1640 con L-glutamina 2mM,

penicilina 50 U/ml, 50 µg/ml de estreptomycin y tampón HEPES 20mM con 10 % de suero AB humano (Gemini BioProducts, Calabasas, CA) (cRPMI+10 %HS). Al día siguiente se aislaron las células secretoras de IFN γ del cultivo de PBMC usando el kit de detección y enriquecimiento para el ensayo de secreción de (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). La población enriquecida con IFN γ se sembró en placas mediante dilución límite en placas de fondo redondo de 96 pocillos con 10 U/ml de IL-2 humana recombinante (Invitrogen). Las células no secretoras de IFN γ se irradiaron (3.000 rad) y se añadieron a 50 µl por pocillo, dando un volumen final en todos los pocillos de 150 µl. Las placas se incubaron durante siete días a 37 °C con 5 % de CO $_2$. A partir de este sujeto también se generaron células linfoblastoide transformadas en EBV (EBV-LcL) usando PBMC autólogas y sobrenadante de la línea celular B95-8 (ATCC, Manassas, VA) para la expansión y análisis de clones de linfocitos T autólogos. El día 7 de la clonación, las células secretoras de IFN γ se expandieron inespecíficamente en placas de 96 pocillos como se ha descrito anteriormente (Yee y col., 2002. Proc Natl Acad Sci USA 99:16168 - v16173). En resumen, a cada pocillo, se añadieron 100 µl de medio cRPMI+10 %HS con 25 U/ml de IL-2 humana recombinante y 10 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 humano (BD Pharmingen, San Diego, CA) con 1x10 4 /pocillo de EBV-LcL irradiadas autólogas y 1x10 5 /pocillo de PBMC alogénicas irradiadas. Las placas se incubaron durante 14 días a 37 °C y después se inspeccionaron visualmente los pocillos para determinar crecimiento positivo. Los clones positivos para el crecimiento, el clon HER23c21 y otros se transfirieron a placas de 24 pocillos y se expandieron usando rIL-2, anti-CD3 y células accesorias como se ha indicado anteriormente. El volumen final de cada pocillo fue de 2,4 ml y las células accesorias aumentaron de número para dar 2x10 6 /pocillo de PBMC alogénicas irradiadas y 1x10 5 /pocillo de EBV-LcL autólogas irradiadas por pocillo.

Identificación y caracterización de los clones de linfocitos T de HER-2/neu. Los clones se sometieron a detección selectiva según la especificidad antigénica usando PBMC autólogas y antígeno o EBV-LcL autólogas y péptidos Her500. Las estimulaciones se realizaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio cRPMI+10 % FBS y se incubaron durante 48 horas a 37 °C con 5 % de CO $_2$. Adicionalmente, los clones se tiñeron para detectar la expresión de superficie de CD4 y CD8 mediante citometría de flujo.

Producción de citocinas. Para determinar la producción de citocinas en los ensayos de estimulación específica de antígeno, tras 48 horas se extrajeron 200 µl de sobrenadante de los cultivos y se analizó la producción de IL-2 e IFN γ . La producción de IL-2 se midió usando la línea HT-2 dependiente de IL-2 (ATCC). Las células HT-2 se cultivaron en IMDM con 10 % de FBS y NEAA 100uM, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2mM, penicilina 50 mM, 50 U/ml de estreptomycin, HEPES 20 mM y 2-mercaptoetanol 20 uM (cIMDM+10 %FBS) y fueron alimentadas dos veces a la semana con 20 ng/ml de rIL-2. Para el ensayo, 4 días después de dividir las células HT-2, las células se lavaron con IMDM+10 % FBS para eliminar el rIL-2, y se añadieron células a placas de fondo redondo de 96 pocillos a 1x10 4 células/pocillo en cIMDM + 10 %FBS. Los sobrenadantes de la estimulación específica de antígeno se añadieron a los pocillos y las placas se incubaron 24-30 horas a 37 °C. Al día siguiente se añadió 1 µCi de 3 [H] TdR durante las últimas 6 horas del ensayo y las placas se recogieron en láminas de filtro de fibra de vidrio y la incorporación del radioisótopo o la respuesta proliferativa se determinó mediante cuentas por minuto usando un contador de centelleo líquido (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc. Boston, MA). La producción de IFN γ se midió usando los pares de anticuerpo anti-de IFN γ humano para ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA). En resumen, placas Immulon 4 (Thermo Labsystems/ VWR, Brisbane, CA) se revistieron durante la noche con anticuerpo anti-IFN γ humano (NIB42) a 3 µg/ml Al día siguiente se desechó el anticuerpo de revestimiento y se añadió 4 % de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) en PBS (Invitrogen) a los pocillos y las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS+ 0,05 %Tween 20 y se añadieron 100 µl de muestras de sobrenadante de la estimulación específica del antígeno a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,25 - 2 horas. Las placas se lavaron y el anticuerpo anti- IFN γ humano (4S.B3) biotinilado se diluyó en 1 % de BSA en PBS (1 µg/ml) y se añadió a las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, Estrep-Avidina HRP (BD Pharmingen) se diluyó a 1:1.000 en PBST y se añadió a los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, las placas se lavaron y se añadió Sigma $^{\circledR}$ Fast OPD durante 15 minutos en oscuridad. Se añadió HCl 2M para detener la reacción y se leyeron las placas para determinar la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro.

Restricción de HLA-DR y promiscuidad: Para determinar la restricción del HLA-DR del epítipo de linfocitos T HERp270-284, el AcMo anti-HLA-DR L243, el AcMo HLA-DQ 1a3 o el AcMo HLA-DP B7/21 (20 – 1,25 µg/ml) se cultivaron con el clon de linfocitos T HER.23c21, el péptido HERp270-284 y las EBV-LcL autólogas en medio cRPMI+10 %FBS. Los sobrenadantes se recogieron tras 48 horas y se analizó la producción de IL-2 e IFN γ . También se analizó HERp270-284 para determinar la promiscuidad de HLA-DR usando las líneas EBV-LcL adquiridas en la Colección Europea de Cultivos Celulares originada a partir del 12 Taller Internacional sobre Histocompatibilidad (IHW) celebrado en Estrasburgo, Francia. Las líneas de IHW enumeradas en la Tabla I son homocigotos para varios alelos HLA-DR β 1 y se propagaron en medio RPMI 1640 con 10 % de suero bovino fetal, HEPES 20 mM, L-glutamina 2mM, penicilina 50mM y 50U/ml de estreptomycin (cRPMI+10 %FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA Para analizar la promiscuidad del MHC de clase II se añadió HERp270-284 a 1µg/ml con cada línea EBV-LcL separada (2x10 5 células/pocillo) y el clon de linfocitos T HER.23c21 (1x10 5 células/pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio cRPMI+10 %FBS a 37° C. Los sobrenadantes se recogieron tras 48 horas y se analizó la producción de IFN γ .

Resultados

APC8024 es una inmunoterapia de células autólogas en investigación para el cáncer de mama que expresa Her2/neu. Para caracterizar la respuesta inmunitaria inducida mediante esta inmunoterapia, los inventores aislaron clones de linfocitos T de un sujeto de ensayo clínico tratado con APC8024. Uno de los clones de linfocitos T CD4+ generados, HER500.23c21, mostró una respuesta específica a las secuencias proteicas HER-2/Neu exógenas presentadas por las PBMC autólogas (Figura 1). En este experimento, HER500.23c21 se estimuló con dosis crecientes de HER500, una proteína recombinante que contiene los dominios intracelulares y extracelulares de HER-2/Neu y BA7072, que consiste en HER500 expresada como una proteína de fusión con hGM-CSF. HER500.23c21 produjo específicamente IFN γ e IL-2 en respuesta a ambos antígenos pero no se observó producción de citocina en ausencia de antígeno. HER500.23c21 respondió a cada una de estas proteínas de un modo dependiente de la dosis, lo que indica que HER500.23c21 reconoce un epítipo HER-2/Neu que está procesado de forma natural y presentado a partir del antígeno proteico exógeno.

Dada la clara respuesta de HER500.23c21 a las secuencias proteicas HER-2/Neu, el epítipo específico reconocido por HER500.23c21 se mapeó usando péptidos. HER500.23c21 se analizó contra un panel de 125 péptidos de 15 unidades individuales solapantes que cubren las secuencias proteicas HER-2/Neu en HER500. Cada péptido se usó a 1 μ g/ml con células EBV LCL autólogas como células presentadoras de antígenos. En estos experimentos, HER500.23c21 respondió fuertemente a la combinación de los 125 péptidos individuales, medido mediante la producción de IFN γ o IL2 (Figura 2A y B, barra superior). Además, Her500.23.c21 solo respondió a un péptido individual, el péptido 63, lo que indica que este péptido contiene el epítipo reconocido por HER500.23c21 (Figura 2). El péptido 63 corresponde a los aminoácidos 270 - 284 de la secuencia proteica HER-2/Neu y solapa los péptidos adyacentes en 11 aminoácidos. Por tanto, la falta de respuesta al péptido 62 o 64 sugiere que el epítipo de linfocitos T HER500.23c21 está contenido completamente en la secuencia de HERp270-284 y los aminoácidos comunes a los péptidos flanqueantes no contienen el epítipo completo para este clon de linfocitos T. Para definir el epítipo mínimo reconocido por HER500.23c21, los inventores diseñaron péptidos de 9, 10 u 11 unidades con truncamientos en los extremos NH $_2$ - y COOH de HERp270-284. La estimulación de HER500.23c21 con estos péptidos tuvo éxito con secuencias de solo 11 unidades VTYNTDTFESM y TYNTDTFESMP cuando son presentadas por las líneas EBV LcL que representan alelos HLA-DRB1 *0301, *0302, *1301 y *1402.

Con el fin de determinar qué moléculas de HLA eran responsables de presentar HERp270-284 para HER500.23c21 se usaron anticuerpos bloqueantes de HLA para inhibir la presentación y la activación de linfocitos T. HER500.23c21 se estimuló con 1 μ g/ml de HERp270-284 y EBV-LcL autólogas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos específicos de HLA-DR o HLA-DP/-DQ. La estimulación de los linfocitos T se determinó mediante la producción de IFN γ . El anticuerpo contra HLA-DR inhibió la estimulación de HER500.23c21 por HERp270-284 de un modo dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo bloqueante de HLA-DP/-DQ no tuvo ningún efecto sobre la activación de los linfocitos T, incluso a concentraciones altas de 20 μ g/ml (Figura 3). Estos resultados demuestran que el reconocimiento de HER500.23c21 de HERp270-284 está restringido por el HLA-DR.

Para definir adicionalmente la restricción del HLA, los inventores analizaron la capacidad de HERp270-284 para activar HER500.23c21 usando un panel de 25 líneas EBV LcL homocigotas para diferentes alelos HLA-DRB1*, que representan 13 familias serológicas de DR (Tabla I). Cada línea EBV-LcL analizada pudo estimular con eficiencia HER500.23c21 de un modo específico del antígeno, lo que indica que el epítipo HERp270-284 es promiscuo para al menos 25 alelos HLA-DRB1* (Figura 4A). En estos experimentos, 1 μ g/ml del péptido HERp270-284 indujo una respuesta de linfocitos T máxima, con independencia de la línea EBV-LcL usada. No obstante, las diferencias en la capacidad de los diversos alelos para estimular Her500.23c21 fueron evidentes a concentraciones menores del péptido (Figura 4B), con algunos alelos, tales como DRB1*0401, capaz de estimular a tan bajo como 10ng/ml, y otros alelos no pudieron estimular por debajo de 250 ng/ml (DRB1*1103). Es probable que estas diferencias reflejen una serie de afinidades de unión de HERp270-284 para diferentes alelos DRB1*. No obstante, el elevado grado de promiscuidad observado en estos experimentos sugiere que HERp270-284 puede contener un epítipo de linfocitos T colaboradores universales para HER-2/Neu.

Discusión

El estudio de las respuestas inmunitarias antitumorales a menudo está restringido a un número pequeño de antígenos presentados por tipos de HLA específicos debido a las limitaciones del reactivo. La identificación de los epítipo promiscuos de linfocitos T puede ayudar a aliviar las limitaciones permitiendo el análisis de las respuestas inmunitarias antitumorales en individuos de diversos tipos de HLA. Debido a su valor tanto como herramienta de investigación como por el potencial terapéutico, muchos esfuerzos se han centrado en la identificación y la caracterización de epítipos promiscuos de linfocitos T CD4 y CD8. Los epítipos peptídicos con varios grados de promiscuidad en su unión a HLA se han identificado en antígenos de enfermedades infecciosas-VIH (van der Burg y col., 1999. J Immunol 162:152 - 160), micobacterias (Valle y col., 2001. Clin Exp Immunol 123:226 - 232), y *p. falciparum* (Contreras y col., 1998. Infect Immun 66:3579 - 3590), así como antígenos tumorales tales como NY-ESO (Zarour y col., 2002. Cancer Res 62:213 - 218), MAGE (Consogno y col., 2003. Blood 101:1038 - 1044), Tert (Schroers y col., 2003. Clin Cancer Res 9:4743 - 4755), y Her2/neu (Kobayashi y col., 2000. Cancer Res 60:5228 - 5236) Los programas informáticos, tales como TEPITOPE (Bian y Hammer. 2004. Methods 34:468 - 475) usan motivos de unión comunes conocidos para predecir los epítipos promiscuos basados en la secuencia proteica y se

han identificado muchos posibles nuevos epítomos de linfocitos T de varias fuentes. La relevancia biológica de los epítomos identificados *in silico* se está abordando en una serie de sistemas (Ruiz y col., 2004. Clin Cancer Res 10:2860 - 2867; y Al-Attayah y Mustafa. 2004. Scand J Immunol 59:16 - 24).

- 5 En este estudio se descubrió un nuevo epítomo promiscuo de linfocitos T del antígeno asociado con el tumor, HER-2/Neu. Este epítomo de linfocitos T se identificó con un clon de linfocitos T CD4+ aislado de un paciente tratado con una inmunoterapia con células autólogas para cáncer HER-2/Neu+. El epítomo está contenido en los aminoácidos 270 - 284 de la secuencia proteica HER-2/Neu y se procesa de forma natural y se presenta a partir de antígenos proteicos exógenos. El hecho de que el clon de linfocitos T específico de este epítomo se aisló de un individuo tratado con una inmunoterapia específica de HER-2/Neu sugiere que este epítomo puede desempeñar un papel *in vivo* como parte de una respuesta inmunitaria antitumoral clínicamente relevante. Además de identificarse en un contexto biológicamente relevante, este epítomo peptídico es interesante porque tiene una promiscuidad de HLA-DR muy amplia y se puede presentar al clon de linfocitos T HER500.23c21 por al menos 25 alelos HLA-DRB1* diferentes que representan 13 familias de DR serológicas. La mayoría de los demás péptidos identificados como epítomos promiscuos de linfocitos T por solo unos pocos alelos HLA diferentes, pero los inventores todavía tienen que identificar un alelo HLA-DRB1* incapaz de presentar el HERp270-284 al clon de linfocitos T. La ausencia relativa de restricción del MHC para la presentación de este epítomo lo convierte en un candidato ideal para un epítomo de linfocitos T CD4 HER-2/Neu universal.
- 10
- 15
- 20 Un objetivo principal de la inmunología tumoral es desarrollar inmunoterapias y vacunas eficaces en el cáncer contra antígenos asociados con tumores. Dichos tratamientos están diseñados para estimular una respuesta inmunitaria anti-tumoral para erradicar el tumor. Centrarse en antígenos específicos asociados con tumores ha tenido éxito en la generación de respuestas inmunitarias anti-tumorales y conduce a la identificación de epítomos específicos de linfocitos T dentro de algunos antígenos tumorales. Aunque los trabajos más recientes se centraron únicamente en la generación de respuestas de linfocitos T CD8 específicas de tumores, se ha observado una apreciación creciente de la importancia de los linfocitos T CD4 en la generación de una inmunidad antitumoral eficaz. Por ello se ha expandido el estudio de respuestas de linfocitos T CD4 antitumorales y la identificación de epítomos de linfocitos T restringidos por la clase II de los antígenos asociados a tumores. La utilidad de estos epítomos aumenta considerablemente si dichos epítomos pueden estar presentados por más de un tipo de HLA. Las estrategias de vacunas contra el cáncer a base de péptidos se han visto obstaculizadas por la restricción de HLA del epítomo peptídico en la vacuna. La inclusión de epítomos promiscuos de linfocitos T como el que se describe en el presente documento amplía la utilidad de dichas vacunas en la población general. La inducción de una respuesta inmunitaria contra un antígeno tumoral por un epítomo promiscuo es un modo eficaz de alcanzar un mayor porcentaje de la población general. Dicho epítomo promiscuo también proporciona medios útiles para analizar la respuesta.
- 25
- 30
- 35

Tabla I. Líneas celulares EBV-LCL definidas por HLA

Alelo HLA-DRB1*	Familia serológica DR	Nombre de la línea celular
0101	DR1	KAS116
0102	DR1	PMG075
0103	DR103	TER-ND
1503	DR15	AMAI
160201	DR16	RML
0301	DR17	VAVY
0302	DR18	RSH
0401	DR4	BM14
0402	DR4	YAR
040301	DR4	SSTO
040501	DR4	LKT3
1101	DR11	BM21
1102	DR11	BM15
1103	DR11	TISI
1104	DR11	BOB
110401	DR11	FPAF
1201	DR12	BM16
1301	DR13	OMW
1302	DR13	EMJ
1401	DR14	EK
1402	DR14	AMALA
0701	DR7	BER
080101	DR8	BM9
080201	DR8	SPL
0901	DR9	T7526

Las líneas celulares se obtuvieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares ECACC y se enumeran en el

directorio de células IMGT/HLA ([website ebi.ac.uk/imgt/hla/cell query.html](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/cell_query.html)).

Ejemplo 2

5 En esta serie de experimentos se analizaron péptidos adicionales derivados de la proteína HER-2/Neu para determinar su potencial como epítomos promiscuos HER-2/neu de MHC de clase II. El epítomo HERp270-284 (SEC ID N° 2) se usó como control positivo en los experimentos. Se usó un panel de líneas EBV-LcL homocigotas para varios alelos HLA-DR para presentar HERp270-284, así como varias longitudes de péptidos en esta secuencia de 15 aminoácidos o péptidos de mayor longitud dentro de la secuencia de 19 aminoácidos de HER-2/Neu 268 - 286 (SEC ID N° 1), al clon HER500.23c21. Los controles negativos para los ensayos incluyeron un péptido HER500 irrelevante, ausencia de péptido y cada línea EBV-LcL. Las EBV-LcL autólogas también se pasaron con cada condición como control para la especificidad del clon HER500.23c21. Los ensayos se realizaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos en in cRPMI+10 % FBS con 2×10^5 EBV-LcL/pocillo y 1×10^5 de HER500.23c21 células/pocillo. Los péptidos se diluyeron a una concentración final de 1 µg/ml añadida a 100 µl/pocillo. El ensayo se incubó durante 15 48 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para determinar la producción de IFNγ usando ELISA. Se muestran los resultados de un experimento representativo para cada serie de péptidos (Figura 5 - 11). Los resultados del IFNγ producido por el clon HER500.23c21 en respuesta al péptido y cada alelo HLA-DR se indican en pg/ml de IFγ o como la absorbancia a 492 nm.

20 **Listado de secuencias**

SEC ID N° 1 (268 - 286 de proteína HER-2/Neu)
CPALVTYNTDTFESMPNPE

25 SEC ID N° 2 (270 - 284 de la proteína HER-2/Neu, o residuos 3 - 17 de SEC ID N° 1)
ALVTYNTDTFESMPN

Listado de secuencias

30 <110> Dendreon Corporation

<120> Epítomos promiscuos de linfocitos T CD4 HER-2/NEU

35 <130>AHB/FP6830145

<140> EP

<141> 10-08-2007

40 <150> 07813984.7

<151> 10-08-2007

<150> PCT/US07/75681

45 <151> 2007-08-10

<150> US 60/837,209

<151> 2006-08-11

50 <150> US 11/836,645

<151> 09-08-2007

<160> 33

55 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> restos 268-286 de la proteína de HER-2/Neu, 268-286 del péptido de HER-2/Neu

65 <400> 1

ES 2 561 677 T3

Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
1 5 10 15
Asn Pro Glu

5 <210>2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 270-284 del péptido de HER-2/Neu, péptido HER500 n.º 63, HERp270-284, 270-284 del epítipo de HER-2/Neu, restos 3-17 de SEC ID Nº: 1

<400> 2

15 **Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn**
1 5 10 15

20 <210>3
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 3

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr
1 5

30 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 4

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe
1 5

45 <210>5
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 5

55

ES 2 561 677 T3

Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu
1 5

5 <210>6
<211>9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 6

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser
1 5

15

20 <210>7
<211>9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

25 <400> 7

Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met
1 5

30 <210>8
<211>9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 8

Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
1 5

40

45 <210>9
<211>9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 9-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

50 <400> 9

Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
1 5

55 <210> 10
<211> 11

ES 2 561 677 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> 11-mero de HER-2p270-284

<400> 10

Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met
1 5 10

10

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> 11-mero de HER-2p270-284

20 <400> 11

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
1 5 10

25 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 10-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 12

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe
1 5 10

35

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> 10-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

45

<400> 13

Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser
1 5 10

50

ES 2 561 677 T3

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> 10-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu
 <400> 14

10

Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro
1				5					10

<210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> 11-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

20

<400> 15

Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu
1				5					10	

25

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> 10-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

35

<400> 16

Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu
1				5				10	

40

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> 10-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 17

Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met
1				5					10

50

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

ES 2 561 677 T3

<220>

<223> 10-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 18

5

Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
1 5 10

<210> 19

10

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> 11-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 19

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser
1 5 10

20

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

30

<400> 20

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser
1 5 10

35

<210>21

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> 12-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 21

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met
1 5 10

45

<210> 22

<211> 12

50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55

<223> 12-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 22

ES 2 561 677 T3

Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
1 5 10

5 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 12-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 23

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
1 5 10

15 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 13-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

25 <400> 24

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met
1 5 10

30 <210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> 13-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 25

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
1 5 10

40 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> 13-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

50 <400> 26

Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
1 5 10

55 <210> 27
 <211> 14

ES 2 561 677 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> 14-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 27

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
 1 5 10

10

<210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 14-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

20 <400> 28

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
 1 5 10

25 <210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> 16-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 29

Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
 1 5 10 15

35

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 16-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

45 <400> 30

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro
 1 5 10 15

50

<210>31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> 17-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

ES 2 561 677 T3

<400> 31

Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro
1 5 10 15
Asn

5

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> 17-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

<400> 32

Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn
1 5 10 15
Pro

15

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> 17-mero 270-284 del péptido de HER-2/Neu

25

<400> 33

Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro
1 5 10 15
Glu

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en un método para inducir en un paciente una respuesta inmune de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu, en el que dicha composición comprende un péptido que consiste en la secuencia TYNTDTFESMPN, y un excipiente fisiológicamente aceptable.
- 10 2. Una composición para su uso en un método para inducir en un paciente una respuesta inmune de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu, en el que dicha composición comprende un péptido que consiste en la secuencia ALVTYNTDTFESMPN, VTYNTDTFESMP, TYNTDTFESMPN, LVTYNTDTFESMP, VTYNTDTFESMPN, ALVTYNTDTFESMP, LVTYNTDTFESMPN, PALVTYNTDTFESMPN, o CPALVTYNTDTFESMPN; y un excipiente fisiológicamente aceptable; en el que la ruta de administración de la composición es subcutánea, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intravenosa, o intraperitoneal.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos VTYNTDTFESMP.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos LVTYNTDTFESMP o VTYNTDTFESMPN.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos ALVTYNTDTFESMP, LVTYNTDTFESMPN, PALVTYNTDTFESMPN, o CPALVTYNTDTFESMPN.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho péptido está fusionado a un polipéptido heterólogo.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el péptido está fusionado a un polipéptido heterólogo a través de un enlace peptídico.
- 40 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el polipéptido heterólogo es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).
- 45 9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende además una célula presentadora de antígenos, formando el péptido un complejo con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre la superficie de la célula.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha molécula del CMH es un alelo de HLA-DR que es uno cualquiera de los alelos 0101, 0102, 0103, 1503, 160201, 0301, 0302, 0401, 0402, 040301, 040501, 1101, 1102, 1103, 1104, 110401, 1201, 1301, 1302, 1401, 1402, 0701, 080101, 080201, y 0901.
- 55 11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la ruta de administración es subcutánea o intradérmica a dosis bisemanales de aproximadamente 1 µg-10 mg para un ser humano adulto de 70 kg.
- 60 12. Un método *in vitro* para detectar una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu, comprendiendo el método las etapas de (a) poner en contacto una célula presentadora de antígenos y un linfocito T, en una muestra obtenida de un paciente, con un péptido que consiste en la secuencia:
 TYNTDTFESMPN; y
 (b) detectar una respuesta de linfocito T, en el que la detección de una respuesta de linfocito T indica la presencia de una respuesta inmunitaria de linfocito T específica para una proteína HER-2/Neu en el paciente.
- 65 13. Un método *in vitro* para detectar una respuesta inmunitaria de linfocitos T específica para una proteína HER-2/Neu, comprendiendo el método las etapas de (a) poner en contacto una célula presentadora de antígenos y un linfocito T, en una muestra que comprende sangre, infiltrado tumoral, nódulos linfáticos o fluidos linfáticos obtenidos de un paciente, con un péptido que consiste en la secuencia:
 ALVTYNTDTFESMPN, VTYNTDTFESMP, TYNTDTFESMPN, LVTYNTDTFESMP, VTYNTDTFESMPN, ALVTYNTDTFESMP, LVTYNTDTFESMPN, PALVTYNTDTFESMPN, o CPALVTYNTDTFESMPN; y
 (b) detectar una respuesta de linfocito T, en el que la detección de una respuesta de linfocito T indica la presencia de una respuesta inmunitaria de linfocito T específica para una proteína HER-2/Neu en el paciente.
14. El método de las reivindicaciones 12 o 13, en el que la etapa (b) se lleva a cabo mediante ELISPOT, ensayo proliferativo, o citometría de flujo.

15. El método de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el péptido está fusionado a un polipéptido heterólogo a través de un enlace peptídico.

5 16. El método de la reivindicación 15, en el que el polipéptido heterólogo es un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

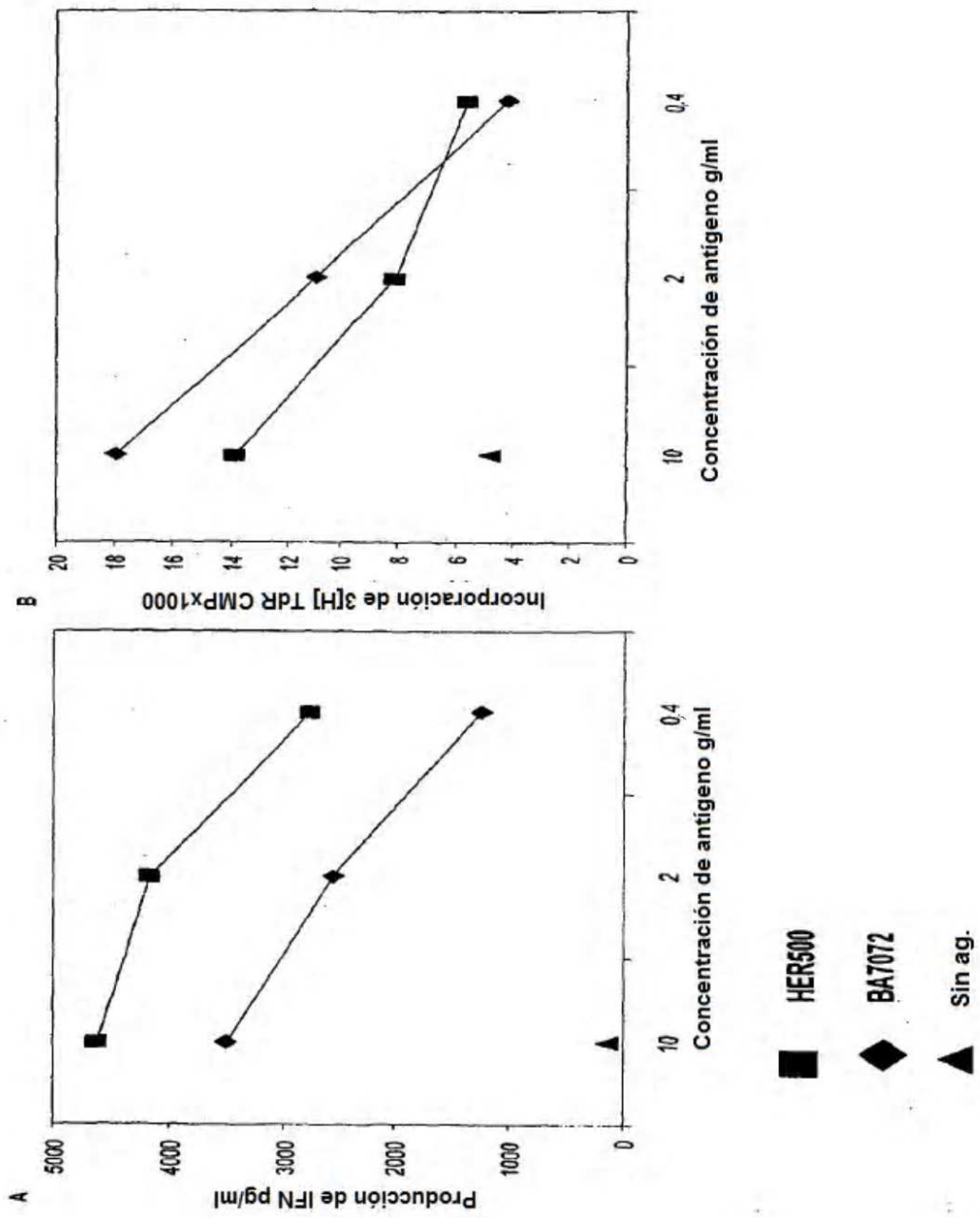


Figura 1

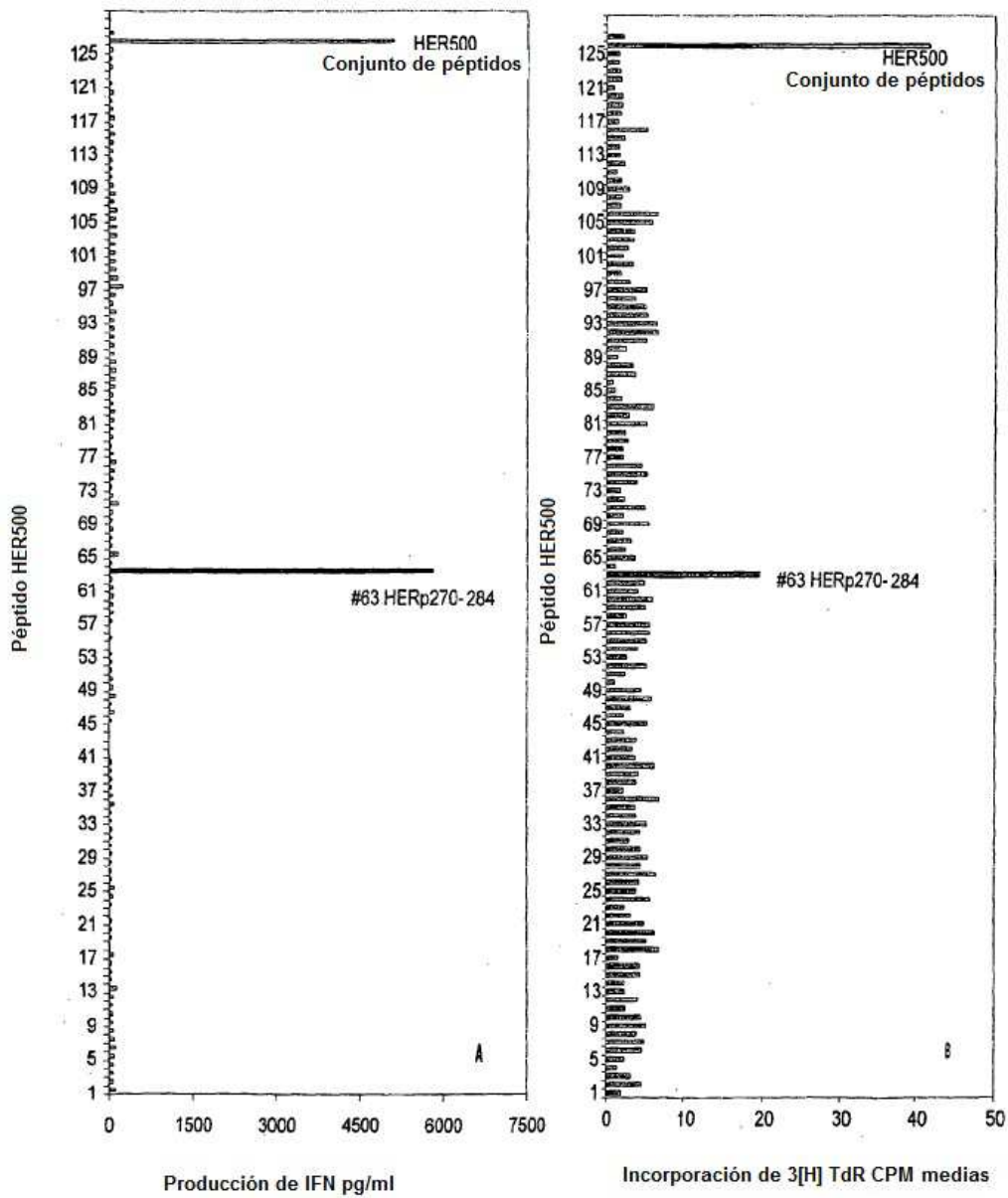


Figura 2

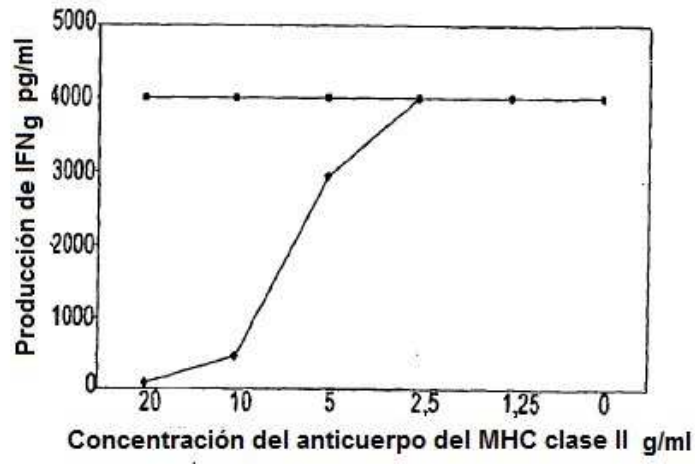


Figura 3

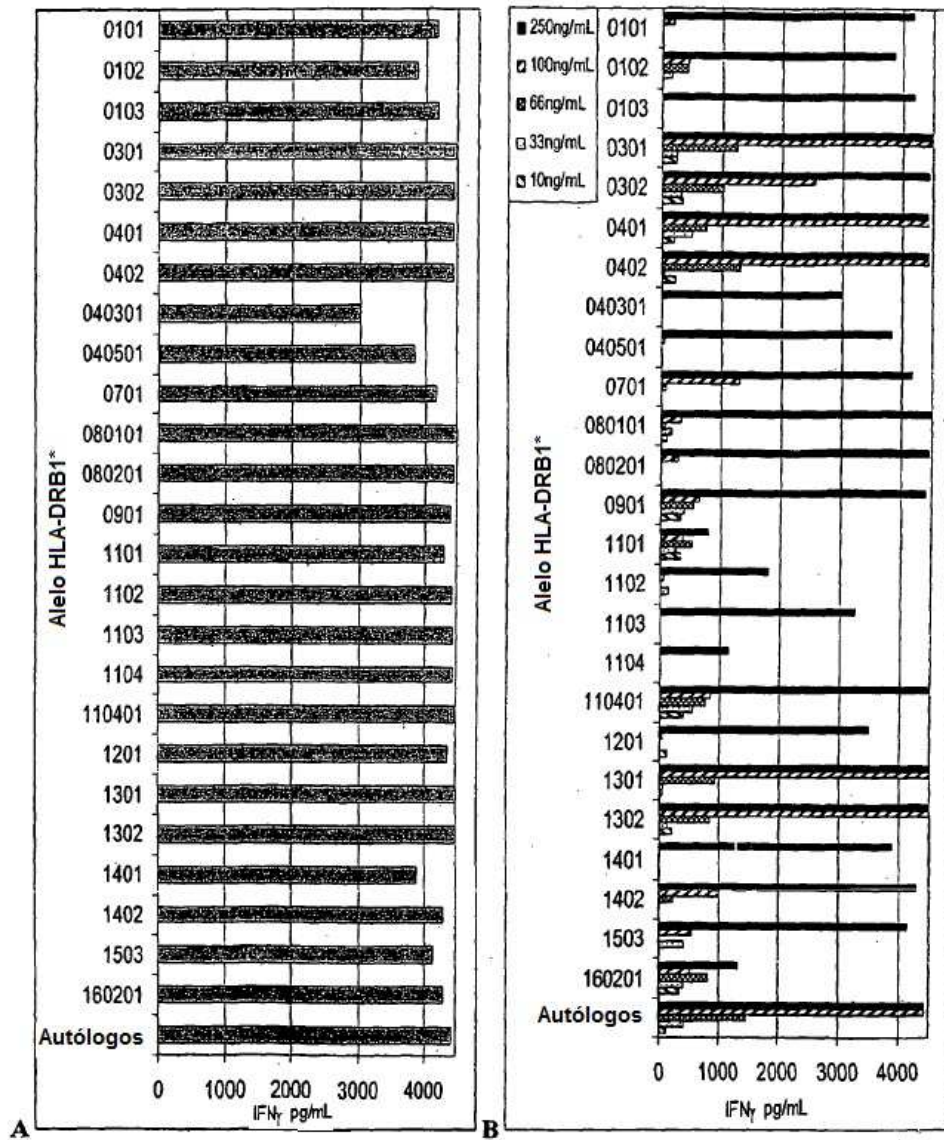


Figura 4

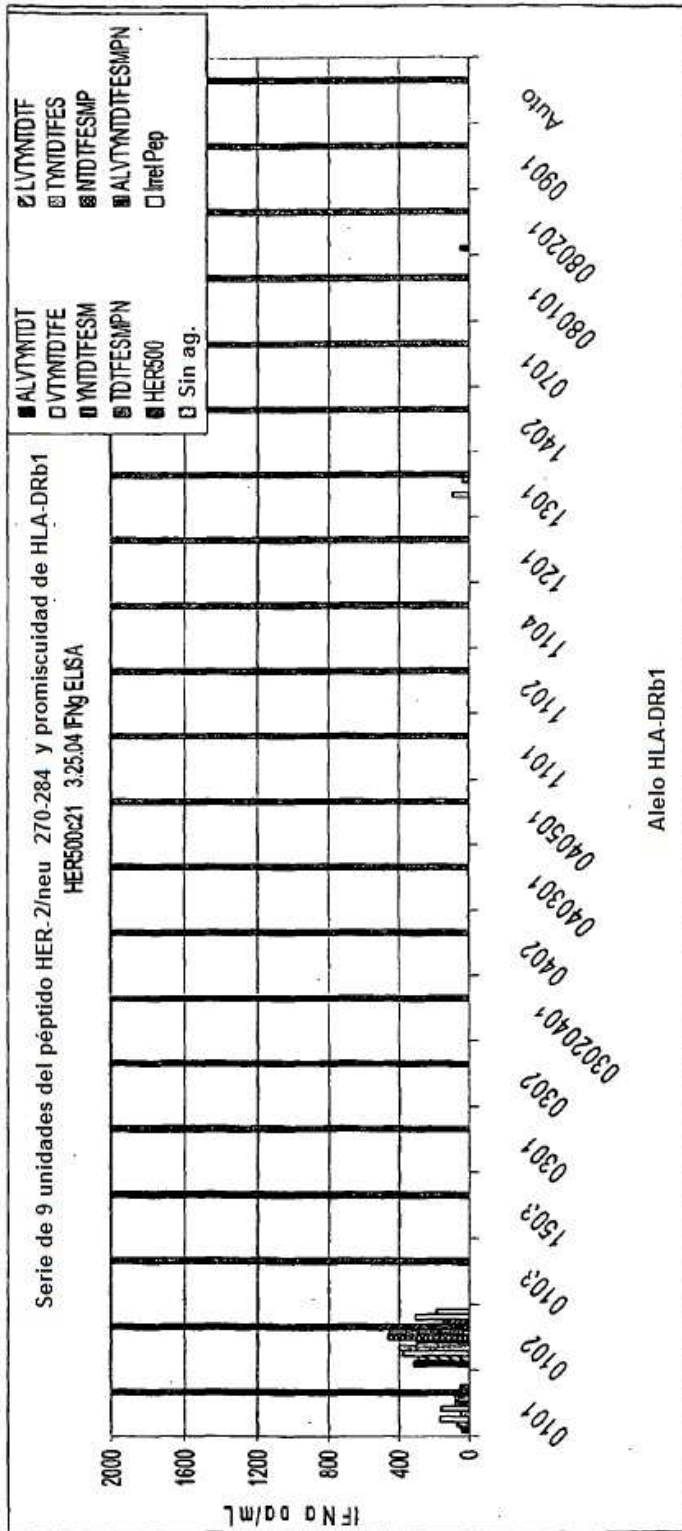


Figura 5

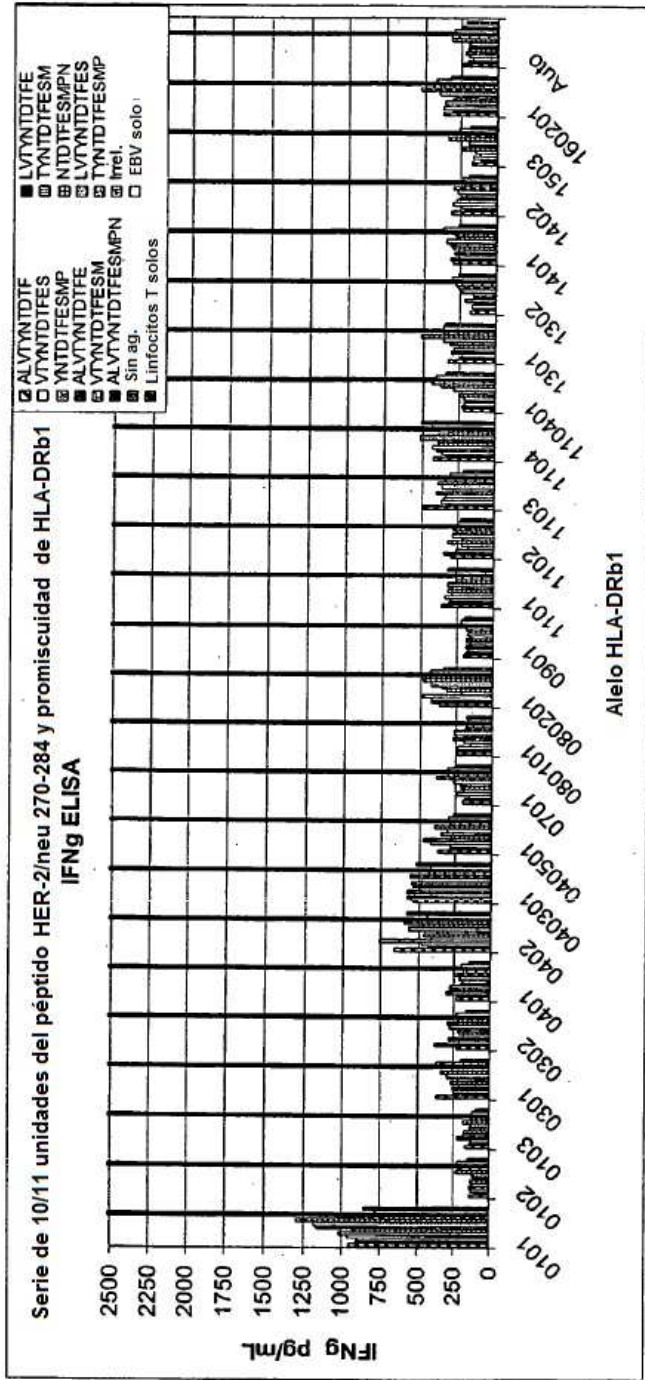


Figura 6

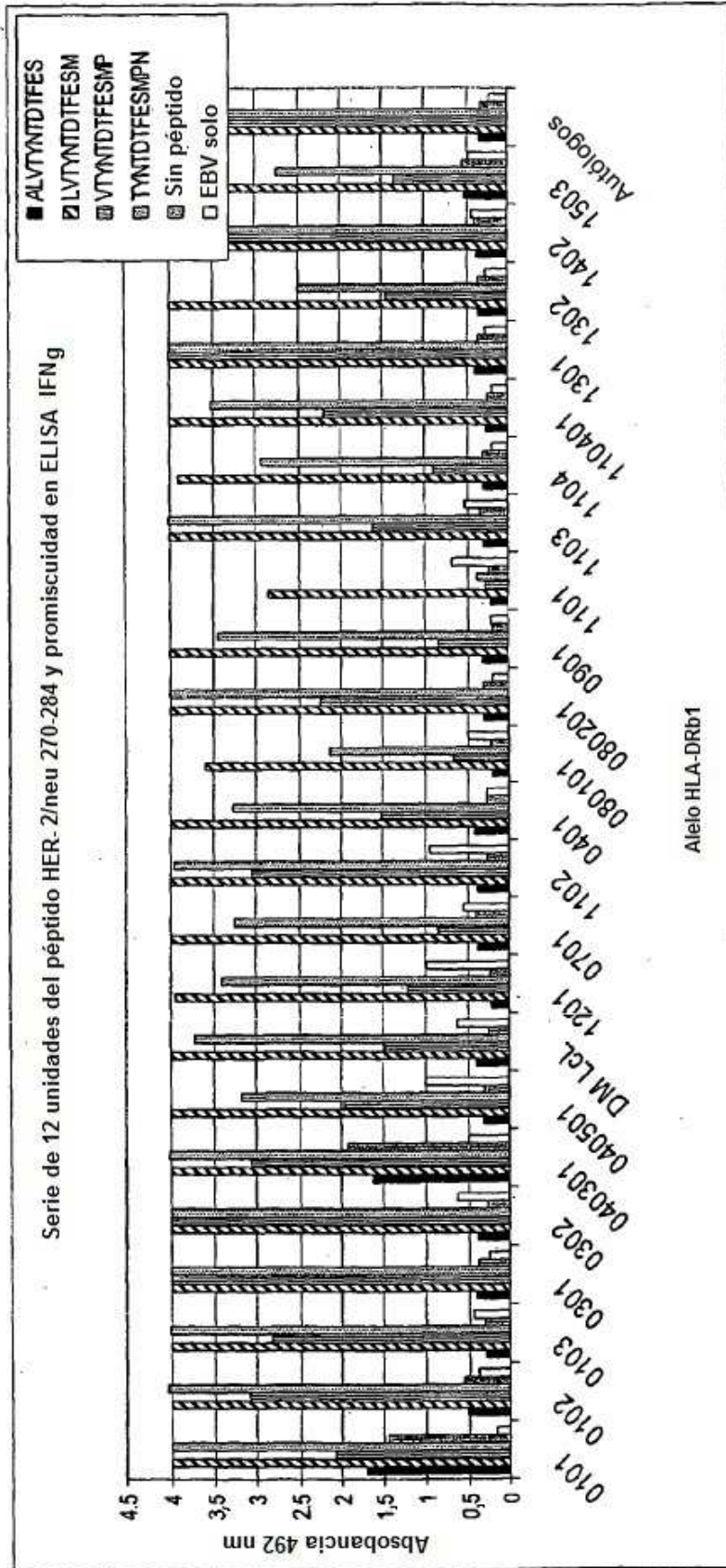


Figura 7

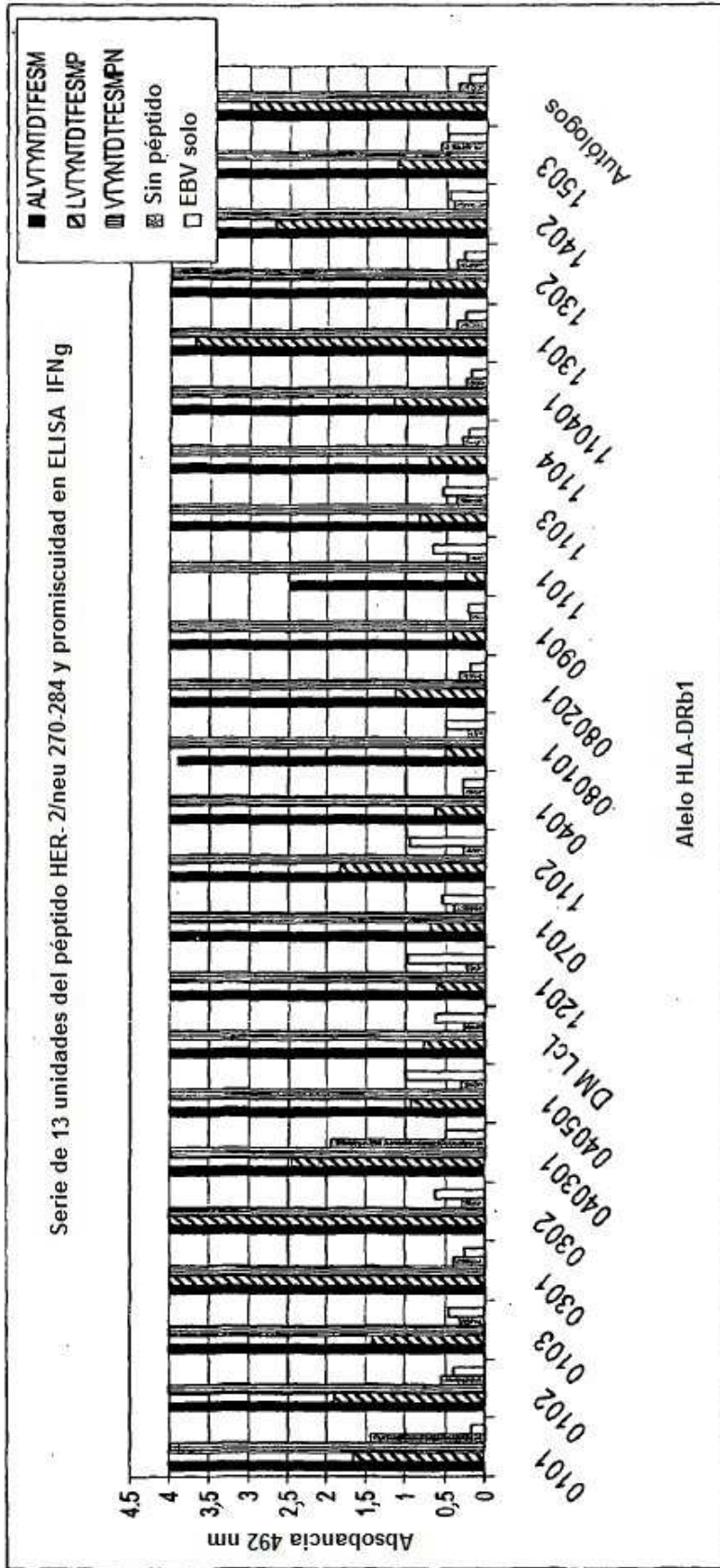


Figura 8

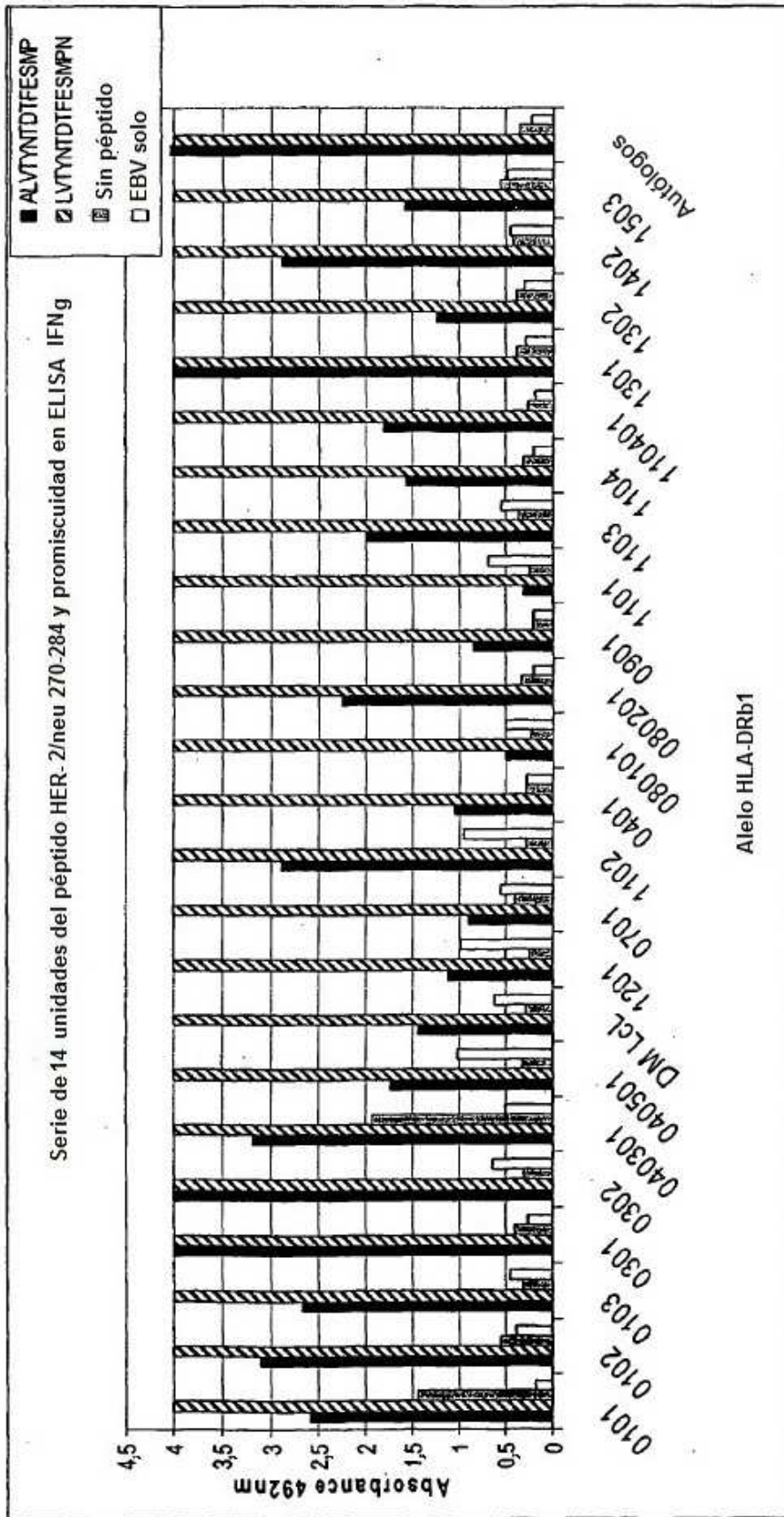


Figura 9

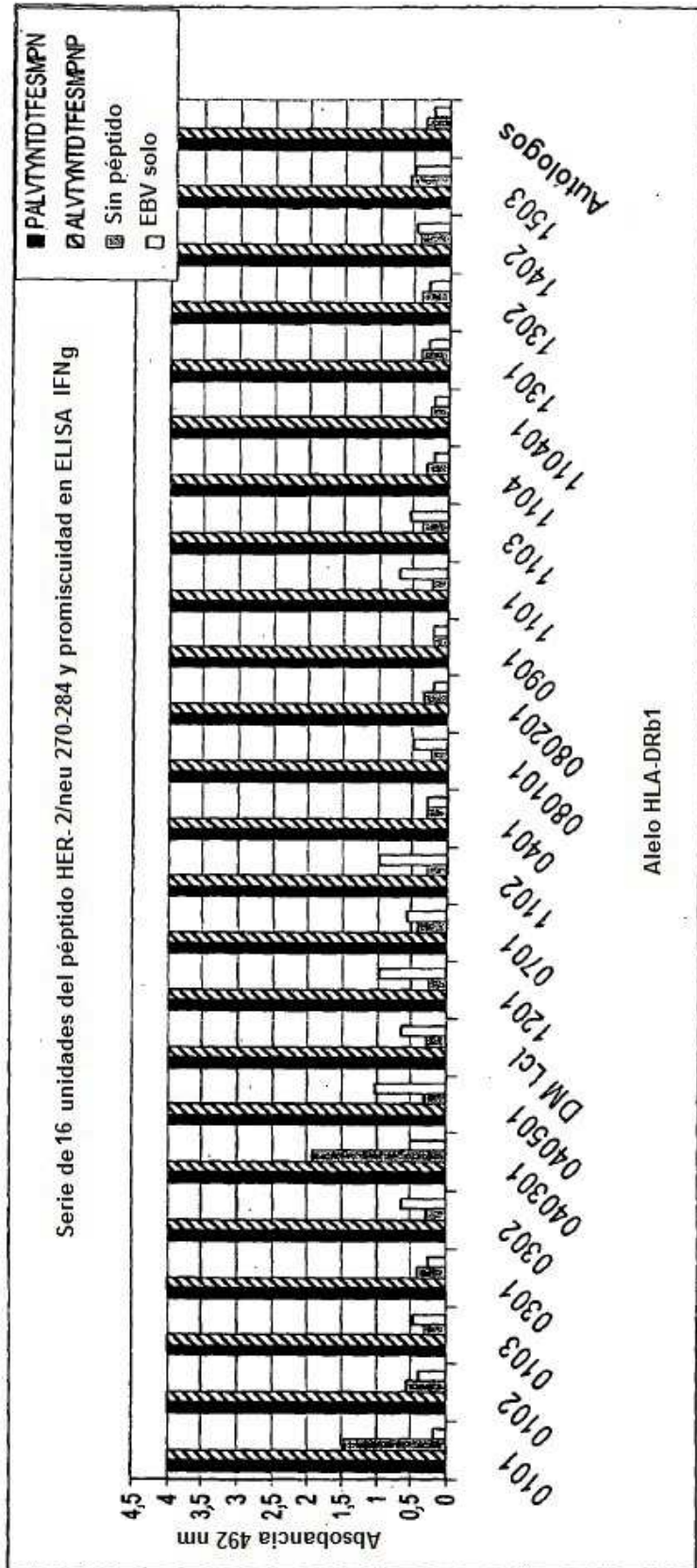


Figura 10

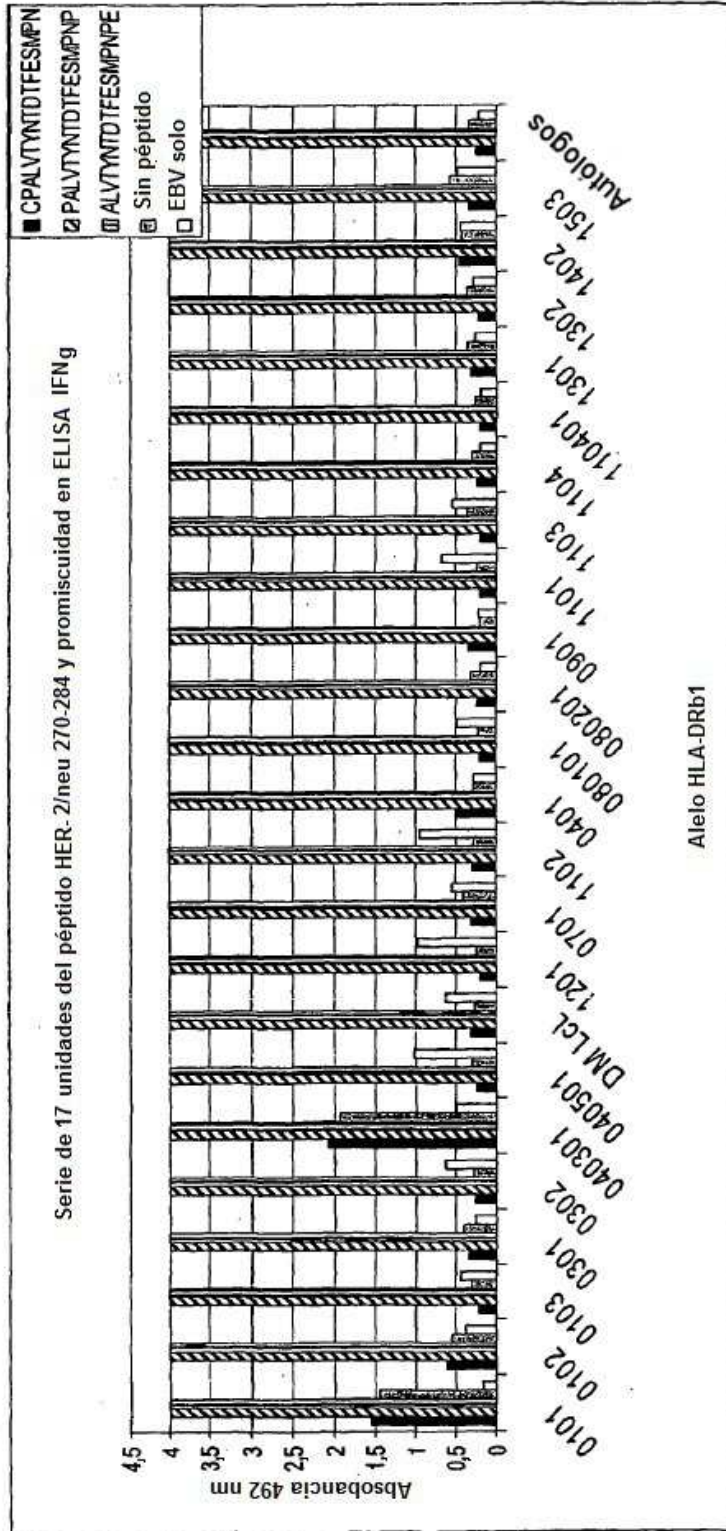


Figura 11