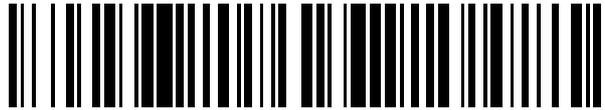


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 578**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2003 E 03767221 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1538900**

54 Título: **Vacunas contra el cáncer que contienen epítomos de antígeno oncofetal**

30 Prioridad:

02.08.2002 US 400851 P

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

05.04.2016

73 Titular/es:

**SOUTH ALABAMA MEDICAL SCIENCE
FOUNDATION (100.0%)
BOX U1060
MOBILE, AL 36688-0002, US**

72 Inventor/es:

**COGGIN, JOSEPH, H., JR.;
ROHRER, JAMES, W. y
BARSOUM, ADEL, L.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 578 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

Vacunas contra el cáncer que contienen epítomos de antígeno oncofetal

Antecedentes de la invención

5 El cáncer es una de las tres principales causas de muerte en los países industrializados. A pesar de que el tratamiento y las medidas preventivas para las enfermedades infecciosas y las enfermedades cardiovasculares continúan mejorando, y el promedio de esperanza de vida aumenta, es probable que el cáncer se convierta en la enfermedad mortal más común. En los países desarrollados, aproximadamente una de cada tres personas recibe un diagnóstico de cáncer durante su vida y casi una de cada cuatro fallece por el mismo.

10 El cáncer es el crecimiento progresivo de la progenie de una única célula transformada. Un tumor o neoplasia es una población de células que exhibe una proliferación incontrolada independientemente de los requisitos corporales normales. Una neoplasia maligna o cáncer es aquel que amenaza la vida invadiendo, destruyendo tejido adyacente y/o sembrando (metástasis) en sitios distantes. Los tumores malignos se clasifican en carcinomas (que se generan por células precursoras epiteliales), sarcomas (que se generan en gran parte por tejidos mesenquimales) y linfomas (que se generan por precursores de glóbulos rojos y blancos). Por lo tanto, la cura del cáncer requiere que todas las células malignas se eliminen o destruyan sin matar al paciente. Desafortunadamente, la manifestación evidente y la presentación clínica inicial del cáncer ocurren generalmente en un estadio tardío en el proceso de la enfermedad cuando ya se ha desencadenado la capacidad de invasión. En el momento del diagnóstico, un elevado porcentaje de pacientes tienen metástasis ocultas o incluso clínicamente detectables. Desgraciadamente, se ha limitado la capacidad de los enfoques citotóxicos convencionales para enfrentar con éxito esta enfermedad avanzada, acelerada (1,2). A diferencia de la breve duración entre la presentación de la enfermedad y la metástasis establecida, el periodo de transición de la enfermedad hiperproliferativa, pero no invasiva (3-5) a cáncer invasivo puede ser de 10 o más años en los seres humanos. Para el cáncer de mama, se estima que este periodo medio es 6 años (3,4).

25 Un problema importante que afrontan los investigadores del cáncer en el desarrollo de armas inmunológicas contra esta enfermedad es simplemente que estas células se asemejan bastante a los linajes normales de los cuales se generan. Por consiguiente, a pesar de los grandes avances en la comprensión de los factores que conducen al desarrollo del cáncer, el progreso en la gestión clínica del cáncer sigue siendo limitado. Ello se debe, en gran parte, al éxito limitado de la terapia convencional en el tratamiento de la metástasis.

30 Las investigaciones iniciales revelaron que los tumores en ratones mostraron moléculas que dieron lugar al rechazo de las células tumorales cuando se trasplantaron en animales singénicos (es decir, genéticamente idénticos). Estas moléculas se "reconocen" por linfocitos T del animal receptor, y provocan una respuesta de linfocitos T citolíticos con lisis de las células trasplantadas. Esta evidencia se obtuvo en primer lugar con tumores inducidos por carcinógenos químicos. Se descubrió que los antígenos expresados por los tumores que provocaban la respuesta de linfocitos T son diferentes para cada tumor. Esta clase de antígenos se conoce como "antígenos de trasplante específicos de tumor" o "ATETs". Una vez realizada la observación de la presentación de dichos antígenos cuando se indujeron por carcinógenos químicos, se obtuvieron resultados similares cuando los tumores se indujeron por radiación ultravioleta. Véase Kripke, *J. Natl. Canc. Inst.* 53:333-336 (1974).

40 Se ha reconocido que una clase de antígenos está presente en la superficie de las células tumorales y se reconocen por linfocitos T citolíticos, provocando la lisis de células tumorales. Esta clase de antígenos inmunogénicos que despiertan reacciones inmunitarias mediadas por linfocitos T en el huésped portador de un cáncer se conoce como "antígenos de rechazo tumoral" o "ARTs". El grado en que se ha estudiado estos antígenos, ha sido a través de los estudios de caracterización de linfocitos T citolíticos *in vitro*, es decir, el estudio de la identificación del antígeno por un subconjunto de un linfocito T citolítico particular (en lo sucesivo "LTC"). El subconjunto prolifera en el reconocimiento del antígeno de rechazo tumoral expuesto, y se lisan las células que expresan los antígenos de rechazo tumoral. Los estudios de caracterización han identificado clones de LTC que lisan de manera específica células que expresan los antígenos de rechazo tumoral. Ejemplos de este trabajo pueden hallarse en Levy, y col., *Adv. Cancer Res.* 24:1-59 (1977); Boon, y col., *J. Exp. Med.* 152:1184-1193 (1980); Brunner, y col., *J. Immunol.* 124:1627-1634 (1980); Maryanski, y col., *Eur. J. Immunol.* 124:1627-1634 (1980); Maryanski, y col., *Eur. J. Immunol.* 12:406-412 (1982); Palladino, y col., *Canc. Res.* 47:5074-5079 (1987).

50 El sistema inmunitario responde a las células cancerosas de forma complicada. Existen dos tipos principales de células inmunitarias que desempeñan un papel importante en la lucha contra la enfermedad: los linfocitos B ("células B") (o derivados de la médula ósea) producen anticuerpos en antígenos extraños (que constituyen la parte del sistema inmunitario conocida como inmunidad humoral); y los linfocitos T ("células T") (o derivados del timo) se implican en la inmunidad mediada por células. Existen tres subclases principales de linfocitos T, a saber, linfocitos auxiliares, linfocitos citotóxicos y linfocitos supresores referidos a menudo como linfocitos Th CD4, linfocitos Tc CD8 y linfocitos Ts CD8, respectivamente, debido a su reactividad con un grupo ("agrupación") de anticuerpos monoclonales específicos en un marcador superficial que identifica un estadio de linaje o diferenciación particular. Por consiguiente, se definen todos los antígenos superficiales de los leucocitos cuyas estructuras proporcionan una designación "GD" (grupo de diferenciación), es decir, CD4 y CD8, respectivamente. La presencia de un ART en una

célula tumoral se reconoce por los linfocitos T y las células procesadoras de antígeno como un antígeno "no propio" o extraño. Los linfocitos T reaccionan con antígenos extraños a través de receptores en sus superficies. El sistema inmunitario humano contiene millones de clones de linfocitos T, cada uno de los cuales presenta receptores superficiales distintivos. Las propiedades físicas de estos receptores confieren capacidades de unión específica y permiten que cada uno de los varios millones de clones de linfocitos T en un individuo funcione de forma independiente. El receptor de linfocitos T es capaz de reconocer un antígeno particular solo cuando se asocia con un marcador superficial en una célula presentadora de antígeno (CPA), tal como una célula dendrítica o un macrófago. Los marcadores superficiales pertenecen a un grupo de moléculas conocido como el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). En el contexto del cáncer se explica que un antígeno de rechazo tumoral se adquiere y se procesa por CPA. La CPA procesa la proteína antigénica en péptidos más cortos denominados epítomos que oscilan generalmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 aminoácidos de longitud. Si los péptidos están presentes sobre las proteínas del CMH de clase I en los linfocitos T CD8, entonces los epítomos poseen por lo general aproximadamente 8 aminoácidos de longitud. Si los péptidos están presentes sobre las moléculas del CMH de clase II en los linfocitos T CD4, entonces los epítomos poseen por lo general 9-12 aminoácidos de longitud. La unión del receptor del linfocito T al epítomo del antígeno en la célula presentadora de antígeno induce cambios en el linfocito T que desencadena una respuesta inmunitaria mediada por células.

Dos señales son principalmente responsables de la inducción de la respuesta mediada por linfocitos T a una CPA asociada con un epítomo de un antígeno. Una primera señal se produce a partir de la reticulación para la unión de los receptores de linfocitos T con el epítomo: complejo de proteína del CMH. Una segunda señal coestimuladora se envía por moléculas de la membrana "accesorias" en la CPA cuando se unen mediante sus receptores a la respuesta del linfocito T. Posteriormente a la activación resultante de linfocitos T se produce la secreción de mensajeros intercelulares solubles, conocidos genéricamente como "citoquinas", que regulan la amplitud o intensidad y duración de la respuesta inmunitaria. Las citoquinas incluyen el grupo de biomoléculas conocido con anterioridad como linfoquinas, monoquinas, interleucinas e interferones (*Essential Immunology*, séptima edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Gran Bretaña, 1991, págs. 140-150). De esta manera, los linfocitos T citotóxicos, que reconocen y son específicos al antígeno de rechazo tumoral, se estimulan y atacan a las células tumorales que expresan el antígeno.

Los tumores malignos se han tratado con agentes quimioterapéuticos que deterioran directamente las células tumorales o con agentes inmunoterapéuticos que causan activación no específica de la inmunidad de un huésped. En los últimos años, los investigadores que utilizan tumores de animales, principalmente ratones, han revelado que los tumores pueden curarse por completo potenciando una respuesta inmunitaria específica de antígeno en los antígenos relacionados con el tumor y/o antígenos específicos del tumor presentes en diversas células tumorales. El tratamiento se ha realizado en la clínica potenciando la respuesta inmunitaria específica de antígeno en estos antígenos específicos del tumor. No obstante, se sabe ahora, que la respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T actúa ya sea de manera protectora o de una manera supresora dependiendo de si se activan los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T supresores. Por consiguiente, las células tumorales pueden modular la inmunidad antitumoral mediante la expresión de antígenos que activan preferentemente los linfocitos Ts o mediante la secreción de citoquinas que suprimen o inducen directamente la secreción de citoquinas supresoras por linfocitos T. Es decir, los linfocitos T CD8 activados o bien reconocen y destruyen la célula tumoral que transporta el epítomo apropiado en su molécula del CMH de clase I, o reconocen y se vuelven tolerantes a la célula tumoral, en función del tipo de linfocito CD8 estimulado, citotóxico o supresor, respectivamente.

Se ha demostrado que la inmunización activa con algunos antígenos tumorales o las mismas células tumorales autólogas irradiadas en animales de laboratorio induce inmunidad mediada por linfocitos T que protege a los ratones inmunizados de la exposición posterior con células tumorales histocompatibles (6-8). Parece ser que en varios estudios preclínicos (9), la destrucción inmunológica de tumores emergentes debido al reconocimiento de linfocitos T de antígenos tumorales involucra linfocitos T citotóxicos (Tc) CD8⁺, pero los linfocitos T auxiliares 1 (Th1) CD4⁺ también han demostrado ser importantes (10). En los últimos años, se ha identificado un número de estos antígenos (8, 11) que parece estar codificado por genes con expresión específica del tumor, expresado en las células normales, pero que ha desarrollado mutaciones puntuales en la célula tumoral, 3) para los antígenos de diferenciación, o 4), que se sobreexpresa en ciertos tumores (12, 13). Muchos de estos marcadores antigénicos tumorales no servirán como autoinmunógenos cuando se expresan en el huésped y, por lo tanto, no provocan respuestas protectoras de linfocitos T (11, 14). Normalmente no se espera que los antígenos de diferenciación eleven una respuesta inmunitaria debido a la delección clonal de linfocitos T autorreactivos. En algunos casos, lo hacen puesto que el sitio de expresión normal de estos genes se encuentra en los tejidos inmunoprivilegiados, tales como los testículos o el ojo (11).

El antígeno tumoral ideal para su uso en una vacuna o al que se dirige la inmunoterapia sería aquel presente en todos los tipos de tumores, ausente o enmascarado en tejidos normales, evolutivamente conservado, y su función requiere la malignidad de las células tumorales. Dicho inmunógeno presenta menos posibilidades en reducirse o mutarse de manera óptima y aún presenta células tumorales que crecen y metastatizan. Por consiguiente, si las células tumorales utilizan dichos mecanismos para evadir la respuesta inmunitaria en ese inmunógeno (15), las células tumorales reducirían su capacidad de desarrollarse.

Los solicitantes descubrieron que las células tumorales expresan un antígeno común que originalmente se denominó

antígeno oncofetal (AOF). Esta proteína se detectó en el inicio o intermedio de la gestación de células fetales, de ahí el término "antígeno oncofetal". Se compone de una única cadena polipeptídica de 295 aminoácidos y presenta un peso molecular de aproximadamente 37-44 kDa. Los solicitantes identificaron que AOF era un antígeno de trasplante específico de tumor universal ya que se detectó en tumores de roedores inducidos por productos químicos o por irradiación. Todos los tumores que los solicitantes han ensayado demostraron expresar AOF (1, 43, 44). Los tumores incluyen sarcomas inducidos química y viralmente, linfomas de linfocitos T inducidos por irradiación de rayos x, y muchos tumores de roedores endogámicos referidos por otros para expresar solo un único ATET no compartido. Además de los tumores en roedores, se han ensayado aproximadamente 500 tumores en humanos representando la mayor parte de los tipos de cáncer, todos descubiertos para expresar AOF (43-45). Por ejemplo, AOF también se expresa por carcinomas de mama, riñón, pulmón, colon, mucosa gástrica, laringe, faringe, ovario y próstata mientras que los tejidos normales de los mismos tipos no expresan AOF (43-45). Se cree que AOF desempeña un papel importante en la progresión del tumor y se ha implicado en la invasividad, la metástasis y el crecimiento del tumor.

Recientemente se ha clonado el antígeno oncofetal. Los alineamientos de secuencias de ADN complementario han puesto de manifiesto una identidad al 99 % con otra proteína humana llamada proteína del receptor de laminina inmadura (PRLi). Por tanto, se cree que estas dos proteínas son idénticas. (En lo sucesivo, el término "AOF", "PRLi", "AOF/PRLi" y "PRLi/AOF" se utiliza indistintamente). La forma madura de este receptor de laminina parece ser un dímero de una proteína del receptor de laminina inmadura (PRLi) acilada de 32 kDa (16). Aunque la forma madura de 67 kDa se encuentra en muchas células normales así como en células tumorales, parece haber una expresión preferencial de la PRLi de 32 kDa por las células fetales y tumorales (17, 18). La PRLi se conserva evolutivamente (19). De hecho, la secuencia de aminoácidos de la PRLi humana difiere de la PRLi murina en solo cuatro aminoácidos (20).

La invasión tumoral de los tejidos huésped y la penetración trofoblástica del endometrio comparten características biológicas comunes. Ambos procesos implican la invasión de la membrana basal, un acontecimiento que se inicia por la adhesión de las células cancerosas o trofoblásticas a los componentes de la membrana basal y en particular a la laminina. La adhesión a la laminina se media por diversos receptores de la superficie celular. Otros investigadores (Van den Brule FA, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:388-393 (1994)), han demostrado que el receptor de laminina de 67 kD (RL67) y la galectina-3 se modulan inversamente cuando el fenotipo invasivo de las células cancerosas progresa, con un aumento del primero, y una disminución del último, respectivamente. Estos investigadores descubrieron que los niveles de expresión de RL67 en el feto aumentaron a partir de la 7ª semana de gestación hasta un máximo en la 12ª semana, cuando la invasión es máxima, y luego disminuyó. La expresión de galectina-3 se moduló inversamente por la edad gestacional, con una expresión mínima en la 12ª semana de gestación. Un año antes (1993), y 6 años antes de nuestra identificación del antígeno oncofetal como PRLi, los solicitantes informaron (en Coggin y col., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119:1257-1266 (1993)) que en base a los resultados de citometría de flujo que utiliza diferentes cepas de ratones, la proporción de células que expresan AOF aumentó gradualmente durante la vida gestacional del feto para alcanzar sus niveles máximos (29 % de las células) en la mitad de la gestación (día 13) y posteriormente se redujo gradualmente a 5 % en el día 18, mientras que los ratones recién nacidos no mostraron aumento alguno de los niveles de expresión de AOF.

La transición del crecimiento tumoral *in situ* a una enfermedad metastásica se define por la capacidad de las células tumorales del sitio primario en invadir tejidos locales y cruzar las barreras de los tejidos. Para iniciar el proceso metastásico, las células cancerosas deben adherirse a los componentes de la matriz extracelular (MEC), secretar proteasas que digieren la matriz densa de colágeno tipo IV, glicoproteínas y proteoglicanos que les permite invadir el estroma intersticial y responder a factores que inducen la motilidad de las células invasivas (21). Para las metástasis distantes, la intravasación requiere la invasión de células tumorales de la membrana basal subendotelial de los vasos sanguíneos utilizando los mismos mecanismos (22). Varios experimentos publicados han sugerido que la interacción de las células tumorales con el componente de laminina de la MEC es importante en la expresión del fenotipo metastásico (23, 24). Tras la unión de la laminina mediante la forma inmadura del receptor de alta afinidad de laminina (PRLi), se potencian su expresión y la de la integrina $\alpha 6 \beta 1$ o 4 para la unión a laminina (25, 26). Por consiguiente, se ha potenciado la estabilidad de la unión a laminina por las células tumorales. Además de esto, la misma etapa induce la producción y la secreción de las metaloproteinasas de la matriz de la colagenasa IV (27, 28) necesarias para la digestión de la MEC para permitir que se produzca la metástasis. El aumento de la expresión de la colagenasa IV se observa en adenocarcinomas colónicos, gástricos, de ovario y tiroideo invasivos, mientras que los trastornos proliferativos benignos de mama, colon y de la mucosa colorrectal y gástrica normal apenas poseen o no tienen tinción para estas proteasas (29,30). El aumento de la expresión de PRLi también se observa en una amplia variedad de adenocarcinomas humanos, incluidos los de colon, mama, estómago e hígado (29, 31). La sobreexpresión de la PRLi se asocia con un mal pronóstico en varios tipos de tumores (32-35). En el carcinoma de mama, la sobreexpresión de la PRLi se correlaciona con la temprana diseminación de las células tumorales en la médula ósea que enfatiza aún más el papel de la PRLi en el proceso metastásico (36). La administración experimental del anticuerpo anti-PRLi o anticuerpo anti-laminina en el momento de la inyección de células tumorales inhibe la metástasis del tumor (37-39).

AOF/PRLi es inmunogénico. Se han identificado linfocitos T específicos de AOF/PRLi clonados a partir de ratones irradiados como linfocitos T CD4+ tipo Th1, que producen interferón gamma, o linfocitos T citotóxicos que secretan interferón- γ . Asimismo, se inducen los linfocitos T supresores CD8+, que secretan IL-10. Además, la estimulación de

las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama con células tumorales autólogas produjo la expansión de los linfocitos T reactivos tumorales. El análisis de estos linfocitos T reactivos tumorales clonados por los solicitantes reveló que una proporción sustancial de los clones mostró reactividad contra AOF/PRLi purificado.

5 En experimentos más recientes, los solicitantes han observado que la inmunización de ratones con células tumorales singénicas que expresan PRLi dio lugar a una inmunidad protectora mediante reacción cruzada contra un espectro de tumores singénicos puesto que todos expresan PRLi (6, 7). La inmunización con PRLi:partículas de nitrocelulosa produjo inmunidad mediada por linfocitos T y B distintos en función de la dosis utilizada de PRLi. Por consiguiente, la inmunización con la proteína de PRLi intacta puede inducir linfocitos T efectores o reguladores en
10 función de la dosis utilizada.

El AOF/PRLi también activa los linfocitos T_s . Secretan IL-10. Los linfocitos T_s previenen que los linfocitos T_c exhiban actividad citotóxica contra las células tumorales. Una vez que la concentración de PRLi alcance una determinada concentración óptima, se inducen los linfocitos T_s que producen IL-10 que impide que los linfocitos T_c destruyan las células tumorales diana positivas de antígeno. Este fenómeno causado por un exceso de inmunógeno en linfocitos
15 T, AOF de 37-44 kDa, permite que el sistema inmunitario suprima la inmunidad mediada por T_c . En otras palabras, es una medida controlada inmunorreguladora que evita la sobreproducción de linfocitos T_c en cualquier antígeno T_c . Esta inmunorregulación impide la autoinmunidad mediada por T_c y otra autoinmunidad.

Rohrer y col. (40) demostraron que los supervivientes a largo plazo sin tumor aparente de irradiación con rayos x fraccionada, subletal habían desarrollado linfocitos Th1 y T_c de memoria específica de PRLi a pesar de que no mostraron signo alguno de desarrollo de linfoma. Aproximadamente, la mitad de los ratones RFM que se irradiaron murieron en un plazo de 6 meses tras la irradiación de linfoma tímico metastásico (41). Además de los linfocitos Th1 y T_c efectores de memoria inducidos por PRLi durante el desarrollo del tumor, los linfocitos T $CD8^+$ específicos de PRLi no citotóxicos, que secretaron IL-10 tras la estimulación de antígeno también se clonaron a partir de esos ratones RFM supervivientes a largo plazo de la radiación (40, 42). La IL-10 inhibió la actividad de T_c (42) y así estas células pueden reducir la inmunidad anti-tumoral de cualquier especificidad. Se sugiere que el tiempo de aparición y/o el número relativo de linfocitos T $CD8$ que secretan IL-10 en comparación con el de los linfocitos T_c específicos de PRLi puede haber sido un factor en la determinación de si un ratón RFM irradiado desarrolló un linfoma tímico y murió tras la posterior irradiación con rayos x (43). A este respecto, los solicitantes han observado que durante el desarrollo de carcinoma de células renales o de mama en los seres humanos, los linfocitos Th1 específicos de PRLi, T_c , y T (T_s) $CD8^+$ que secretan IL-10, se clonaron a partir de la sangre periférica de los pacientes (44, 45). Consistentes con su visión de la contribución de los linfocitos T_s a la progresión del tumor (43), los solicitantes también han descubierto que los pacientes que padecen cáncer de mama con la mayor relación de linfocitos T_s específicos de PRLi: T_c requirieron una segunda cirugía debido a la recurrencia tumoral (44). Por consiguiente, la frecuencia de los linfocitos T_s específicos de PRLi que secretan IL-10 en pacientes que padecen cáncer puede utilizarse como pronóstico de la respuesta clínica a la terapia (44). Dichos procedimientos son un sujeto de la patente de Estados Unidos n.º 6.335.174.
20
25
30
35

Por consiguiente, pese al uso de AOF/PRLi para la terapia contra el cáncer y como una vacuna prometidora, se atenúa la posibilidad de que tales usos también desencadenen la inmunorregulación mediada por T_s . En este sentido, Rohrer y col., *Mod. Asp. Immunobiol.* 1(5):191-195 (2001), señalan que es importante definir los epítomos peptídicos que estimulan los linfocitos T_c específicos de PRLi/AOF, Th y T_s que secretan IL-10 con el fin de determinar si los epítomos que estimulan los linfocitos T_s son diferentes y sitúan en una parte diferente de la proteína de AOF que los epítomos que estimulan los linfocitos T_c y/o Th.
40

Sumario de la invención

Aparte de la especulación en la publicación de Rohrer, los hechos siguen siendo que los linfocitos T_c específicos de AOF/PRLi y T_s son linfocitos T $CD8$ y que con la excepción del espectro de citoquinas que producen, sus capacidades funcionales son básicamente iguales. Los solicitantes también han demostrado que los linfocitos T_s muestran actividad citotóxica similar a T_c en presencia de anticuerpos anti-IL-10 (que neutralizan la IL-10 secretada por los linfocitos T_s). Además, la publicación de Rohrer también demostró que la estimulación relativa de los linfocitos T_c y T_s por AOF/PRLi en ratones era dependiente de la dosis; ya que los linfocitos T_s poseen receptores con menor afinidad para el antígeno de linfocitos T (RALT) en comparación con los RALT en los linfocitos T_c , los linfocitos T_c respondieron a dosis significativamente inferiores de AOF/PRLi que los linfocitos T_s . Estos hallazgos sugirieron que la cantidad de dosificación (en lugar del propio epítomo) es una variable importante en la potenciación de una respuesta inmunitaria sin estimular los linfocitos T_s . A partir de estos hechos y observaciones, los expertos en la materia esperaban que los linfocitos T_c y T_s fuesen reactivos en el mismo espectro de epítomos de AOF.
45
50

Los solicitantes han descubierto ahora fragmentos de AOF distintos, no superpuestos que contienen epítomos que estimulan una clase o subclase de linfocitos T contra otras clases. Un aspecto de la presente invención se dirige a epítomos de AOF que estimulan de manera específica linfocitos T_c . Otro aspecto de la presente invención se dirige a epítomos de AOF que estimulan de manera específica linfocitos T_s . Otro aspecto de la presente invención se dirige a epítomos de AOF que estimulan de manera específica linfocitos Th. También se proporcionan ADN que codifican los fragmentos y epítomos de AOF, y procedimientos de fabricación de epítomos.
55
60

Otro aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para identificar epítomos de AOF mamífero que estimulan linfocitos T citotóxicos o linfocitos T supresores en relación con otros linfocitos T en mamíferos. El procedimiento implica a) obtener una muestra de leucocitos de sangre periférica (LSPs) o esplenocitos de un mamífero portador de un tumor; b) expandir clonalmente linfocitos T de diferentes subclases de linfocitos T presentes en la muestra y que son específicos para AOF, produciendo de este modo clones de linfocitos T de diferentes subclases de linfocitos T; c) determinar el tipo de subclase de cada uno de los clones de las subclases de linfocitos T; d) cultivar los clones de los linfocitos T de (c) en presencia de un mutante de delección de AOF; y e) comparar el alcance de la estimulación de los clones de los linfocitos T de una subclase por el mutante de delección de AOF para estimular clones de los linfocitos T de otras subclases de linfocitos T por el mutante de delección de AOF; en el que una mayor estimulación de un clon de linfocitos T de una subclase con respecto a las otras subclases de linfocitos T por el mutante de delección de AOF es indicativo de que el mutante de delección de AOF contiene un epítomo que estimula los linfocitos T de una subclase con respecto a las otras subclases de linfocitos T.

En algunas realizaciones, la muestra contiene esplenocitos obtenidos de un ratón. En otras realizaciones, el mamífero es un ser humano y la muestra comprende LSPs. En algunas realizaciones, (e) comprende comparar la estimulación de los clones de los linfocitos T de la subclase por el epítomo de AOF en dos controles, en la que el primer control comprende AOF intacto y el segundo control comprende un mutante de AOF que carece del epítomo. En otras realizaciones, (d) y (e) se repiten utilizando una pluralidad de mutantes de delección de AOF, en la que cada mutante de delección de AOF carece de una parte diferente de la molécula de AOF intacto.

Los epítomos de AOF desvelados en el presente documento resultan terapéuticamente útiles en los mamíferos. En consecuencia, un aspecto adicional de la presente invención se dirige a composiciones que contienen al menos un epítomo de AOF que estimula o induce linfocitos T citotóxicos. En realizaciones preferentes, el presente aspecto de la presente invención se dirige a una composición inmunoterapéutica, p. ej., una vacuna, que comprende o que consiste esencialmente en una pluralidad de epítomos de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos T citotóxicos, y un transportador (y en realizaciones preferentes, un transportador que también funciona como un adyuvante inmunopotenciador). Por la expresión "que consiste esencialmente en" se entiende excluir elementos que afectarían las características básicas e innovadoras de la composición, tales como su efecto inmunogénico en términos de estimulación de los linfocitos T citotóxicos con respecto a los linfocitos T supresores. Por consiguiente, los elementos que podrían excluirse de las composiciones incluyen epítomos de AOF (o regiones de la proteína de AOF que contienen dichos epítomos) que estimulan de manera específica linfocitos T supresores ya que su presencia podría causar una disminución del efecto terapéutico de la composición. Las composiciones también pueden incluir uno o más epítomos de AOF que estimulan de manera específica linfocitos Th. Las composiciones estimulan la proliferación de los linfocitos Tc específicos de AOF, potenciando así la inmunidad mediada por linfocitos T en pacientes mamíferos que padecen cáncer, lo que puede inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas y/o inducir inmunidad.

Un aspecto adicional de la presente invención se dirige a procedimientos para fabricar una vacuna o composición inmunoterapéutica. El procedimiento implica (a) identificar una pluralidad de epítomos de antígeno oncofetal (AOF) que estimula de manera específica linfocitos T citotóxicos en el mamífero (p. ej., ser humano); y (b) formular dos o más de los epítomos identificados en (a) con un transportador, formando así la composición inmunoterapéutica. En otras realizaciones, el procedimiento implica además c) identificar una pluralidad de epítomos de antígeno oncofetal (AOF) que estimula de manera específica linfocitos T auxiliares en el mamífero (p. ej., ser humano), y en el que b) comprende formular uno o más de los epítomos de AOF identificados en c) con los dos o más epítomos identificados en a), junto con el transportador. Los epítomos de AOF de la presente invención que estimulan de manera específica linfocitos Tc y, opcionalmente, los epítomos de AOF que estimulan de manera específica linfocitos Th pueden administrarse a pacientes que padecen cáncer, preferentemente entre sí en forma de una composición. Por consiguiente, la presente invención proporciona además un procedimiento de tratamiento del cáncer en un mamífero, mediante la administración a un paciente que padece cáncer de al menos uno y preferentemente una pluralidad de epítomos de antígeno oncofetal (AOF) que estimula de manera específica linfocitos T citotóxicos en el mamífero, y opcionalmente, uno y preferentemente una pluralidad de epítomos de antígeno oncofetal (AOF) que estimula de manera específica linfocitos T auxiliares en el mamífero. Un aspecto relacionado de la invención se dirige a un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en un paciente mamífero que padece cáncer que comprende administrar al paciente que padece cáncer una cantidad inmunogénica de una composición descrita en el presente documento. Los epítomos de AOF de la presente invención proporcionan un enfoque perfeccionado, personalizado para estimular de forma selectiva el sistema inmunitario para potenciar la actividad celular anti-tumoral citotóxica. Las realizaciones de la presente invención resultan útiles para reducir la inmunorregulación asociada a la estimulación de los linfocitos T supresores causada por AOF/PRLi intacto, permitiendo así que los linfocitos T citotóxicos continúen organizando un ataque contra las células tumorales, especialmente cuando la carga tumoral aumenta.

Descripción detallada de la invención

A continuación se muestra un alineamiento de la secuencia de ADNc completo de AOF de 37 kDa de fibrosarcoma murino MCA-1315 con la secuencia de nucleótidos de la PRLi murina (referido en Rao, y col., *Biochemistry* 28:7476-7480 (1989)). El aminoácido predicho se indica en la secuencia de nucleótidos. El codón de terminación se indica mediante un asterisco. Las secuencias de nucleótidos de minúscula que preceden al extremo 5' y después al

extremo 3' son sitios *SalI* y *NotI*, respectivamente, utilizados en la clonación. Se subrayan las secuencias de aminoácidos de los dos péptidos (restos aa 18-40 y 43-52) obtenidas a partir de AOF purificado por afinidad de AM115. El alineamiento de la secuencia reveló una identidad al 99,5 % entre la secuencia de nucleótidos de AOF y la secuencia de nucleótidos publicada para PRLi murina. La secuencia de aminoácidos predicha de AOF y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de PRLi murina eran idénticas al 99,3 %. Las únicas diferencias eran los restos de aminoácidos 18 y 155 que eran fenilalanina y arginina para AOF en lugar de leucina y alanina en la secuencia de aminoácidos publicada de PRLi murina, respectivamente, aunque eran idénticas a las de la secuencia de PRLi humana.

```

gtcgacCCACGCGTCCGCTACCCGG                               -85
      GGACGGGTCCATACGGCGTTGTTCTTGATTCCCATCGTAACTTAAAGGGAAACTTACACA
      -60

AOF      ATGTCCGGAGCCCTTGACGTCCTGCAGATGAAGGAGGAGGATGTCCTCAAATTCCTTGCT
      60
PRLi     ATGTCCGGAGCCCTTGACGTCCTGCAGATGAAGGAGGAGGATGTCCTCAAATTCCTTGCT
      M S G A L D V L Q M K E E D V L K F/L L A
      aa      1-20

AOF      GCGGGAACCCACTTAGGTGGCACCAACCTTGACTTTCAGATGGAGCAGTACATCTACAAA
      120
PRLi     GCGGGAACCCACTTAGGTGGCACCAACCTTGACTTTCAGATGGAGCAGTACATCTACAAA
      A G T H L G G T N L D F Q M E Q Y I Y K
      aa      21-40

AOF      AGGAAAAGTGACGGTATCTACATCATAAACCTGAAGAGGACCTGGGAGAAGCTGTTGCTC
      180
PRLi     AGGAAAAGTGACGGTATCTACATCATAAACCTGAAGAGGACCTGGGAGAAGCTGTTGCTC
      R K S D G I Y I I N L K R T W E K L L L
      aa      41-60

AOF      GCAGCTCGAGCTATTGTTGCCATCGAGAATCCTGCTGACGTCAGCGTCATCTCCTCCAGG
      240
PRLi     GCAGCTCGAGCTATTGTTGCCATCGAGAATCCTGCTGACGTCAGCGTCATCTCCTCCAGG
      A A R A I V A I E N P A D V S V I S S R
      aa      61-80

AOF      AACACTGGCCAGCGAGCTGTGCTGAAGTTTGCTGCTGCCACAGGAGCCACTCCGATCGCT
      300
PRLi     AACACTGGCCAGCGAGCTGTGCTGAAGTTTGCTGCTGCCACAGGAGCCACTCCGATCGCT
      N T G Q R A V L L F A A A T G A T P I A
      aa      81-100

AOF      GGCCGCTTCACACCTGGGACCTTCACTAACCAGATCCAAGCAGCCTTCAGGGAGCCACGG
      360
PRLi     GGCCGCTTCACACCTGGGACCTTCACTAACCAGATCCAAGCAGCCTTCAGGGAGCCACGG
  
```

ES 2 565 578 T3

G R F T P G T F T N Q I Q A A F R E P R
aa 101-120

AOF CTTCTAGTGGTGACCGATCCCAGGGCTGACCATCAGCCACTCACAGAGGCCTCTTATGTC
420

|||||
PRLi CTTCTAGTGGTGACCGATCCCAGGGCTGACCATCAGCCACTCACAGAGGCCTCTTATGTC
L L V V T D P R A D H Q P L T E A S Y V
aa 121-140

AOF AACCTGCCACCATTGCTCTGTGTAACACAGATTCTCCCCTGGCGTATGTGGACATTGCC
480

|||||
PRLi AACCTGCCACCATTGCTCTGTGTAACACAGATTCTCCCCTGGCGTATGTGGACATTGCC
N L P T I A L C N T D S P L R/A Y V D I A
aa 141-160

AOF ATCCCATGCAACAACAAGGGAGCTCACTCAGTGGGTCTGATGTGGTGGATGCTGGCCAGG
540

|||||
PRLi ATCCCATGCAACAACAAGGGAGCTCACTCAGTGGGTCTGATGTGGTGGATGCTGGCCAGG
I P C N N K G A H S V G L M W W M L A R
aa 161-180

AOF GAAGTACTCCGCATGCGAGGTAATCTCCCGTGAGCACCCCTGGGAGGTGATGCCTGAT
600

|||||
PRLi GAAGTACTCCGCATGCGAGGTAATCTCCCGTGAGCACCCCTGGGAGGTGATGCCTGAT
E V L R M R G T I S R E H P W E V M P D
aa 181-200

AOF CTTTACTTCTACAGAGACCCAGAGGAGATTGAGAAGGAGGAGCAGGCTGCTGCTGAGAAG
660

|||||
PRLi CTTTACTTCTACAGAGACCCAGAGGAGATTGAGAAGGAGGAGCAGGCTGCTGCTGAGAAG
L Y F Y R D P E E I E K E E Q A A A E K
aa 201-220

AOF GCTGTGACCAAGGAGGAATTCAGGGTGAATGGACCGCACCAGCTCCTGAGTTCAGTCTGCT
720

|||||
PRLi GCTGTGACCAAGGAGGAATTCAGGGTGAATGGACCGCACCAGCTCCTGAGTTCAGTCTGCT
A V T K E E F Q G E W T A P A P E F T A
aa 221-240

AOF GCTCAGCCTGAGGTGGCCGACTGGTCTGAGGGTGTGCAGGTTCCCTCTGTGCCCATCCAG
780

|||||

ES 2 565 578 T3

```

PRLi      GCTCAGCCTGAGGTGGCCGACTGGTCTGAGGGTGTGCAGGTTCCCTCTGTGCCCATCCAG
          A Q P E V A D W S E G V Q V P S V P I Q
          aa      241-260

AOF       CAGTTCCCCACGGAAGACTGGAGTGCACAGCCAGCCACTGAGGATTGGTCAGCAGCTCCC
          840
          |||
PRLi      CAGTTCCCCACGGAAGACTGGAGTGCACAGCCAGCCACTGAGGATTGGTCAGCAGCTCCC
          Q F P T E D W S A Q P A T E D W S A A P
          aa      261-280

AOF       ACAGCGCAGGCCACTGAGTGGGTTGGAGCCACCACTGAGTGGTCCTGA      888
          |||
PRLi      ACAGCGCAGGCCACTGAGTGGGTTGGAGCCACCACTGAGTGGTCCTGA
          T A Q A T E W V G A T T E W S *
          aa      281-295
    
```

5 Como se muestra a continuación, el AOF murino y la PRLi murina comparten una similitud de secuencia del 99,3 %; existen solo dos diferencias en los aminoácidos en toda la secuencia de 295 aminoácidos. Asimismo, el AOF murino y la PRLi humana difieren en 2 aminoácidos en sus secuencias. Véanse, Rao, y col., *Biochemistry* 28:7476-7486 (1989) (PRLi murina); Yow, y col., *PNAS* 85:6394-6398 (1988) (PRLi humana); y Coggin, y col., *Anticancer Res.* 19:5535-5542 (1999) (AOF murino).

```

PRLi Mu   M S G A L D V L Q M K E E D V L K L L A      20
PRLi Hu   - - - - - - - - - - - - - - - F - -
AOF Mu    - - - - - - - - - - - - - - - F - -

PRLi Hu   A G T H L G G T N L D F Q M E Q Y I Y K      40
AOF Mu    - - - - - - - - - - - - - - - - - -

PRLi Hu   R K S D G I Y I I N L K R T W E K L L L      60
AOF Mu    - - - - - - - - - - - - - - - - - -
    
```

	A A R A I V A I E N P A D V S V I S S R	80
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	N T G Q R A V L K F A A A T G A T P I A	100
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	G R F T P G T F T N Q I Q A A F R E P R	120
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	L L V V T D P R A D H Q P L T E A S Y V	140
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	N L P T I A L C N T D S P L A Y V D I A	160
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	I P C N N K G A H S V G L M W W M L A R	180
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	E V L R M R G T I S R E H P W E V M P D	200
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	L Y F Y R D P E E I E K E E Q A A A E K	220
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	A V T K E E F Q G E W T A P A P E F T A	240
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	A Q P E V A D W S E G V Q V P S V P I Q	260
PRLi Mu	T - - - -	
PRLi Hu	A - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	Q F P T E D W S A Q P A T E D W S A A P	280
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	
	T A Q A T E W V G A T T E W S	295
PRLi Mu	- - - - -	
PRLi Hu	- - - - -	
AOF Mu	- - - - -	

Abreviaturas de los aminoácidos

Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	M
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Glutamina	Q
Ácido glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V

5 Por consiguiente, para fines de la presente invención, AOF murino, PRLi murina, AOF humano y PRLi humana se refieren colectivamente como "AOF", y como se ha indicado previamente, "AOF" y "PRLi" se utilizan indistintamente junto con "AOF/PRLi" y "PRLi/AOF". Por "AOF," se tiene por objeto un consenso de polipéptido de 295 aminoácidos con variabilidad en las posiciones 18, 155, 241 y 293, como se muestra. Cualquier epítipo que contiene un residuo amino que no es común a todas las proteínas ya mencionadas de AOF y PRLi como se muestra previamente, o cualquier otro AOF o PRLi de mamífero, se puede considerar que contiene al menos, variabilidad en esa posición.

10 Un aspecto de la presente invención se dirige a epítipos de AOF que estimulan la proliferación de los linfocitos T que pertenecen a una subclase en relación con una o varias subclases; es decir, estimulan de manera específica linfocitos Tc, Th o Ts. La estimulación relativa o específica puede compararse con un control como MDMI (Medio de Dulbecco Modificado por Iscove). Dicho de manera diferente, la estimulación de una subclase obtenida de linfocitos T por el epítipo de AOF será comparable si no superior a la cantidad de estimulación de la subclase obtenida de linfocitos T por AOF intacto. La estimulación relativa de las subclases de linfocitos T murinos se cuantifica en los ejemplos siguientes. Como se muestra en las diversas tablas de los ejemplos a continuación, los epítipos de AOF que estimulan los linfocitos Tc muestran hasta un aumento de 56 veces en la estimulación de los linfocitos Tc contra los linfocitos Ts. Los epítipos de AOF que estimulan los linfocitos Ts muestran hasta un aumento de 13-14 veces en la estimulación de los linfocitos Ts contra los linfocitos Tc. Así, a diferencia de AOF intacto, la estimulación de las otras subclases de linfocitos T inducida por los epítipos es comparable a un valor basal o control (p. ej., diferencia de 2-10 veces con un control como MDMI, como se muestra a continuación en la Tabla 4). Por consiguiente, en general, por la expresión "un epítipo de AOF que estimula de manera específica una subclase de linfocitos T (Tc, Ts o Th)," se entiende que la estimulación de esa subclase obtenida de linfocitos T es de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 veces, o más, en comparación con al menos una de las otras subclases de linfocitos T, en particular entre linfocitos Tc y Ts, y linfocitos Ts y Th.

25 Los epítipos de AOF de la presente invención poseen normalmente una longitud de 8-12 aminoácidos, aunque se pueden utilizar péptidos ligeramente más cortos o más largos, siempre que también exhiban sustancialmente las mismas propiedades en términos de estimulación de linfocitos T. Por consiguiente, los epítipos también pueden describirse en términos de un péptido de aproximadamente 8 u 8 a aproximadamente 12 o 12 aminoácidos. En el

caso de los linfocitos Th, los epítomos pueden ser más extensos, p. ej., hasta aproximadamente 20 o aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, debido a las diferencias entre la unión a la proteína del CMH de clase I y clase II y la presentación de péptidos antigénicos.

5 Los epítomos de AOF que estimulan de manera específica la proliferación de clones de linfocitos Tc (en relación con los linfocitos Ts y Th) al menos en ratones se han descubierto en las regiones N-terminales y C-terminales de AOF. Los epítomos Tc que contienen restos de aminoácidos 53-60 (p. ej., RTWEKLLL) o los residuos 81-88 (p. ej., NTGQRAVL), se han identificado en la región N-terminal, y los epítomos Tc que contienen los residuos 229-236 (GEWTAPAP) se han identificado en la región C-terminal. En consecuencia, otros epítomos Tc abarcados en la presente invención incluyen AOF (49-60), AOF (50-61), AOF (51-62), AOF (52-63), AOF (53-64), AOF (50-60), AOF (51-61), AOF (52-62), AOF (53-63), AOF (51-60), AOF (52-61), AOF (53-62), AOF (52-60), AOF (53-61), AOF (77-88), AOF (78-89), AOF (79-90), AOF (80-91), AOF (81-92), AOF (78-88), AOF (79-89), AOF (80-90), AOF (81-91), AOF (79-88), AOF (80-89), AOF (81-90), AOF (80-88), AOF (81-89), AOF (225-236), AOF (226-237), AOF (227-238), AOF (228-239), AOF (229-240), AOF (226-236), AOF (227-237), AOF (228-238), AOF (229-239), AOF (227-236), AOF (228-237), AOF (229-238), AOF (228-236) y AOF (229-237). Otros epítomos preferentes incluyen secuencias de aproximadamente 8-12 aminoácidos y que contienen CNTDSPLR (p. ej., los restos de aminoácidos 148-155) o la secuencia YVDIAIPC (p. ej., los restos de aminoácidos 56-163). Por consiguiente, además de estas dos secuencias, los epítomos Tc adicionales incluyen AOF (144-155), AOF (145-156), AOF (146-157), AOF (147-158), AOF (148-159), AOF (145-155), AOF (146-156), AOF (147-157), AOF (148-158), AOF (146-155), AOF (147-156), AOF (148-157), AOF (147-155), AOF (148-156), AOF (152-163), AOF (153-164), AOF (154-165), AOF (155-166), AOF (156-167), AOF (153-163), AOF (154-164), AOF (155-165), AOF (156-166), AOF (154-163), AOF (155-164), AOF (156-165), AOF (155-163) y AOF (156-164). Según el alineamiento mostrado previamente, cualquier epítomo que corresponde a un fragmento de AOF que contiene el residuo 155 podría contener un residuo "A" en su lugar. Otros epítomos preferentes incluyen la secuencia TIALCNTDS (p. ej., los restos de aminoácidos 144-152), TDSPLRYVD (p. ej., los restos de aminoácidos 150-158), PLRYVDIAI (p. ej., los restos de aminoácidos 153-161), y VDIAPCINN (p. ej., los restos de aminoácidos 157-165). Puede haber casos en los que algunos epítomos se reconozcan por ambos linfocitos Ts y Tc. No obstante, debido a la menor afinidad de receptores de antígeno en los linfocitos Ts, cuando AOF/PRLi está presente en cantidades limitadas, los linfocitos Tc se estimularán o inducirán preferentemente. Los receptores de antígeno en los linfocitos Tc presentan una afinidad relativamente mayor para el péptido de AOF/PRLi: complejo de proteínas del CMH, a fin de proporcionar una señal de activación en el linfocito Tc. Los epítomos de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos Th con respecto a los linfocitos Tc y Ts, al menos en ratones, se han identificado para incluir la secuencia SPLRYVDIAI (p. ej., los restos de aminoácidos 152-161 de AOF). Los epítomos adicionales de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos Th en relación con los linfocitos Tc y Ts, al menos en ratones, se han hallado en la región C-terminal de AOF. Los epítomos preferentes en esta región contienen las secuencias de AOF (229-238) (p. ej., GEWTAPAPEF), AOF (241-250) (p. ej., AQPEVADWSE), AOF (253-262) (p. ej., QVPSVPIQQF), AOF (277-286) (p. ej., SAAPTAQATE) y AOF (285-294) (p. ej., TEWVGATTDW). De este modo, los epítomos de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos Th pueden contener una de estas secuencias, pero también pueden contener aminoácidos adicionales en cualquier o ambos extremos terminales, para alcanzar longitudes de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos. Por otra parte, pueden contener aproximadamente 8 o 9 de los 10 aminoácidos (p. ej., AOF (152-159), AOF (153-160), AOF (154-161), AOF (152-160), AOF 153-161), AOF (229-236), AOF (230-237), AOF (231-238), AOF (229-237), AOF (230-238), AOF (241-248), AOF (242-249), AOF (243-250), AOF (241-249), AOF (242-250), AOF (253-260), AOF (254-261), AOF (255-262), AOF (253-261), AOF (254-262), AOF (277-284), AOF (278-285), AOF (279-286), AOF (277-285), AOF (278-286), AOF (285-292), AOF (286-293), AOF (287-294), AOF (285-293) y AOF (286-294).

45 Los epítomos de AOF que estimulan de manera específica la proliferación de linfocitos Ts (en relación con las células Tc y Th), al menos en ratones, se han hallado en la región que contiene los restos de aminoácidos 9-28 y que contienen el tetrapéptido KLLA (p. ej., los restos de aminoácidos 17-20), y preferentemente el octapéptido KLLAATGH (p. ej., los restos de aminoácidos 17-24). Por consiguiente, los epítomos de AOF representativos incluyen AOF (9-20), AOF (10-20), AOF (11-20), AOF (12-20), AOF (13-20), AOF (10-21), AOF (11-21), AOF (12-21), AOF (13-21), AOF (14-21), AOF (11-22), AOF (12-22), AOF (13-22), AOF (14-22), AOF (15-22), AOF (12-23), AOF (13-23), AOF (14-23), AOF (15-23), AOF (16-23), AOF (13-24), AOF (14-24), AOF (15-24), AOF (16-24), AOF (17-24), AOF (14-25), AOF (14-25), AOF (15-25), AOF (16-25), AOF (17-25), AOF (15-26), AOF (16-26), AOF (17-26), AOF (16-27), AOF (17-27) y AOF (17-28).

55 Los epítomos de AOF adicionales que estimulan de manera específica la proliferación de los clones de los linfocitos Ts (en relación con los linfocitos Tc y Th), al menos en ratones, contienen los restos de aminoácidos 37-44 (p. ej., IYKRKSD) y los residuos 97-104 de AOF (p. ej., TPIAGRFT). Por consiguiente, además de estas dos secuencias, los epítomos Ts adicionales incluyen AOF (33-44), AOF (34-45), AOF (35-46), AOF (36-47), AOF (37-48), AOF (34-44), AOF (35-45), AOF (36-46), AOF (37-47), AOF (35-44), AOF (36-45), AOF (36-46), AOF (37-46), AOF (36-44), AOF (37-45), AOF (93-104), AOF (94-105), AOF (95-106), AOF (96-107), AOF (97-108), AOF (94-104), AOF (95-105), AOF (96-106), AOF (97-107), AOF (95-104), AOF (96-105), AOF (97-105), AOF (96-104) y AOF (97-105).

Otros epítomos de AOF que estimulan la proliferación de los clones de los linfocitos Ts (en relación con los linfocitos Tc y Th), al menos en ratones, contienen la secuencia VNLPTIAL (p. ej., AOF (140-147)). Por consiguiente, además de AOF (140-147), una lista adicional de epítomos de AOF representativos que estimulan linfocitos Ts incluye AOF

(136-147), AOF (137-148), AOF (138-149), AOF (139-150), AOF (140-151), AOF (137-147), AOF (138-148), AOF (139-149), AOF (140-150), AOF (138-147), AOF (139-148), AOF (138-146), AOF (138-147), AOF (138-148), AOF (138-149), AOF (140-149), AOF (139-147) y AOF (140-148).

5 La publicación anteriormente referenciada por Rohrer y col., en *Modern Aspects of Immunobiology*, señala además que la tarea de identificar epítomos de AOF que potencian la inmunidad mediada antitumoral anti-AOF/PRLi probablemente no será tan sencilla, sobre todo cuando se debe tener en cuenta el CMH no consanguíneo humano. A pesar de esta consideración, así como las diferencias entre los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase en los seres humanos y sus homólogos H2 en ratones, los solicitantes creen que ahora los epítomos de AOF desvelados en el presente documento también son funcionales en los seres humanos. Véase el siguiente ejemplo titulado "Conformación de la unión del epítomo de AOF a las proteínas de clase I H-2^d".

10 Independientemente, los epítomos de AOF funcionales en un mamífero dado tal como un ser humano pueden identificarse o confirmarse según el procedimiento descrito a continuación. Para identificar (o según corresponda, para confirmar la identidad de) epítomos de AOF que estimulan selectivamente la proliferación de un subconjunto de linfocitos T contra uno o varios subconjuntos de linfocitos T en un mamífero dado tal como un ser humano, se obtiene una muestra de leucocitos mononucleares de sangre periférica (LMSPs) (o leucocitos mononucleares (LMs) obtenidos a partir del bazo o de ganglios linfáticos) de un mamífero portador del tumor. Desde que se ha descubierto que AOF es un antígeno de rechazo tumoral universal en todos los sistemas malignos ensayados hasta la fecha, el procedimiento puede ponerse en práctica con LMSPs o LMs en cualquier mamífero portador del tumor, incluyendo seres humanos. La muestra se cultiva entonces en un medio que contiene una concentración predeterminada de AOF y uno o más factores de crecimiento necesarios para el crecimiento de los linfocitos T (p. ej., IL-2 e IL-6) y células procesadoras de antígeno (CPAs), a fin de permitir la expansión de los linfocitos T presentes en la muestra. Las CPAs están presentes normalmente en una muestra de LMSP o LM. Por consiguiente, al establecer inicialmente los linfocitos reactivos en el tumor en el cultivo, no se necesita añadir CPAs adicionales. No obstante, con el fin de ser capaces de reestimar y clonar estos linfocitos T reactivos posteriormente, se añaden CPAs autólogas (humanas) o singénicas (murinas) irradiadas adicionales junto con el epítomo o mutante de delección de AOF utilizado para la estimulación. Como resultado de este procedimiento, pueden identificarse los clones de los linfocitos T que reconocen AOF. A continuación se cuentan, seguido por dilución y siembra en placas. Preferentemente, el análisis de dilución limitada implica la siembra en placas de los linfocitos T en pocillos para alcanzar una distribución tipo Poisson p. ej., en la que tras la dilución terminal, superior a aproximadamente 37 % de los pocillos "sembrados" con linfocitos de ensayo no tendrán linfocitos T reactivos y las diluciones se fabrican de tal manera que existe un 90 % de probabilidad de que cualquier colonia de linfocitos T que forman cada uno procedan de una sola célula y, por consiguiente, pueden considerarse apropiadamente como clones. Tras el cultivo en placas, p. ej., en micropocillos de plástico, CPAs, AOF y factores de crecimiento se añaden a cada pocillo. Este procedimiento da lugar a la producción de clones de linfocitos T que son específicos de AOF.

25 Siguiendo el procedimiento de clonación, los clones de los linfocitos T se identifican según el tipo de subclase. Este procedimiento puede llevarse a cabo según técnicas convencionales. Por ejemplo, los linfocitos T auxiliares pueden distinguirse de ambos linfocitos T supresores y T citotóxicos mediante la determinación de su reactividad con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. Los linfocitos Th reaccionan con anticuerpos anti-CD4 y T_s y T_c, reaccionan con anticuerpos anti-CD8. La reactividad con tales anticuerpos puede determinarse según técnicas convencionales, tales como citometría de flujo. Para distinguir linfocitos T_s contra T_c, el medio de cultivo se analiza para detectar la presencia de IL-10. Esta interleucina se produce por linfocitos T_s pero no T_c. Aunque los linfocitos T_c pueden identificarse de forma predeterminada, también puede realizarse una determinación positiva analizando el medio de cultivo para la presencia de la citoquina IFN-gamma que produce estos linfocitos (T_c) (pero no los linfocitos T_s) y un ensayo de citotoxicidad *in vitro* (es decir, demuestra que estas células destruyen las células tumorales) también puede llevarse a cabo para confirmar la presencia de T_c.

35

40

45

Una vez que los subconjuntos de linfocitos T específicos para AOF se hayan clonado e identificado, se cultivan de nuevo con los mismos ingredientes previamente mencionados, excepto que en esta ocasión, una proteína de AOF truncada producida por un mutante de delección de AOF se añade al medio. Por "mutante de delección de AOF" se entiende cualquier segmento de la secuencia de 295 aminoácidos de AOF. Por ejemplo, el mutante de delección puede constituir un fragmento de AOF (p. ej., aminoácidos 1-25 o 250-295) o los 295 aminoácidos intactos de AOF menos una delección de aminoácidos internos (p. ej., mutante de AOF contiene los restos de aminoácidos 1-135 y 156-295). La estimulación relativa de los linfocitos Th, T_s o T_c por la proteína mutante de delección de AOF puede determinarse utilizando también procedimientos convencionales. El grado de estimulación de los clones puede determinarse, por ejemplo, mediante la medición de la captación por las células de un nucleótido etiquetado de forma detectable en el medio de cultivo, tal como ³H-timidina o por detección de ELISA de la incorporación de 5-bromodesoxiuridina (BrdU). Además, la determinación puede realizarse mediante ensayos positivos o negativos. Un ensayo de "tipo positivo" implica simplemente una comparación de la estimulación relativa de los clones de los linfocitos T en una única proteína mutante de delección de AOF añadida al cultivo. En realizaciones preferentes, el ensayo se realiza de "forma" negativa, utilizando una pluralidad de mutantes de delección de AOF superpuestos, en el que las delecciones recogidas de forma colectiva corresponden a la proteína de AOF completo. En cualquier caso, se prefiere comparar el valor determinado para cualquier clon de linfocitos T obtenido contra un control tal como AOF intacto propiamente dicho. Si el procedimiento se lleva a cabo inicialmente con proteínas mutantes de delección de AOF superiores a aproximadamente 12 aminoácidos de longitud, la estimulación de los clones de los linfocitos T

50

55

60

en la determinación posterior de la estimulación relativa debe realizarse al menos una vez más, cada vez que se utilice un mutante de delección de AOF más corto con el fin de identificar un epítipo de AOF que produce la estimulación relativa máxima de los linfocitos T de una subclase obtenida con respecto a otros.

5 El presente procedimiento también puede utilizarse para ensayar análogos de los epítopos, p. ej., que difieren de la secuencia de origen natural en términos de una o más sustituciones o adiciones de aminoácidos que se presentan de manera natural o no natural, o una o más delecciones de aminoácidos. Como se ha indicado previamente, el presente procedimiento puede utilizarse para determinar si los epítopos correspondientes a las secuencias que contienen las posiciones de aminoácidos 18, 155, 241 y/o 293 pueden contener el resto de aminoácido nativo en PRLi humana o murina.

10 Las modificaciones y cambios pueden realizarse en la estructura del epítipo de AOF siempre que la modificación o cambio no altere el epítipo hasta el punto en el que no se estimule selectivamente la subclase obtenida de linfocitos T. Estos se denominan "equivalentes biológicamente funcionales", "equivalentes funcionales" o "análogos", también se incluyen en el significado del término "epítipo de AOF".

15 Por ejemplo, uno de los expertos en la materia reconocerá que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en un epítipo de AOF dado. El experto en la materia también entiende adecuadamente que hay un límite en el número de cambios que pueden realizarse dentro de una parte de la molécula y todavía producen una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente. En la determinación de si un cambio, adición o delección dado dará lugar a un cambio significativo en la actividad deseada, existen varias pautas a considerar. En particular, cuando se refiere a epítopos de longitud más corta, se contempla que deben fabricarse menos aminoácidos dentro del péptido obtenido. Los epítopos más extensos pueden tener un número intermedio de cambios. Los epítopos más largos tendrán la mayor tolerancia para un mayor número de cambios. También se entiende que cuando se muestran ciertos residuos que son particularmente importantes en las propiedades biológicas o estructurales de un poliaminoácido, tales residuos no pueden generalmente intercambiarse. Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los 5 sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Un análisis del tamaño, forma y tipo de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido revela que la arginina, la lisina y la histidina son residuos cargados positivamente; la alanina, la glicina y la serina presentan un tamaño similar; y la fenilalanina, el triptófano y la tirosina poseen una forma generalmente similar.

20 Por lo tanto, en base a estas consideraciones, los miembros de los siguientes grupos, a saber: arginina, lisina e histidina; alanina, glicina y serina; y fenilalanina, triptófano y tirosina se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales. Para efectuar cambios más cuantitativos, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático a partir de sus características de hidrofobicidad y carga, que son las siguientes: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). En la materia generalmente se entiende la importancia del índice hidropático del aminoácido para conferir una función biológica interactiva en una proteína, y, en la misma medida en un poliaminoácido. Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse con otros aminoácidos que presentan un índice o puntuación hidropática similar y aún de esta forma conservar una actividad biológica similar. Al realizarse dichos cambios basándose en el índice hidropático, resulta preferente la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran en 2, resultan particularmente preferentes aquellos que se encuentran aproximadamente en 1, y resultan aún más particularmente preferentes aquellos que se encuentran aproximadamente en 0,5.

25 También se entiende en la materia que la sustitución de aminoácidos semejantes puede realizarse eficientemente en virtud de la hidrofiliidad. Como se desvela en la patente de Estados Unidos n.º 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (3,0); aspartato (3,0 ± 1); glutamato (3,0 ± 1); serina 5 (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Al realizarse dichos cambios en base a los valores de hidrofiliidad similares, resulta preferente la sustitución de aminoácidos cuyos valores hidropáticos son ± 2, resultan particularmente preferentes aquellos que son ± 1, y resultan aún más particularmente preferentes aquellos que son ± 0,5.

30 Las sustituciones en un epítipo de AOF obtenido no se limitan por aminoácidos que se presentan de manera natural y no natural. Pueden utilizarse determinados compuestos miméticos que imitan los elementos de la estructura secundaria de las proteínas. La razón subyacente detrás del uso de péptidos miméticos es que la estructura peptídica de las proteínas, incluyendo poliaminácidos, existe principalmente para orientar las cadenas laterales del aminoácido de manera tal que facilita las interacciones moleculares, tales como las del anticuerpo y antígeno. Se concibe, por consiguiente, un péptido mimético para facilitar interacciones moleculares similares a la molécula natural. Algunas aplicaciones satisfactorias del concepto del péptido mimético se han enfocado en compuestos miméticos de giros β de las proteínas, que se sabe que son altamente antigénicos. Probablemente, la estructura de giro α de un polipéptido puede pronosticarse por medio de algoritmos de base computarizada. Una vez determinados los aminoácidos componentes del giro, los compuestos miméticos pueden construirse para lograr una

orientación espacial similar de los elementos esenciales de las cadenas laterales de aminoácidos.

Además de los 20 aminoácidos "convencionales" proporcionados por el código genético, también se contempla la utilización de aminoácidos modificados o no habituales como se muestra en la tabla 1 de la presente invención.

Tabla 1: Aminoácidos modificados y no habituales

Abrev.	Aminoácido	Abrev.	Aminoácido
Aad	ácido 2-aminoadípico	EtAsn	N-etilasparagina
bAad	ácido 3-aininoadípico	Hyl	Hidroxilisina
bAla	beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico	aHyl	Alo-hidroxilisina
Abu	ácido 2-aminobutírico	3Hyp	3-hidroxi prolina
4Abu	ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico	4Hyp	4-flidroxiprolina

5

Aminoácidos modificados y no habituales ácido 6-aminocaproico lde Isodesmosina

Aep			
Ahe Aib bAib	ácido 2-aminoheptanoico	alle	Alo-isoleucina
	ácido 2-aminoisobutírico	MeGly	N-metilglicina, sarcosina
	ácido 3-aminoisobutírico	Melle	N-metilisoleucina
Apm Dbu	ácido 2-aminopimélico	MeLys	6-N-metililisina
	ácido 2,4-diaminobutírico	MeVal	N-metilvalina
Des	Desmosina	Nva	Norvalina
Dpr	ácido 2,3-diaminopropiónico	Om	Omitina
EtGly	N-etilglicina		

Los epítomos de AOF de la presente invención pueden administrarse para tratar o prevenir cualquier cáncer en un mamífero caracterizado por la presencia de AOF. Los linfocitos Tc reconocen epítomos de AOF unidos a moléculas del CMH de clase I. En vista de la variabilidad en las proteínas del CMH de paciente a paciente, y la multitud de clones Tc, resulta preferente formular un complejo o "cóctel" de epítomos de AOF que estimulan diferentes clones de linfocitos Tc. En algunas realizaciones de la presente invención, la composición que contiene el(los) epítomo(s) Tc también puede contener uno o más epítomos Th. Los linfocitos Th reconocen epítomos de AOF que se unen a las proteínas del CMH de clase II, que de nuevo pueden variar de un paciente a otro. La estimulación de tanto los linfocitos Th CD4+ como los linfocitos Tc CD8+ puede proporcionar un mayor efecto inmunogénico que el uso de solo un(os) epítomo(s) Tc. Véase, Zeng, *J. Immunother.* 24:195-204 (2001). El cóctel puede administrarse de diversas formas. En algunas realizaciones, se formula como una mezcla de péptidos. En otras realizaciones, dos o más epítomos se unen entre sí para formar un polipéptido más largo que es pertinente para la síntesis sintética (no recombinante) p. ej., un 20-60 mer, incluyendo por consiguiente aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, a aproximadamente 60 aminoácidos. En algunas realizaciones preferentes, el polipéptido contiene aproximadamente 50 restos de aminoácidos. En estas realizaciones, resulta preferente utilizar un agente de unión que puede ser de naturaleza peptídica (p. ej., aproximadamente 3-5 aminoácidos de longitud) o no peptídica (p. ej., un puente disulfuro). La determinación de la separación efectiva y óptima entre epítomos individuales para fines de unión con las proteínas del CMH y la identificación por medio de las células procesadoras de antígeno pueden determinarse según las técnicas convencionales.

En realizaciones que implican múltiples epítomos de AOF, la administración puede facilitarse mediante su vinculación a una estructura de núcleo común, tal como una lisina multiramificada o núcleo de arginina para inducir respuestas de LTC específicas del péptido. (Tam, *PNAS EE. UU.* 85:5409-5413 (1988); Posnett y col., *J. Biol Chem* 263:1719-1725 (1988)). Por consiguiente, en estas realizaciones en las que se administra una pluralidad de Tc (y opcionalmente uno o más epítomos Th), p. ej., contenida en un complejo o cóctel obtenido, la composición contendrá uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) de los epítomos Tc, p. ej., epítomos que contienen AOF (53-60), AOF (81-88), AOF (148-155), AOF (156-163) y AOF (229-236), y opcionalmente uno o más, y preferentemente dos o más epítomos Th, p. ej., epítomos que contienen AOF (152-161), AOF (229-238), AOF (241-250), AOF (253-262), AOF

15

(277-286) y AOF (285-294).

En otras realizaciones, el cóctel de epítomos se encuentra en forma de un derivado de AOF que contiene epítomos que estimulan los linfocitos Tc (y opcionalmente uno o más epítomos que estimulan los linfocitos Th), pero que carece de epítomos que estimulan los linfocitos Ts. Por ejemplo, un derivado de AOF puede diferir de AOF intacto en que carece de uno o más, y preferentemente todos los epítomos Ts que contienen AOF (17-24), AOF (37-44), AOF (97-104) y AOF (140-147). Por consiguiente, el derivado puede carecer de una región completa que contiene múltiples epítomos (superpuestos y distintos) que estimulan los linfocitos Ts o puede carecer de uno o más epítomos individuales (p. ej., aquellos con la mayor afinidad de linfocitos Ts fuera de los epítomos que residen en la región de AOF). Independientemente de la manera en que se administran los epítomos de AOF, la internalización y el procesamiento celular de los epítomos en las células dendríticas y la presentación del péptido antigénico en la superficie celular como cabría esperar se muestran en otros sistemas. Véanse, Ota, y col., *Cancer Res.* 62:1471-1476 (2002); Mattner, y col., *Cancer Res.* 62:1477-1480 (2002).

En consecuencia, los epítomos de AOF pueden utilizarse para inhibir el crecimiento o proliferación de un tipo de cáncer, por medio de la potenciación de una respuesta protectora del sistema inmunitario a las células tumorales que portan AOF (causada por la estimulación preferencial de Tc opcionalmente con linfocitos Th1, en relación a los linfocitos Ts), o para inducir la inmunidad del cáncer. La terapia contra el cáncer según la presente invención puede evaluarse al controlar la producción de citoquinas por los linfocitos de sangre periférica del paciente. Uno de estos procedimientos implica ensayos de inmunospot ligado a enzimas citoquinas (ELISPOT) junto con el análisis de imagen asistida por ordenador tras la breve estimulación *in vitro* de las células del bazo (linfocitos). Las citoquinas de interés incluyen interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, IL-4, IL-5 e IL-10. Por ejemplo, los niveles anormalmente altos de IL-10 probablemente serán indicativos de niveles relativamente (e indeseablemente) altos de linfocitos T CD8 supresores, indicativos de la supresión inmunitaria. Por otro lado, la potenciación inmunológica y el tratamiento efectivo se manifestarán probablemente por los altos niveles de linfocitos CD8 secretores de interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa.

Los epítomos y derivados de AOF de la presente invención pueden producirse utilizando una técnica de síntesis de péptidos en fase sólida o por la tecnología de ADN recombinado mediante la incorporación de un ADN que codifica el epítomo en un vector de expresión apropiado, transformando un huésped mediante el vector, cultivando el huésped (normalmente una bacteria, tal como *E. coli*) y aislando su producto de expresión. La secuencia de ADN de AOF de longitud completa se adjunta en el presente documento. Por consiguiente, contiene las secuencias codificantes de los epítomos. Los expertos en la materia apreciarán que los polinucleótidos codificantes de los epítomos diferentes a las secuencias desveladas en el presente documento pueden prepararse p. ej., para dar cabida a la preferencia de codones de un huésped dado, en vista de la degeneración del código genético. Véase, p. ej., Watson, y col., *Recombinant DNA*, 2ª Ed., Freeman, NY (1993). De la misma manera, puede prepararse fácilmente la secuencia de nucleótidos de un derivado de AOF obtenido (p. ej., mediante la delección de la secuencia de longitud completa de las secuencias codificantes de las regiones o epítomos mencionados previamente). Resultan preferentes los esquemas sintéticos. Los análogos de AOF pueden purificarse según técnicas convencionales, tales como HPLC en fase inversa.

Los epítomos de AOF de la presente invención pueden formularse en preparaciones farmacéuticas para la administración por cualquier vía deseada, p. ej., por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular, aunque resulta preferente la vía intradérmica o la vía mucosa. La administración intradérmica y mucosa resultan ventajosas desde la perspectiva de las dosis más bajas y una rápida absorción, respectivamente. Las vías mucosas de administración incluyen la administración oral, rectal y nasal. Las preparaciones para las administraciones mucosas resultan adecuadas en diversas formulaciones como se describe a continuación. La vía de administración puede variar durante un curso de tratamiento. Las variables, tales como las cantidades de dosificación, y el momento y modo de administración variarán en función de varios factores, incluyendo el peso y la salud general del paciente así como el estadio de la enfermedad. En algunas realizaciones, los análogos de AOF se administran en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 50 µg, administrada cada dos semanas durante aproximadamente 6 semanas ½.

Si el epítomo de AOF es soluble en agua, puede formularse en un tampón apropiado tal como solución salina tampón fosfato u otras soluciones fisiológicamente compatibles. Si por el contrario, el análogo de AOF tiene solubilidad pobre en disolventes acuosos, puede formularse con un tensioactivo no iónico, tal como Tween®, o polietilenglicol. Por consiguiente, los epítomos de AOF pueden formularse para la administración por inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o de la nariz) o la administración oral, bucal, parenteral, rectal, o en el caso de tumores, directamente inyectados en un tumor sólido. Para la administración oral, la preparación farmacéutica puede estar en forma líquida, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o puede presentarse como un producto farmacológico para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o acacia); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las composiciones farmacéuticas pueden, por ejemplo, tener forma de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de

maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); materiales de relleno (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (p. ej., almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes o (p. ej., laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse por procedimientos bien conocidos en la materia. Las preparaciones para la administración oral pueden formularse adecuadamente para obtener una liberación controlada del(los) análogo(s) de AOF. Dichas composiciones pueden tener forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los epítomos de AOF pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, utilizando un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo de los epítomos de AOF y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Los epítomos de AOF pueden formularse para la administración parenteral por inyección, p. ej., mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Los complejos también pueden formularse en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Además de las formulaciones descritas previamente, los epítomos de AOF también se pueden formular como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por consiguiente, por ejemplo, los epítomos de AOF pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. Micelas, liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos o transportadores de administración para fármacos hidrófilos, y son vehículos de administración adecuados para los epítomos de AOF de la presente invención. Las composiciones pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen los complejos no covalentes. El envase puede comprender, por ejemplo una lámina metálica o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

Las composiciones inmunogénicas o inmunoterapéuticas de la presente invención contienen un vehículo en el que los péptidos de AOF/PRLi pueden suspenderse y, en general, permiten una liberación lenta de AOF/PRLi que induce un periodo mayor de inmunización. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención contendrán también normalmente un adyuvante. En realizaciones preferentes, el transportador también funciona como un adyuvante. Se ha utilizado adyuvante de Freund (AFI) en la inmunoterapia humana contra el melanoma que implica la inmunización con el péptido gp 100 (Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, y col. 1998, *Nat. Med.* 4:321)). Sin embargo, este adyuvante no se utiliza ampliamente en protocolos de vacunación humana debido a sus efectos secundarios indeseables, tales como eritema e induración en el sitio de inyección. Microfluidizado (MF) 59 es una emulsión que consiste en escualeno al 5 % (v/v), Tween 80 al 0,5 % (v/v), y Span 85 al 0,5 % (v/v) en agua. Se ha referido que la adición de la emulsión del adyuvante MF59 en una subunidad convencional de antígeno de la gripe provoca inmunogenicidad potenciada sin aumento clínicamente significativo alguno de la reactividad (R. Gasparini, T. Pozzi, E. Montomoli 2001, 17, 135-40). Véase, también Podda, A. 2001, *Vaccine* 19:2673.

Los dinucleótidos CpG no metilados, en un contexto de base determinado (motivos CpG) contenidos en oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) estimulan los linfocitos B y los linfocitos CN (Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, y col. 1995 *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. *Nature* 374: 546)). También activan las células dendríticas (CDs) e inducen la maduración de las CD en células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs) (Sparwasser, T., E. S. Koch, R. M. Vabulas, y col. 1998. *Eur. J. Immunol.* 28:2045; Hartmann, G., G. J. Weiner, A. M. Krieg. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 96:9305; Sparwasser, T., R. M. Vabulas, B. Villmow, y col. 2000, *Eur. J. Immunol.* 30:3591; Vabulas, R. M., H. Pircher, G. B. Lipford, y col. 2000, *Immunol.* 164:2372), potenciando así su capacidad para estimular los linfocitos T reactivos de antígeno *in vitro* e *in vivo*. Los motivos CpG que contienen ODN (referidos como CpG ODN) también estimulan los macrófagos para secretar citoquinas Th1, que son importantes en el desarrollo de una respuesta de LTC (Carson, D. A., E. Raz. 1997, 186:1621). Además, CpG ODN ha demostrado comportarse como un adyuvante de Ab y una respuesta de LTC se dirige contra la proteína completa atrapada en liposomas o péptidos restringidos por la clase I (Lipford, G. B., M. Bauer, C. Blank, y col. 1997. *Eur. J. Immunol.* 27:2340). La administración repetida de CpG ODN potencia la respuesta de LTC contra el péptido de LTC o proteína emulsionada en AFI y favorece la supervivencia en respuesta a la exposición al tumor en los dos protocolos de vacunación profiláctica y terapéutica (Davila, E., E. Celis. 2000, *J. Immunol.* 165:539). Se ha indicado la evidencia de la inducción de una respuesta de LTC específica contra un péptido de linfocitos T CD8⁺ en presencia de CpG ODN sin adyuvante adicional mediante la evaluación de la

actividad citolítica de las células de los ganglios linfáticos tras la estimulación *in vitro* (Vabulas, R. M., H. Pircher, G. B. Lipford, y col. 2000, *J. Immunol.* 164:2372).

Las citoquinas, tales como el ligando de la tirosina quinasa 3 de hígado fetal (ligando tq3hf o LF) que movilizan las CDs *in vivo* también expandirán diversos subgrupos de CDs *in vivo* (Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, y col. 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 96:1036; Shurin, M. R., P. P. Pandharipande, T. D. Zorina, y col. 1997. *Cell. Immunol.* 179:174). Se ha demostrado que LF expande subconjuntos de CD distintas en ratones y aumenta en gran medida las respuestas de linfocitos T y B específicos de antígeno contra los antígenos solubles y tumores (Pulendran, B., J. L. Smith, M. Jenkins, y col. 1998, *J. Exp. Med.* 188:2075; Lynch, D. H., E. Andreasen, E. Maraskovsky, y col. 1997, *Nat. Med.* 3:625). Las células dendríticas poseen una capacidad única para estimular los linfocitos T vírgenes. La evidencia reciente sugiere que los distintos subconjuntos de CD dirigen diferentes clases de respuestas inmunitarias *in vitro* e *in vivo*. En los seres humanos, las CDs CD11c⁺ derivadas de monocitos inducen los linfocitos T para que produzcan citoquinas Th1 *in vitro*, mientras que las CDs derivadas de linfocitos T plasmocitoides CD11c⁻ provocan la producción de citoquinas Th2. La administración del ligando tq3hf (LF) o factor estimulante de colonias de granulocitos (FEC-G) en voluntarios humanos sanos aumenta radicalmente los subconjuntos de CD distintos o precursores de CD en la sangre. LF aumenta tanto el subconjunto de CD CD11c⁺ (48 veces) como los precursores de CD CD11c⁻ IL-3R⁺ (13 veces). Por el contrario, FEC-G solo aumenta los precursores de CD11c⁻ (p. ej., superior a 7 veces). Los linfocitos recién clasificados CD11c⁺ pero no CD11c⁻ estimulan los linfocitos T CD4⁺ en una RLM alogénica, mientras que solo los linfocitos CD11c⁻ pueden inducirse para secretar altos niveles de IFN-alfa en respuesta al virus de la gripe. Los linfocitos CD11c⁺ y CD11c⁻ pueden madurar *in vitro* con FEC-G + FNT-alfa o con ligando IL-3 + CD40, respectivamente. Estos dos subconjuntos aumentan las moléculas coestimuladoras del CMH de clase II así como la maduración de CD de la proteína de membrana asociada al lisosoma por el marcador de CD. Además, estimulan los linfocitos T CD4⁺ alogénicos vírgenes. Estos dos subconjuntos de CD provocan que los perfiles de citoquinas distintos en los linfocitos T CD4⁺, con el subconjunto CD11c⁻ induzcan niveles mayores de la citoquina Th2 IL-10. La movilización diferencial de subconjuntos de CD distintos o precursores de CD mediante la administración *in vivo* de citoquinas tales como LF y FEC-G también resulta útil para manipular las respuestas inmunitarias en los seres humanos (B. Pulendran, y col., *J. Immunol* 165:566-572 (2000)).

Se ha demostrado además que la coadministración del interferón (IFN) de tipo I con una vacuna humana (gripe), causa un potente efecto adyuvante, induciendo un tipo Th1 de la respuesta inmunitaria y protección contra la exposición al virus (E. Proietti, y col., *J. Immunol.* 169:375-383 (2002)). Cuando se administra por vía intramuscular, el IFN de tipo I era muy superior al alumbre y era equivalente al adyuvante completo de Freund (ACF), considerado uno de los adyuvantes más potentes en modelos animales, así como a MF59.

Otros adyuvantes contienen ácido poliinosínico-ácido policitídílico (poli(I-C)). Se ha indicado el efecto de este adyuvante en la expresión de CD de IL-15 así como la capacidad de IL-15 para utilizarse como un activador de CD en Mattei, y col., *J. Immunol.* 167:1179-1187 (2000). La inyección de poli(I:C) en ratones induce el aumento en la expresión tanto de IL-15 como IL-15R alfa por las CD esplénicas. Además, el tratamiento de IL-15 potenció la expresión de los marcadores coestimuladores en CDs, así como su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno. Asimismo, la secreción de IFN gamma por las CD esplénicas aumentó notablemente tras el tratamiento con IL-15, lo que sugiere que IL-15 modula la capacidad de las CD para polarizar las respuestas de los linfocitos T.

Resulta preferente asimismo que el transportador contenga un agente que active (y por consiguiente provoque la maduración de) las células dendríticas para la presentación óptima de los péptidos de AOF/PRLi en los linfocitos T. El adyuvante puede poseer esta propiedad. Como se ha descrito previamente, los oligodesoxinucleótidos CpG no metilados y poli(I:C) cumplen con ese fin. El peptidoglicano bacteriano y los lipopolisacáridos activan también las células dendríticas. Sin embargo, tienen que aislarse y purificarse a partir de las bacterias. Por consiguiente, para este fin resultan preferentes los oligodesoxinucleótidos CpG metilados o el ácido poliinosínico:ácido policitídílico, puesto que como transportadores químicamente sintéticos, activarán las células dendríticas para que puedan presentar de manera óptima los péptidos de AOF/PRLi presentes en el transportador a los linfocitos T sin tener una desventaja potencial desde el punto de vista de la contaminación microbiana.

Como se ha descrito previamente, los liposomas son vehículos de administración adecuados para los epítomos y derivados de AOF de la presente invención. Los liposomas compuestos por ésteres fosfolípidos naturales o sintéticos (liposomas convencionales) se conocen por ser eficaces como inmunoadyuvantes y como transportadores de vacunas (White, y col., *Vaccine* 13:1111-1122 (1995); Guan y col., *Bioconjugate Chem.* 9:451-458 (1998)). Se ha autorizado una vacuna para uso humano basada en liposomas contra la hepatitis A (Ambrosch, y col., *Vaccine* 15:1209-1213 (1997)). Los liposomas catiónicos estéricamente estabilizados (LCEE) se han utilizado para potenciar significativamente la eficacia terapéutica de CpG ODN mediante el aumento de la biodisponibilidad y duración de la acción de CpG ODN. La encapsulación de CpG ODN en liposomas catiónicos estéricamente estabilizados proporciona una protección de nucleasas séricas al tiempo que facilita la captación por los linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. En un modelo de inmunización, la coencapsulación de CpG ODN con antígeno de proteína (Ag) aumenta el IFN-gamma específico de Ag y las respuestas de IgG en 15-40 veces en comparación con solamente Ag más CpG ODN (Gursel, y col., *J. Immunol.* 167:3324-3328 (2001)).

Ha habido una serie de enfoques para mejorar la acción inmunoadyuvante de los liposomas, algunos de los cuales implican la modificación de la estructura liposomal. Se ha demostrado que los transportadores cargados positivamente y de tamaño pequeño se recogen preferentemente por las células fagocíticas, tales como CDs/macrófagos y provocan una respuesta de LTC significativa. Se cree que los mecanismos por los que la proteína liposomalmente encapsulada/antígenos peptídicos se dirige al citosol dan lugar a un escape pasivo del antígeno de los endosomas en el citoplasma en el que acceden a la vía de procesamiento del CMH de clase I (Zhou y col., *Immunobiology* 190:35-52 (1994)). Sin embargo, una secuencia peptídica, denominada homeodominio de antennapedia (HDAntp), puede introducir eficazmente epítomos de LTC en la vía de procesamiento de clase I e inducir LTC *in vivo*. Chikh, y col., *J. Immunol.* 167:6462-6470 (2001), describen una vacuna que utiliza un péptido recombinado que consiste en un epítomo de LTC, que se une a las moléculas del CMH de clase I, y un vector peptídico, HDAntp, que puede administrar péptidos en el citosol de las células, en el que se procesan por el complejo proteasoma. El aumento de la respuesta de LTC inducida por el péptido fusionado con HDAntp en liposomas se relaciona con este transporte activo a la vía de procesamiento de clase I. Además, la adición de secuencias inmunoestimulantes CpG ODN aumenta aún más la respuesta de linfocitos T CD8⁺. Esta estrategia que combina los transportadores basados en lípidos con el péptido HDAntp para orientar selectivamente Ags poco inmunogénicos en la vía de procesamiento del CMH clase I representa un enfoque plausible para vacunas de LTC que pueden presentar aplicaciones importantes en el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

Además, los éter glicerolípidos únicos de *Archaea* pueden formularse en vesículas (arqueosomas) con fuerte actividad adyuvante para la presentación por CMH de clase I y clase II (Krishnan, *J. Immunol.* 165:5177-5185 (2000)). Estos investigadores descubrieron que la inmunización de ratones con ovoalbúmina (OVA) atrapada en arqueosomas causó una potente respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de Ag, medida por la producción de IFN-gamma y la actividad citolítica con respecto al epítomo de LTC OVA inmunodominante (aa 257-264). Curiosamente, se generó una respuesta de LTC a largo plazo con una dosis baja de Ag incluso en ratones carentes de linfocitos T CD4⁺, lo que indica que los arqueosomas podrían mediar una potente respuesta de linfocitos T CD8⁺ independientes del linfocito T auxiliar. Por consiguiente, la administración de proteínas en arqueosomas autoadyuvantes representa una estrategia útil para la orientación selectiva de antígenos exógenos a la vía del CMH de clase I para la inducción de la respuesta de LTC. De esa forma, varios tipos de vesículas resultan útiles como transportadores para los agentes inmunoterapéuticos de la presente invención.

Los epítomos de AOF pueden administrarse sin un adyuvante. En ciertas realizaciones, los epítomos se unen o conjugan con un grupo lipófilo y se administran como una vacuna lipopeptídica. Véanse, Gahery-Segard, y col., *J. Virol.* 74:1694-1703 (2000); Gras-Masse, *Mol. Immunol.* 38:423-431 (2001); Vitello, y col., *J. Clin. Invest.* 95:341-349 (1995); BenMohamed, y col.; *Immunology* 106:113-121 (2002); y Schild, y col., *J. Exp. Med.* 174:1665-1668 (1991) (indica que un lipopéptido del virus de la gripe sin adyuvante adicional provocó respuestas T citotóxicas (Tc) específicas del virus de la gripe mientras que el péptido correspondiente sin un resto lipídico no las provocó). Ejemplos de grupos lipófilos incluyen N-épsilon-palmitoil-L-lisilamida y α -ácido aminohexadecanoico. Los péptidos unidos covalentemente al resto de N-épsilon-palmitoil lisina han demostrado activar los macrófagos e inducir la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-6, y FNT- α (Rouaix, y col., *Vaccine* 12:1209-14 (1994)). Los lipopéptidos también parecen orientar selectivamente las células dendríticas (Tsunoda, y col., *Vaccine* 17:675-685 (1999), que indican que en un estudio comparativo con un péptido bipalmitoilado y su análogo péptido no lipídico, el análisis inmunohistológico del tejido de ratones inmunizados reveló los macrófagos y el lipopéptido asociado a las células dendríticas, pero no su análogo no lipídico, e implicó células dendríticas en el procesamiento y presentación de las partículas de lipopéptidos en los linfocitos T). Las células dendríticas, a diferencia de los macrófagos, son únicas en su capacidad para preparar linfocitos T vírgenes contra antígenos solubles administrados en ausencia de un adyuvante (Banchereau, y col., *Nature* 392:245-52 (1998)). Resulta cada vez más evidente que la manipulación de la respuesta inmunitaria para fines de vacunación requiere vías de inmunización que permitan la captación eficaz de antígenos por las células dendríticas. (Mowat, *Immunol. Lett.* 65:133-40 (1999)). Un estudio ha demostrado que las células dendríticas derivadas de la médula ósea requieren un modelo lipopéptido más eficiente que los macrófagos (BenMohamed, y col., *The Lancet Infect. Dis.* 2:425-31 (2002)). La conjetura es que esto puede deberse a que el resto de palmitoil de los lipopéptidos se fusiona con los componentes lípidos de las membranas celulares y, posteriormente, los lipopéptidos se administran en el citoplasma de las células dendríticas (BenMohamed, y col., *Vaccine* 18:2843-55 (2000); Andrieu, y col., *Eur. J. Immunol.* 30:3256-65 (2000)). Además de la unión e introducción a las células dendríticas para la presentación, se ha demostrado que los lipopéptidos interactúan con el receptor tipo Toll 2 (Nishiguchi, y col., *J. Immunol.* 166:2610-16 (2001)) en la célula dendrítica y así inducen la maduración de las células dendríticas requerida para la presentación óptima de antígenos en los linfocitos T.

La modificación de un péptido por unión a moléculas lipófilas, tales como N-épsilon-palmitoil-L-lisilamida o ácido α -aminohexadecanoico (péptido mono-palmitoil) se puede lograr por procedimientos convencionales de síntesis y caracterización de péptidos. Véanse, Loing, y col., *J. Immunol.* 164:900-907 (2000); y Deprez, y col., *Vaccine* 14:375-382 (1996). Por ejemplo, la cola lipídica puede unirse a posteriori mediante ligamento quimioselectivo, lo que implica el acoplamiento de fragmentos moleculares completamente desprotegidos por dos grupos funcionales mutua y exclusivamente reactivos. Véase, Gras-Masse, *Mol. Immunol.* 38:423-431 (2001). Estos enfoques proporcionan una fabricación escalable y vacunas sintéticas económicas. Los lipopéptidos producidos por esta metodología se indican para inducir tanto una fuerte respuesta de linfocitos Tc CD8⁺ como los lipopéptidos tri-palmitoil producidos previamente (BenMohamed (2002), *supra*). También, se ha indicado que dichos lipopéptidos inducen respuestas de

linfocitos Th CD4+ (Pialoux, y col., *AIDS* 15:1239-1249. (2001)). Se indica que los lipopéptidos mono-palmitoil se toleran por el huésped sin reacción local alguna a la vacuna de lipopéptidos sintética (BenMohamed (2000), y Schild, y col., *supra.*, y BenMohamed, y col., *Immunol.* 106:113-121 (2002)) en modelos animales y en voluntarios humanos (Seth, y col., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:337-43 (2000c)). Este enfoque mono-palmitoil, por lo tanto, parece ofrecer ventajas únicas en seguridad, costo, pureza y simplicidad de construcción y evita la necesidad de adyuvantes de vacunas tóxicas (Gupta, y col., *Vaccine* 13:1263-1276 (1995)).

En realizaciones preferentes, la composición de vacuna de la presente invención contiene una pluralidad (es decir, dos o más) lipopéptidos, cada uno de los cuales contiene un epítipo de AOF que induce Tc distintos. En otras realizaciones preferentes, la vacuna también contiene uno o más lipopéptidos que contienen un epítipo de AOF que induce Th. La secuencia de los epítipos se habrá confirmado en base a las proteínas del CMH de ALH que el paciente expresa. La administración, p. ej., por inyección intradérmica o subcutánea de esta mezcla de péptidos de AOF/PRLi conjugados con mono-palmitoil dará lugar a la captación y maduración de las células dendríticas que luego pueden presentar los péptidos en los linfocitos Tc y Th en los ganglios linfáticos que drenan el(los) sitio(s) de inmunización. Por consiguiente, las células dendríticas se orientarán selectivamente *in vivo* por los lipopéptidos.

Existen numerosas razones por las que se desea la inmunoterapia indicada por los epítipos de AOF de la presente invención para su uso en pacientes que padecen cáncer. En primer lugar, si los pacientes que padecen cáncer son inmunosuprimidos, la cirugía con anestesia y la posterior quimioterapia puede empeorar la inmunosupresión. La inmunoterapia apropiada en el periodo preoperatorio que utiliza las composiciones y los procedimientos de la presente invención puede prevenir o invertir la inmunosupresión. Esto podría dar lugar a un menor número de complicaciones infecciosas y a una cicatrización acelerada. En segundo lugar, el tamaño del tumor es mínimo tras la cirugía; por consiguiente, es más probable que la inmunoterapia sea eficaz en esta situación. En tercer lugar, las células tumorales tienden a eliminarse de la circulación como resultado de la cirugía; por consiguiente, la inmunoterapia eficaz aplicada en este momento puede eliminar estas células. Los usos preventivos y terapéuticos de la presente invención se dirigen a potenciar la inmunocompetencia de pacientes que padecen cáncer antes de, durante y/o después de la cirugía, e inducir inmunidad específica del tumor en las células cancerosas. Si bien el objetivo clínico final es la regresión y la erradicación total del cáncer, las realizaciones de la presente invención son eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral y la progresión de la enfermedad. Las composiciones que contienen los epítipos de AOF resultan útiles en la profilaxis o el tratamiento del cáncer en mamíferos. Los cánceres incluyen, entre otros, linfomas, sarcomas y carcinomas humanos, p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer del cuello del útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma; leucemias, p. ej., leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica (granulocítica) crónica y leucemia linfocítica crónica); y policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin y enfermedad de no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström y enfermedad de las cadenas pesadas.

La utilidad terapéutica de los epítipos y el derivado de AOF de la presente invención no se limita a usos *in vivo*. Las células dendríticas maduras expresan altos niveles de moléculas del CMH de clase I y clase II, así como altos niveles de varias moléculas coestimuladoras. Por consiguiente, las células dendríticas son potentes células presentadoras de antígeno para la inducción de la inmunidad mediada por linfocitos T. Pueden presentar eficientemente péptidos antigénicos unidos a proteínas del CMH a los linfocitos T. Las moléculas coestimuladoras pueden completar la señalización de la activación del péptido antigénico:linfocitos T inducidos por proteínas del CMH (Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, y M. Shlomchik. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing, Nueva York, págs. 307-309). Además, las células dendríticas transportan antígeno procesado que se halla en los ganglios linfáticos y en el bazo en los que se inducen las respuestas inmunitarias (Sallusto, y col., *Arthritis Res.* 4 Supl. 3:S127-132 (2002)). Las células dendríticas puras pueden producirse *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica de un paciente mamífero que padece cáncer (p. ej., humano) (Nair, y col., *Annals of Surgery* 235:540-549 (2002)). Por ejemplo, el cultivo de células (monocitos) mononucleares de sangre periférica de un paciente durante 7-8 días con FEC-G y IL-4, provocará que la diferenciación de los monocitos en las células dendríticas inmaduras puras, y el cultivo posterior en presencia del medio que contiene ARN bicatenario poli I:C induzca la maduración de las células dendríticas (Nair, *supra.*, Holtl, y col., *Clin. Cancer Res.* 8:3369-76 (2002) (indicada en la programación de las células dendríticas utilizando lisado de células tumorales)). Si se desea, las células dendríticas maduras autólogas pueden conservarse criogénicamente en nitrógeno líquido para su uso posterior con el paciente del que se obtuvieron.

Las células dendríticas maduras se cultivan con uno o más epítipos de AOF/PRLi que estimulan de manera específica los linfocitos Tc, y opcionalmente con uno o más epítipos que estimulan de manera específica los

linfocitos Th en condiciones adecuadas para programar las células dendríticas para potenciar la inmunidad (anti-cáncer) mediada por linfocitos T, p. ej., durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 37 °C. Los epítomos de AOF pueden añadirse a las células dendríticas en el medio o conjugarse a un transportador adyuvante de lípidos (Zhou, y col., *J. Immunother* 25:289-303 (2002)). El medio también puede contener coestimulantes tales como FNT-alfa, interleucinas y prostaglandina. En general, el(los) epítomo(s) de AOF se añade(n) al medio en cantidades de microgramos.

Tras la carga de células dendríticas de los péptidos de AOF/PRLi, al paciente se le administran las células dendríticas cargadas. En una realización, se administra al paciente aproximadamente 3×10^7 células dendríticas cargadas con péptido por medio de una inyección IV durante 2-3 minutos, seguido de la administración intradérmica de aproximadamente 1×10^6 células dendríticas autólogas cargadas con epítomo de AOF/PRLi en un volumen de aproximadamente 0,1 ml de plasma autólogo en la cara volar del antebrazo o el muslo, cada 4 semanas para cuatro inmunizaciones. Los expertos en la materia apreciarán que también resultarán útiles muchas variaciones de este régimen de tratamiento. Una dosis única de células dendríticas cargadas puede proporcionar un beneficio terapéutico. Incluso si los epítomos que se reconocen por los linfocitos Ts están involuntariamente presentes, la presentación de células dendríticas *in vivo* puede superar en realidad la inducción de las células supresoras. La presentación de células dendríticas de un antígeno nuclear autólogo rompe en efecto la autotolerancia con la activación de la inmunidad Th1 y la producción de anticuerpos IgG en ratones (Suen, y col., *Immunol.* 106:326-335 (2002)). Por consiguiente, la inmunización con células dendríticas maduras autólogas cargadas con el epítomo de AOF/PRLi puede potenciar la inmunidad conseguida con solamente las composiciones inmunoterapéuticas de la presente invención. La invención se describirá adicionalmente por referencia en los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos se proporcionan solamente para fines de ilustración, y no pretenden limitar el alcance de la invención descrita en el presente documento.

Ejemplos

Sumario de los epítomos de PRLi reconocidos por clones Tc y Ts CD8⁺ y Th1 CD4⁺ de ratones BALB/c, y protocolo experimental

Los epítomos reconocidos por 15 clones de linfocitos T reactivos por PRLi obtenidos a partir de cualquiera de los ratones BALB/c vírgenes, ratones BALB/c portadores de tumores de fibrosarcoma MCA1315, o de ratones BALB/c inmunizados con 1 o 10 µg de PRLi murina recombinante se determinaron al ensayar la proliferación de esos clones en péptidos superpuestos que abarcan la región de la molécula de PRLi reconocida por cada clon en presencia de IL-2, como un factor de crecimiento para linfocitos T y células de bazo singénicas deplecionadas en linfocitos T irradiadas como células presentadoras de antígeno. La proliferación se midió por la determinación ELISA por incorporación de 5-bromodesoxiuridina durante el cultivo.

Más específicamente, se determinó la especificidad del epítomo de los clones Th1, Tc, y Ts específicos de PRLi utilizando una modificación de la técnica ELISA por incorporación de 5'-bromodesoxiuridina (BrdU) descrita en Rohrer, J. W., A. L. Barsoum, D. L. Dyess, J. A. Tucker, y J. H. Coggin, Jr. 1999. *Human breast carcinoma patients develop clonable oncofetal antigen-specific effector and regulatory T lymphocytes*. *J. Immunol.* 162:6880, que emplea el ensayo por incorporación de BrdU de Biotrak (Amersham, Arlington Heights, IL). En pocas palabras, en el momento de la reestimulación de los clones, una parte de los linfocitos T clonados se analizó para la proliferación en las células presentadoras de antígeno (CPA) y en diversos péptidos de PRLi. El ensayo se realizó con 10.000 linfocitos T clonados viables/pocillo más 105 células de bazo singénicas irradiadas (CPA) más 100 ng/pocillo de proteína de PRLi/AOF intacto o las diversas proteínas de PRLi/AOF truncado o los diversos péptidos de PRLi/AOF en medio de Dulbecco modificado por Iscove (MDMI) que contiene 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina G, 100 µg de sulfato de estreptomocina, y suero de ternera fetal al 10 %. Las células se cultivaron durante un total de 48 horas. Tras 24 horas de cultivo, se añadió 5'-bromodesoxiuridina a una concentración final de 10 µM/pocillo. Las células se cultivaron durante otras 24 horas. Al final de las últimas 24 horas de incubación, las placas se centrifugaron a 300 x g durante 10 min, y se eliminó el etiquetado del medio. Las células se secaron a continuación a 60 °C durante 1 hora. Las células se fijaron con un fijador de etanol proporcionado en el kit Biotrak durante 30 min a temperatura ambiente, se eliminó el fijador, y los pocillos se recubrieron con tampón de bloqueo (proteína al 1 % en 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,4) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. El tampón de bloqueo se eliminó, se añadieron 100 µl de 1:100 de anticuerpo anti-BrdU etiquetado con peroxidasa diluida a cada pocillo y las placas se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente. La solución de anticuerpos se eliminó, y los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado. Se añadieron 200 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina en DMSO al 15 % (v/v) a cada pocillo y la placa se cubrió y se incubó a temperatura ambiente mientras oscilaba suavemente durante 5-30 min. Cuando se alcanzó la densidad de color requerida, la reacción se detuvo al añadir 25 µl de ácido sulfúrico 1M a cada pocillo y la placa se leyó en un lector microELISA a 450 nm.

Cada vez que se realizó el ensayo, los clones se estimularon por CPA y PRLi/AOF intacto como control positivo. Los linfocitos T clonados también se cultivaron en presencia de solo CPA en MDMI o en presencia de CPA y un péptido de PRLi/AOF o PRLi/AOF truncado conocido por no estimular los clones que se están ensayando. Estos sirvieron como controles negativos. En los pocillos en los que se incorporó BrdU (el PRLi/AOF estimula la proliferación de los linfocitos T), el A450 era al menos 10 veces y con frecuencia aproximadamente 50 veces mayor que los controles negativos. Debido a que los linfocitos Ts siempre se presentan con receptores aparentemente de baja afinidad de

antígenos de linfocitos T, la incorporación de BrdU obtuvo valores A450 aproximadamente 10 veces mayores que los controles negativos (p. ej., aproximadamente 0,2 frente a 0,02), pero aproximadamente 5 veces inferiores que los clones Th1 o Tc (p. ej., normalmente aproximadamente 0,9). La determinación de la parte de la proteína o péptido de PRLi/AOF truncado reaccionó en un clon obtenido realizado por el análisis del patrón de proliferación en las diversas proteínas o péptidos truncados. Se determinó entonces qué secuencia de aminoácidos se compartió por estas proteínas o péptidos truncados por PRLi que estimularon la proliferación de un clon de linfocitos T. La Tabla 2 muestra a continuación la distribución de los epítomos de los diversos tipos de clones de linfocitos T establecidos, deducidos a partir de la respuesta máxima. A pesar de que los linfocitos T citotóxicos (Tc) y los linfocitos Ts que secretan IL-10 son linfocitos T CD8 y están restringidos en el CMH de clase I, estos dos tipos de linfocitos T reconocen epítomos distintos en AOF.

TABLA 2

Clon de linfocito T específico para PRLi	Tipo de linfocito T	Región del aminoácido del epítomo de PRLi	Secuencia del epítomo de PRLi
M3	Tc	53-60	RTWEKLLL
L6	Tc	81-88	NTGQRAVL
L5	Tc	148-155	CNTDSPLR
L4	Tc	156-163	YVDIAIPC
L2	Tc	229-236	GEWTAPAP
L1	Ts	17-24	KLLAAGTH
H5	Ts	37-44	YIYKRKSD
M11	Ts	97-104	TPIAGRFT
H2	Ts	140-147	VNLPTIAL
H4	Ts	140-147	VNLPTIAL
H3	Th1	152-161	SPLRYVDIAI
NC1	Th1	229-238	GEWTAPAPEF
L3	Th1	241-250	AQPEVADWSE
M2	Th1	253-262	QVPSVPIQQF
H1	Th1	277-286	SAAPTAQATE
NC4	Th1	285-294	TEWVGATTDW

Análisis de la especificidad de diversos tipos de clones de linfocitos T reactivos en PRLi

Especificidad del clon Ts L1 que utiliza péptidos N-terminal Se produjo el solapamiento de péptidos 12-mer de los primeros 25 aminoácidos de PRLi murina. Por consiguiente, los péptidos 1-4 corresponden a los restos de aminoácidos 1-12, 5-16, 9-20 y 17-28 de PRLi murina. L1 es un clon Ts CD8 de ratón BALB/c que se estableció a partir de bazo de ratones inmunizados dos veces en intervalos de 2 semanas con partículas de nitrocelulosa conjugadas con AOF/PRLi (es decir, una dosis total de AOF/PRLi en cada inyección IP de 1 mcg). Los bazo se recogieron 2 semanas después de la última inmunización y las células del bazo se molieron y se lavaron por centrifugación, luego se cultivaron con 10^5 células tumorales de fibrosarcoma MCA1315 irradiadas durante dos semanas en presencia de IL-2, IL-6, e interferón gamma. Las células se clonaron limitando la dilución a 0,2 linfocitos T reactivos del tumor/pocillo en presencia de 10^5 células del bazo singénicas irradiadas y 10^5 células de fibrosarcoma MCA1315 singénicas irradiadas en un medio que contiene IL-2 murina recombinante, IL-6 murina recombinante e IFN-gamma murino recombinante al utilizar el procedimiento descrito en Rohrer y col., 1995, *J. Immunol.* 154:2266. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Incorporación de BrdU (A ₄₅₀) de células del clon L1 del linfocito T específico para PRLi tras la exposición a diversos péptidos derivados de PRLi			
Estimulante	Secuencia aa de PRLi	Exp. 1	Exp. 2
Medio		,007	,009
Proteína 13 truncada de PRLi	aa 242-295	,016	,014
PRLi intacta	aa 1-295	,20	,23
Péptido 1	MSGALDVLQMKE	,018	,020
Péptido 2	LDVLQMKEEDVL	,017	,019
Péptido 3	QMKEEDVLKLLA	,09	,07
Péptido 4	KLLAAGTHLGGT	,28	,27

5 El clon L1 prolifera en un péptido contenido casi por completo en el péptido 4, aunque reacciona en cierto modo también en el péptido 3, pero un tetrapéptido es común en ambos. El epítipo que estimulará al máximo el clon L1 se deduce como KLLAAGTH. Los resultados de un análisis de la especificidad de los clones de linfocitos T específicos para PRLi reactivados en péptidos de PRLi que abarcan los restos de aminoácidos 26-61 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Estimulante	Clones de linfocitos T CD8	
	M3 (Tc)	H5 (Ts)
Medio	,008; ,009	,005; ,007
P15 (aa 81-92)	,018; ,017	,017; ,018
PRLi intacta	,27; ,30	,23; ,26
P1 (aa 25-36)	,017; ,02	,017; ,016
P2 (aa 29-40)	,02; ,021	,016; ,018
P3 (aa 33-44)	,017; ,019	,23; ,25
P4 (aa 37-48)	,02; ,018	,22; ,25
P5 (aa 41-52)	,018; ,021	,017; ,018
P6 (aa 45-56)	,017; ,021	,021; ,015
P7 (aa 49-60)	,25; ,28	,019; ,016
P8 (aa 53-64)	,27; ,30	,017; ,018
P9 (aa 57-68)	,018; ,021	,017; ,016

10 Resultó que el clon M3 estaba respondiendo a un epítipo entre los aminoácidos 49 y 64 mientras que el clon H5 estaba respondiendo a un epítipo entre los aminoácidos 33 y 48. Una vez más, se demostró que distintos epítipos estaban observándose por medio de los clones Tc y Ts.

Análisis de la especificidad de los clones de linfocitos T específicos para PRLi reactivos en péptidos de PRLi que abarcan los aminoácidos 62-135

15 El mismo ensayo de proliferación descrito previamente se llevó a cabo con el clon L6 de linfocitos T citotóxicos CD8 y el clon M11 Ts. Los resultados del ensayo de proliferación para el clon L6 con respecto a las proteínas truncadas del mutante de delección de PRLi mostraron que se reconoció un epítipo entre los aminoácidos 62 y 135 mientras que los resultados del ensayo de proliferación con respecto a la proteínas truncadas del mutante de delección de PRLi del clon M11 mostraron que respondió a algunos epítipos contenidos entre los aminoácidos 81 y 135. Los

resultados del ensayo de proliferación de estos dos clones en el péptido 12-mer de PRLi que abarcan la región del aminoácido 62-135 se llevó a cabo para definir los epítomos de cada clon y para determinar si una vez más los linfocitos Tc y Ts reconocieron distintos epítomos. Los resultados se muestran en la Tabla 5, y en la Tabla 6 se muestran los epítomos deducidos de los diversos clones.

5

Tabla 5

Estimulante	Clones de linfocitos T CD8 específicos de PRLi	
	L6 (Tc)	M11 (Ts)
Medio	,007; ,008	,006; ,008
P3 (33-44)	,016; ,017	,015; ,014
PRLi intacta	,95; ,96	,21; ,19
P10 (aa 61-72)	,017; ,017	-
P11 (aa 65-76)	,015; ,016	-
P12 (aa 69-80)	,02; ,015	-
P13 (aa 73-84)	,016; ,018	-
P14 (aa 77-88)	,96; ,94	,015; ,017
P15 (aa 81-92)	,95; ,92	,015; ,016
P16 (aa 85-96)	,02; ,017	,014; ,017
P17 (aa 89-100)	,015; ,017	,015; ,016
P18 (aa 93-104)	,017; ,02	,21; ,18
P19 (aa 97-108)	,015; ,014	,23; ,15
P20 (aa 101-112)	,016; ,018	,017; ,02
P21 (aa 105-116)	,02; ,017	,017; ,014
P22 (aa 109-120)	,02; ,015	,014; ,016
P23 (aa 113-124)	,015; ,016	,015; ,016
P24 (aa 117-128)	,016; ,017	,015; ,017
P25 (aa 121-132)	,017; ,016	,017; ,015
P26 (aa 125-136)	,016; ,015	,015; ,018

Tabla 6

Péptidos de PRLi que inducen la proliferación del clon de los linfocitos T	
P3 (aa 33-44)	QMEQYIYKRKSD
P4 (aa 37-48)	YIYKRKSDGIYI
P7 (aa 49-60)	INLKRTWEKLLL
P8 (aa 53-64)	RTWEKLLLAARA
P14 (aa 77-88)	ISSRNTGQRAVL
P15 (aa 81-92)	NTGQRAVLKFAA
P18 (aa 93-104)	ATGATPIAGRFT
P19 (aa 97-108)	TPIAGRFTPGTF

El clon H5 (un clon Ts) proliferó por igual en los péptidos 3 y 4 de PRLi. La secuencia común en esos péptidos es YIYKRKSD (aminoácidos 37-44). Por lo tanto, se dedujo que el clon H5 reconoce que el epítipo de PRLi de 8 aminoácidos se expuso por una proteína del CMH de clase I H-2d.

5 El clon M3 (un clon Tc) proliferó por igual en los péptidos 7 y 8 de PRLi. La secuencia común en esos péptidos es RTWEKLLL (aminoácidos 53-60). Por lo tanto, se dedujo que la secuencia de 8 aminoácidos es el epítipo expuesto por una proteína del CMH de clase I H-2d que se reconoce por el clon M3 Tc. M3 debe tener un RALT de baja afinidad, ya que no proliferó mejor en PRLi de lo que hicieron los clones Ts.

10 El clon L6 (un clon Tc) proliferó por igual en los péptidos 14 y 15 de PRLi. La secuencia común de esos péptidos es NTGQRAVL (aminoácidos 81-88). Por lo tanto, se dedujo que esa secuencia de 8 aminoácidos es el epítipo de PRLi expuesto por una proteína del CMH de clase I H-2d que se reconoce por el clon L6 Tc.

15 El clon M11 (un clon Ts) proliferó por igual en los péptidos 18 y 19 de PRLi. La secuencia común de esos péptidos es TPIAGRFT (aminoácidos 97-104). Por lo tanto, se dedujo que esa secuencia de 8 aminoácidos es el epítipo de PRLi expuesto por una proteína del CMH de clase I H-2d que se reconoce por el clon M11 Ts. Se planteó la pregunta de si los clones que parecen ser específicos para unos epítipos contenidos entre los aminoácidos 136 y 166 responden mediante la proliferación de células presentadoras de antígeno que presentan 30-mer procesado que tiene la secuencia de aa 136-166 de PRLi. Para responder a esta pregunta, el ensayo de proliferación se realizó como se ha indicado previamente excepto que se utilizaron los clones H3 (Th1), H2 y H4 (Ts), y L4 y L5 (Tc). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Incorporación de BrdU (A ₄₅₀) de clones específicos para PRLi determinados de forma deductiva para que sean reactivos en epítipos de aa 136-166 cuando se estimulan por esa secuencia o controles.				
Clon	Medio	Proteína 13 de PRLi troncada (aa 242-95)	PRLi intacta	Péptido de PRLi (aa 136-166)
H3 (Th1)	,008	,017	,94	,91
H2 (Ts)	,008	,015	,26	,24
H4 (Ts)	,008	,016	,23	,21
L4 (Tc)	,007	,017	,89	,90
L5 (Tc)	,008	,015	,92	,87

20 Los clones cuyos patrones de reactividad en las diversas proteínas de PRLi troncada sugirieron una especificidad en los aminoácidos 136-166, proliferan en el péptido 30-mer que es la secuencia de aa 136-166 (EASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNK). Aunque hubo una diferencia de aproximadamente 4,5 veces entre la incorporación de BrdU del clon Th1 o Tc y los clones Ts, los datos para el clon Ts son 10 veces superiores que el péptido de PRLi irrelevante inducido en cualquiera de los clones. La diferencia entre la proliferación de los clones Th1 o Tc y Ts se debía probablemente a la afinidad del receptor de antígeno de linfocitos T para PRLi: autoCMH. En experimentos anteriores, utilizando 75-100 ng/pocillo de proteína de PRLi/AOF para estimular la proliferación, una dosis estaba próxima a la meseta de la dosis-respuesta para los clones Th1 y Tc portadores del receptor de alta afinidad, pero apenas es capaz de inducir la proliferación medible (³H-timidina o incorporación de BrdU) de los linfocitos T portadores del receptor de baja afinidad (compuesta por algunos de los clones Th1 y Tc y todos los clones Ts que secretan IL-10).

Análisis de las regiones adicionales de PRLi murina: identificación de los epítipos contenidos entre los aminoácidos 136 y 166

35 Se utilizó el ensayo por incorporación de BrdU para la proliferación descrita en los ensayos previos. Los clones H3, H2, H4, L4, y L5 proliferan en respuesta al péptido 30-mer de PRLi 136-166 expuesto en las células del bazo singénicas irradiadas por rayos x en presencia de 100 U/ml de IL-2 murina recombinante, se ensayaron para su proliferación superponiendo péptidos 12-mer que incluyen la secuencia de aminoácidos del péptido de PRLi 136-166. Los resultados y los péptidos utilizados en los experimentos se muestran en las Tablas 8 y 9, respectivamente.

Tabla 8

Incorporación de BrdU (A ₄₅₀) de los clones de linfocitos T específicos para el péptido de PRLi 136-166 en varios péptidos que abarcan esa parte de la proteína de PRLi									
Clon de linfocito T	Estímulo								
	MDMI	Proteína 13 de PRLi truncada (242-295)	Proteína de PRLi intacta (1-295)	Péptido de PRLi 31-1 (136-147)	Péptido de PRLi 31-2 (140-151)	Péptido de PRLi (31-3 (144-155)	Péptido de PRLi 31-4 (148-159)	Péptido de PRLi 31-5 (152-163)	Péptido de PRLi 31-6 (156-167)
H3 (Th1)	,007	,015	,88	,016	,015	,016	,81	,95	,03
H2 (Ts)	,008	,017	,20	,023	,22	,015	,016	,016	,015
H4 (Ts)	,008	,018	,21	,022	,24	,017	,016	,016	,016
L4 (Tc)	,009	,017	,89	,015	,018	,016	,023	,91	,90
L5 (Tc)	,007	,016	,90	,017	,016	,90	,89	,024	,015

Tabla 9

Secuencia de aminoácidos de la superposición de péptidos 12-mer del péptido de PRLi 136-166		
PRLi 12-mers	Intervalo aa	Secuencia aa
31-1	136-147	EASYVNLPTIAL
31-2	240-151	VNLPTIALCNTD
31-3	144-155	TIALCNTDSPLR
31-4	148-159	CNTDSPLRYVDI
31-5	152-163	SPLRYVDIAIPC
31-6	156-167	YVDIAIPCNNKG

El clon L4 Tc proliferó en los péptidos 31-5 y 31-6 equitativamente, por lo que se dedujo que la secuencia YVDIAIPC, que es común en ambos péptidos, es un epítipo reconocido de manera específica por ese clon en PRLi. Del mismo modo, la misma respuesta proliferativa del clon L5 Tc en los péptidos 31-3 y 31-4 sugiere ampliamente que un epítipo reconocido de manera específica por este clon es la secuencia común a estos dos péptidos (es decir, CNTDSPLR). Los clones H2 y H4 Ts proliferaron equitativamente en los péptidos 31-1 y 31-2. Por consiguiente, se dedujo que estos dos clones reconocen de manera específica la secuencia de 8 aminoácidos común a estos 2 péptidos, a saber, VNLPTIAL. En cuanto al clon H3 Th1, la respuesta más potente se produjo en el péptido 31-5 con una respuesta ligeramente inferior a 31-4. Por lo tanto, se dedujo que el epítipo que posee la secuencia SPLRYVDIAI se reconoció de manera específica por el clon H3. Esta secuencia está completamente presente en el péptido 31-5, aunque el péptido 31-4 carece de los dos últimos aminoácidos de ese péptido. Los epítipos deducidos que proporcionan la estimulación máxima en los clones de linfocitos T ensayados se exponen en la Tabla 10.

Tabla 10

Epítipos de PRLi propuestos para los clones de los linfocitos T reactivos 136-166 del péptido de PRLi	
Clon de linfocito T	Epítipo de PRLi propuesto
H3 (Th1)	SPLRYVDIAI (aa 152-161)
H2 (Ts)	VNLPTIAL (aa 140-147)
H4 (Ts)	VNLPTIAL (aa 140-147)
L4 (Tc)	YVDIAIPC (aa 156-163)
L5 (Tc)	CNTDSPLR (aa 148-155)

Inicialmente, parecía que 1 clon Th1, 2 Ts y 2 Tc respondían a epítipos contenidos en el péptido 30-mer de PRLi compuesto por los aminoácidos 136-166. Sin embargo, una vez analizada adicionalmente la región utilizando péptidos 12-mer que abarcan la región 30-mer, se encontraron distintos epítipos de los linfocitos T reguladores y los linfocitos T efectores (Th1 y Tc). Los dos clones Ts respondieron a un epítipo compuesto por los aminoácidos 140-147, mientras que los dos clones Tc respondieron a epítipos compuestos por los aminoácidos 148-155 y 156-163, respectivamente. El clon Th1 respondió a un epítipo que unió mediante puentes los dos epítipos Tc (aminoácidos 152-161). Por lo tanto, fue sorprendente descubrir que los clones Ts inmunorreguladores respondieron a diferentes epítipos de los linfocitos Tc a pesar de que ambos tipos de linfocitos son clones CD8 específicos para PRLi restringidos por CMH de clase I.

Análisis de la especificidad del clon de linfocitos Th1 específico para PRLi reactivo en el péptido de PRLi que abarca los aminoácidos 168-242

Como había ocurrido anteriormente, los ensayos de proliferación que utilizan la medición ELISA por incorporación de BrdU para medir la proliferación de los linfocitos T cultivados con diversos péptidos de PRLi y células del bazo singénicas irradiadas deplecionadas por linfocitos T como células presentadoras de antígenos, se realizó todo en un medio que contenía 100 U/ml de IL-2. Los clones se introdujeron con células presentadoras de antígeno y 100 ng/pocillo de un péptido de PRLi irrelevante como control negativo, la proteína de PRLi intacta como control positivo, o la superposición de péptidos 12-mer de PRLi que abarcó la región 168-242 de AOF. Tras 24 horas, se añadió

BrdU y el cultivo continuó durante otras 24 horas, momento en que las células se recogieron y se ensayaron para la incorporación de BrdU según las instrucciones del sistema de proliferación celular ELISA Biotrak. Los datos presentados a continuación en la Tabla 11 son las lecturas de A₄₅₀ en los pocillos tras haberse completado el ensayo. Los epítomos de AOF se muestran en la Tabla 11a.

5

Tabla 11

Resultados de proliferación del clon NC1 Th1 y clon L2 Tc en péptidos de PRLi		
Estimulante	Clon NC1 Th1	Clon L2 Tc
Medio	,07; ,008	,008; ,009
P32 (aa 285-295)	,015; ,017	,016; ,02
PRLi intacta	,24; ,27	,93; ,91
P1 (161-172)	,016; ,015	,015; ,019
P2 (165-176)	,017; ,014	,02; ,018
P3 (169-180)	,016; ,014	,017; ,014
P4 (173-184)	,015; ,017	,018; ,02
P5 (177-188)	,017; ,016	,014; ,017
P6 (181-192)	,015; ,018	,015; ,016
P7 (185-196)	,014; ,017	,016; ,02
P8 (189-200)	,015; ,016	,014; ,02
P9 (193-204)	,016; ,018	,017; ,019
P10 (197-208)	,014; ,018	,015; ,017
P11 (201-212)	,014; ,017	,014; ,016
P12 (205-216)	,018; ,015	,017; ,015
P13 (209-220)	,017; ,015	,017; ,02
P14 (213-224)	,015; ,017	,014; ,016
P15 (217-228)	,014; ,016	,015; ,017
P16 (221-232)	,016; ,015	,017; ,02
P16 (221-232)	,016; ,015	,017; ,02
P17 (225-236)	,16; ,17	,96; ,94
P18 (229-240)	,25; ,28	,95; ,97
P19 (233-244)	,015; ,017	,016; ,018

Tabla 11a

Identificación de los clones NC1 y L2 de las secuencias peptídicas de PRLi		
Péptido	Intervalo del aminoácido	Secuencia
P17	aa 225-236	EEFQGEWTAPAP
P18	aa 229-240	GEWTAPAPEFTA

10

Los péptidos unidos al CMH de clase II tienden a variar en su longitud entre 8 y 30 aminoácidos. La mayoría de los epítomos del péptido unidos al CMH de clase II poseen 9-11 aminoácidos de longitud; la longitud del epítomo reconocida por el clon NC1 Th1 era de 10 aminoácidos. Debido a que el clon respondió mejor en el péptido 18, pero de forma significativa en el péptido 17, se dedujo que el clon NC1 reconoció el epítomo GEWTAPAPEF. El péptido

17 posee todo eso, excepto los dos últimos aminoácidos E y F. La proliferación incluso en estos péptidos así como en PRLi intacta fue menor a la observada habitualmente con linfocitos Th. Sin embargo, el clon NC1 se obtuvo a partir de un ratón que nunca se había inmunizado con PRLi, pero solo tenía este clon presente en su bazo. Por lo tanto, era un linfocito T virgen, no un linfocito T de memoria, por lo que reconoció que su receptor de antígeno de linfocitos T tuvo una reacción de afinidad menor con el péptido de PRLi. Ya que el clon L2 Tc CD8 proliferó de forma idéntica en los péptidos 17 y 18, el epítipo deducido para el clon L2 Tc era la secuencia de 8 aminoácidos común a esos péptidos, a saber, GEWTAPAP.

Análisis de la especificidad de los clones de linfocitos Th1 específicos para PRLi reactivos en el péptido de PRLi que abarca los aminoácidos 243-295

10 Como había ocurrido anteriormente, se realizaron ensayos de proliferación que utilizan la medición ELISA por incorporación de BrdU para medir la proliferación de los linfocitos T cultivados con diversos péptidos de PRLi y células de bazo singénicas irradiadas deplecionadas por linfocitos T como células presentadoras de antígeno, se realizó todo en un medio que contenía 100 U/ml de IL-2. Las células clonadas se cultivaron con células presentadoras de antígeno y 100 ng/pocillo de un péptido de PRLi irrelevante como control negativo, la proteína de PRLi intacta como control positivo, o la superposición de péptidos 12-mer de PRLi que abarcaban la región 243-295. 15 Tras 24 horas, se añadió BrdU y el cultivo continuó durante otras 24 horas, momento en que las células se recogieron y se ensayaron para la incorporación de BrdU según las instrucciones del sistema de proliferación celular ELISA Biotrak. Los datos presentados a continuación en la Tabla 12 son las lecturas de A₄₅₀ en los pocillos tras haberse completado el ensayo. Los epítipos deducidos se exponen en la Tabla 13.

20 Tabla 12

Resultados de proliferación (A ₄₅₀) de los clones Th1 en péptidos de PRLi				
Estimulante	Clones Th1			
	NC4	M2	H1	L3
Medio	,005; ,08	,007; ,008	,007; ,005	,008; ,009
P1 (161-172)	,017; ,015	,017; ,018	,015; ,02	,02; ,015
PRLi intacta	,23; ,27	,87; ,91	,95; ,96	,95; ,98
P19 (233-244)	,017; ,014	,017; ,02	,018; ,02	,019; ,015
P20 (237-248)	,015; ,016	,015; ,019	,019; ,018	,85; ,83
P21 (241-252)	,015; ,016	,018; ,017	,02; ,02	,96; ,98
P22 (245-256)	,015; ,017	,017; ,016	,019; ,017	,018; ,02
P23 (249-260)	,018; ,014	,81; ,83	,017; ,016	,02; ,016
P24 (253-264)	,017; ,015	,93; ,95	,016; ,02	,017; ,016
P25 (257-268)	,018; ,014	,018; ,02	,016; ,02	,017; ,02
P26 (261-272)	,015; ,017	,02; ,015	,02; ,015	,016; ,019
P27 (265-276)	,017; ,014	,015; ,018	,017; ,015	,015; ,018
P28 (269-280)	,015; ,016	,019; ,02	,016; ,017	,016; ,018
P29 (273-284)	,014; ,016	,02; ,017	,85; ,83	,014; ,017
P30 (277-288)	,015; ,018	,016; ,017	,96; ,98	,014; ,02
P31 (281-292)	,17; ,15	,016; ,018	,015; ,019	,02; ,02
P32 (285-295)	,28; ,26	,016; ,02	,02; ,017	,017; ,018

Tabla 13

Identificación de los clones N4, M2, H1 y L3 de las secuencias peptídicas de PRLi		
Péptido	Intervalo del aminoácido	Secuencia

(continuación)

Identificación de los clones N4, M2, H1 y L3 de las secuencias peptídicas de PRLi		
Péptido	Intervalo del aminoácido	Secuencia
P20	aa 237-248	EFTAAQPEVADW
P21	aa 241-252	AQPEVADWSEGV
P23	aa 249-260	SEGVQVPSVPIQ
P24	aa 253-264	QVPSVPIQQFPT
P29	aa 273-284	TEDWSAAPTQAQA
P30	aa 277-288	SAAPTAQATEWV
P31	aa 281-292	TAQATEWVGATT
P32	aa 285-295	TEWVGATTDWS

5 Ya que el clon NC4 respondió mejor en el péptido 32, pero de manera significativa en el péptido 31, se dedujo que el clon NC4 reconoció el epítipo TEWVGATTDW (aminoácidos 285-294). El péptido 31 posee todo eso excepto los dos últimos aminoácidos D y W. Al igual que la proliferación de NC1 en PRLi intacta o péptidos de PRLi apropiada, la proliferación de NC4 en estos péptidos así como en PRLi intacta fue inferior a lo que se observó con los otros linfocitos Th analizados. Esto se debe a que tanto NC1 como NC4 eran clones obtenidos a partir de ratones normales y por lo tanto, sin linfocitos T de memoria y así tuvieron una menor afinidad de unión a PRLi. Debido a que el clon M2 respondió mejor en el péptido 24, pero de manera significativa en el péptido 23, se dedujo que el clon M2 reconoció el epítipo QVPSVPIQQF (aminoácidos 253-262). El péptido 23 posee todo eso excepto los dos últimos aminoácidos Q y F. Ya que el clon H1 respondió mejor en el péptido 30, pero de manera significativa en el péptido 29, se dedujo que el clon H1 reconoció el epítipo SAAPTAQATE (aminoácidos 277-286). El péptido 29 posee todo eso excepto los dos últimos aminoácidos T y E. Ya que el clon L3 respondió mejor en el péptido 21, pero de manera significativa en el péptido 20, se dedujo que el clon L3 reconoció el epítipo AQPEVADWSE (aminoácidos 241-250). El péptido 20 posee todo eso excepto los dos últimos aminoácidos S y E.

15 *Confirmación de la unión del epítipo peptídico a las proteínas de clase I H-2^d.*

20 El uso de un programa informático desarrollado por la Universidad de Tubinga, disponible por internet para la identificación de la unión potencial de epítipos en base a los motivos particulares del CMH, se comprobó la secuencia de aminoácidos del péptido 30-mer de AOF/PRLi que contiene los aminoácidos 136-166 de los motivos unidos a L^d. Véase la Tabla 14. Ya que los epítipos para los clones Ts y Tc han demostrado ser reactivos con esta región, los resultados del presente análisis muestran que los mismos epítipos reaccionarán con la molécula de clase I L^d.

Tabla 14

Clones de linfocitos T reactivos y motivo de anclaje H2-Ld			
31-1	aa136-147	EASYVNLPTIAL	Ts
31-2	aa140-151	VNLPTIALCNTD	Ts
31-3	aa144-155	TIALCNTDSPLR	Tc
31-4	aa148-159	CNTDSPLRYVDI	Tc y TH1
31-5	aa152-163	SPLRYVDIAIPC	Tc y TH1
31-6	aa156-167	YVDIAIPCNNKG	Tc
Puntuación de unión			
31-1	aa136-147	<u>EASYVNLPTIAL</u> 2	Ts
		EASYVNLPTIAL 17	Ts
		EASYVNLPTIAL 1	Ts

(continuación)

Puntuación de unión

		<u>EASYVNLPTIAL</u>	12	Ts
31-2	aa140-151	<u>VNLPTIALCNTD</u>	2	Ts
		<u>VNLPTIALCNTD</u>	2	Ts
		<u>VNLPTIALCNTD</u>	15	Ts
		<u>VNLPTIALCNTD</u>	1	Ts
31-3	aa144-155	<u>TIALCNTDSPLR</u>	3	Tc
		<u>TIALCNTDSPLR</u>	1	Tc
		<u>TIALCNTDSPLR</u>	10	Tc
		<u>TIALCNTDSPLR</u>	1	Tc
31-4	aa148-159	<u>CNTDSPLRYVDI</u>	2	Tc y TH1
		<u>CNTDSPLRYVDI</u>	2	Tc y TH1
		<u>CNTDSPLRYVDI</u>	5	Tc y TH1
		<u>CNTDSPLRYVDI</u>	17	Tc y TH1
31-5	aa152-163	<u>SPLRYVDIAIPC</u>	11	Tc y TH1
		<u>SPLRYVDIAIPC</u>	6	Tc y TH1
		<u>SPLRYVDIAIPC</u>	2	Tc y TH1
31-6	aa156-167	<u>YVDIAIPCNNKG</u>	2	Tc
		<u>YVDIAIPCNNKG</u>	3	Tc
		<u>YVDIAIPCNNKG</u>	3	Tc
		<u>YVDIAIPCNNKG</u>	2	Tc

Utilizando la misma metodología, se identificaron dos epítomos adicionales de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos Tc, principalmente AOF (58-66) (p. ej., LLLAARAIV) y AOF (60-68) (p. ej., LAARAIVAI).

- 5 En la Tabla 14 (así como en la Tabla 15 a continuación), la puntuación de unión se refiere a una cara del epítomo (agretopo) en la proteína del CMH en la célula presentadora de antígeno. Dado que el linfocito T reconoce la otra cara de la secuencia (epítomo) junto con el CMH, la elevada unión al CHM indica una mayor probabilidad de reconocimiento del epítomo por el linfocito T. En estas tablas, cuanto mayor sea la puntuación de unión, mejor será la unión. Por consiguiente, los restos de aminoácidos expuestos en negrita son importantes para la unión del agretopo al CMH. Según la divulgación previa, las realizaciones de la presente invención incluyen combinaciones de 2 o más de las secuencias peptídicas TIALCNTDS, TDSPLRYVD, PLRYVDIAIP y PLRYVDIAIP, que cuando se administran a un ser humano, estimularán los linfocitos Tc (y en el caso de los péptidos TDSPLRYVD y PLRYVDIAIP, estimulan los linfocitos Th). Dichas combinaciones incluyen 2 o más péptidos individuales unidos entre sí, p. ej., por un espaciador que comprende aminoácidos, o unidos a un transportador común.
- 10
- 15 La misma secuencia 30-mer se analizó de la misma manera para identificar péptidos que se unirán mediante la proteína A-2 del ALH humano de clase I (genotipo HLA-A*0201) como se determina por el motivo peptídico requerido para la unión mediante la proteína ALH-A2. Esto produjo 24 péptidos 9-mer que deben unirse por la proteína ALH-A2 de clase I y de este modo se presentan como epítomos en los linfocitos T. Véase la Tabla 15. Esto supone que, aunque los péptidos que servirán como epítomos de linfocitos T de ratón de una cepa obtenida no serán necesariamente los epítomos exactos, ya sea para otra cepa dispar del CMH de ratón, o para los seres humanos, las mismas regiones del AOF/PRLi que son reactivas con los linfocitos T murinos probablemente también servirán como
- 20

fuente de epítomos peptídicos de una secuencia ligeramente diferente que se reconocerá por los linfocitos T humanos. Los péptidos serán diferentes en cierta medida a los haplotipos del CMH y por consiguiente los epítomos exactos reconocidos por los linfocitos T serán ligeramente diferentes, pero algunos epítomos pueden observarse por los linfocitos T de diferentes individuos o especies debido al alto grado de la conservación de la secuencia de aminoácidos de AOF/PRLi.

Tabla 15

Motivo de anclaje de HLA-A*0201 en el péptido aa136-aa166 aa136-----aa166	
	Puntuación de unión
EASYVNLPTIALCNTDSPLRYVDIAIPCNNKG	
EASYVNLPT	5
ASYVNLPTI	18
SYVNLPTIA	7
YVNLPTIAL	21
VNLPTIALC	11
NLPTIALCN	11
LPTIALCNT	9
PTIALCNTD	7
TIALCNTDS	10
IALCNTDSP	12
ALCNTDSPL	22
LCNTDSPLR	4
CNTDSPLRY	1
NTDSPLRYV	19
TDSPLRYVD	4
DSPLRYVDI	9
SPLRYVDIA	13
PLRYVDIAI	15
LRVVDIAIP	9
RYVDIAIPC	1
YVDIAIPCN	11
VDIAIPCNN	3
DIAIPCNNK	11
IAIPCNNKG	13

Determinación de los epítomos de AOF/PRLi para su uso en seres humanos En primer lugar, recoger 4 tubos heparinizados de sangre del paciente y enviar uno al laboratorio para la tipificación de ALH para determinar el genotipo de ALH del paciente. Los otros 3 tubos de sangre heparinizada se utilizan como una fuente de linfocitos T y células presentadoras de antígeno. La sangre heparinizada del paciente se agrupa y los leucocitos mononucleares de sangre periférica (LMSP) se purifican por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque Plus (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) utilizando una modificación del procedimiento de Boyum (Boyum, Scand. *J. Clin. Lab. Invest.* 21:97:S77 (1968)) como se ha publicado previamente y Rohrer y col., *J. Immunol.* 162:6880 (1999). Los LMSP purificados se volvieron a suspender en medio RPMI-1640 y se lavaron 3 veces por centrifugación y a continuación se realizó un recuento de viabilidad utilizando exclusión del colorante del azul de tripano. En segundo lugar, los LMSP contados se diluyeron a 5×10^6 células viables/ml en medio RPMI-1640 y a continuación la suspensión celular se divide en dos alícuotas. (a) Una alícuota de células sirve como la fuente de células presentadoras de antígeno en el ensayo de proliferación. Deplecionar esta alícuota de los linfocitos T mediante la selección negativa en placas de Petri recubiertas en anticuerpo monoclonal anti-CD3 utilizando el procedimiento

descrito en Wysocki y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)* 75:2844 (1978), excepto que el anticuerpo anti-CD3 se utiliza y que el anticuerpo anti-CD3 se añade y se une a las placas en el día de la separación celular. Véase Boyum, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21:97:S77 (1968). Tras la incubación y la eliminación de las células que no se adhieren a las placas recubiertas con anti-CD3, las células no adherentes (linfocitos no T) se lavan por centrifugación en medio RPMI-1640 por centrifugación y se irradian con rayos x a 3000 R para inhibir su capacidad de proliferación. Tras la irradiación con rayos x, se cuentan para la viabilidad utilizando exclusión del colorante del azul de tripano y se mantienen en hielo hasta realizar el ensayo de proliferación. (b) La alícuota de las células sin utilizar en la depleción de linfocitos CD3⁺ (linfocitos T) se divide por la mitad y se selecciona positivamente para los linfocitos T CD4 y los linfocitos T CD8 utilizando la clasificación celular magnética. La mitad de las células se incuban en hielo con perlas magnéticas que se conjugan con el anticuerpo monoclonal anti-CD4 humano. La otra alícuota se incuban con perlas magnéticas que se conjugan con el anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano. Las incubaciones se realizan en hielo durante 45 minutos. Un tubo (el tubo anti-CD4) se pone en el campo de un imán de Becton-Dickinson Imag, y las células a las que se unen las perlas magnéticas recubiertas de anticuerpos se unirán a la cara del lado del tubo que posee el imán. El sobrenadante que contiene las células que no llevan el marcador al que se une el anticuerpo se elimina por pipeteado. Un nuevo medio se añade cuidadosamente al tubo y el sobrenadante se elimina de nuevo. Después se eliminan las células sin unir, el imán se elimina y las células unidas a las perlas magnéticas conjugadas con el anticuerpo anti-CD4 se liberan desde el lado del tubo. Estos linfocitos T CD4 se eliminan por pipeteo, se lavan por centrifugación en un medio, y se cuentan para la viabilidad por exclusión del colorante del azul de tripano. El mismo procedimiento de separación se realiza para obtener linfocitos T CD8 utilizando perlas magnéticas conjugadas con anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano. Las dos poblaciones de linfocitos T se diluyen a 5×10^6 células viables/ml.

En tercer lugar, los linfocitos T CD4 y los linfocitos T CD8 se analizaron para la proliferación en AOF/PRLi o péptidos 12-mer que se superponen por 4 aminoácidos, pero abarcan la secuencia completa de 295 aminoácidos de AOF/PRLi (como se realizó para obtener los datos del epítipo de ratón presentados en los ejemplos anteriores). El procedimiento descrito en Rohrer y col., *J. Immunol.* 162:6880 (1999) se utiliza para evaluar la proliferación. Se utilizan noventa y seis (96) placas de pocillos y se añaden 0,1 ml de LMSP deplecionados con los linfocitos T irradiados (obtenidos utilizando el procedimiento descrito en (a) previamente) a cada pocillo. Ese volumen también contiene 100 ng de AOF/PRLi intacto o un péptido 12-mer de AOF/PRLi. A continuación, se añaden 0,1 ml de linfocitos T CD4 o CD8 de la sangre periférica del paciente que padece cáncer (purificada mediante el procedimiento descrito en el primer párrafo del ejemplo y en (b) anterior a todos los pocillos). Se utiliza 5×10^4 - 5×10^5 linfocitos T viables/pocillo y se incuban las placas que contienen los linfocitos T CD4 o CD8, se irradian las células presentadoras de antígeno más AOF/PRLi intacto o péptidos 12-mer de AOF/PRLi durante 48 horas a 37 °C en aire humidificado al 95 %/atmósfera de CO₂ al 5 %. Veinticuatro horas antes de la recogida, se añaden 20 µl de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) para producir una concentración total de 10 µM de BrdU/pocillo. Los cultivos celulares vuelven a 37 °C en aire humidificado al 95 %/atmósfera de CO₂ al 5 % para las 24 horas restantes. La proliferación se analizará utilizando el ensayo por incorporación de BrdU de Biotrak (Amersham, Arlington Heights, IL) como se ha descrito previamente. Tras la preparación y fijación de las células etiquetadas, la precipitación de ADN celular y la unión del anticuerpo anti-BrdU conjugado en la enzima al ADN, seguido por el lavado y adición de un sustrato para la enzima que producirá un producto coloreado, las placas se analizaron por un lector microELISA y se midió la absorbancia a 450 nm. Por medio del análisis de los valores de absorbancia en comparación con los controles negativos, se determinó qué péptidos de AOF/PRLi inducen la proliferación en los linfocitos T CD4 y CD8 del paciente específicos para AOF/PRLi. Estos datos permiten la determinación de los epítipos de AOF/PRLi reconocidos por los linfocitos T del paciente.

En cuarto lugar, debido a que los linfocitos T citotóxicos (Tc) y los T supresores (Ts) que secretan IL-10 son ambos linfocitos T CD8 y puesto que la inducción de los linfocitos Ts inhibe la destrucción del linfocito Tc de las células tumorales (Rohrer, y col., *J. Immunol.* 155:5719 (1995)), se determina cuál de los epítipos que inducen la proliferación de los linfocitos T CD8 del paciente que padece cáncer induce Tc y cuál induce la activación de linfocitos Ts. Los linfocitos Tc secretan interferón- γ , pero no IL-10, mientras que los linfocitos Ts secretan IL-10, pero no interferón- γ . Se ha creado algunos de los cultivos de linfocitos T CD8 y CD4 como se ha descrito previamente, en placas de ELISPOT recubiertas con anticuerpo anti-interferón- γ o anticuerpo anti-IL-10. Se utiliza la mezcla de células presentadoras de antígeno irradiadas, autólogas, linfocitos T CD4 o CD8, y AOF/PRLi intacto o los mismos péptidos 12-mer de AOF/PRLi de la misma manera que en el ensayo de proliferación. Las células se incuban a 37 °C en aire humidificado al 95 %/atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24-48 horas. Al cabo de ese tiempo, las células se lavan en los pocillos y se añade el anticuerpo biotinilado (anti-interferón- γ o anti-IL-10), se incubaron durante 12 horas a 4 °C, y después cada pocillo se lava para eliminar el anticuerpo sin unir. Esto es seguido por una incubación de 2 horas con estreptavidina fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante a temperatura ambiente. Se añade el sustrato apropiado para la enzima en la estreptavidina, se incuban a temperatura ambiente durante 5-30 minutos, la reacción se detuvo y las manchas producen la secreción de citoquinas y uniéndose a la parte inferior de la membrana del pocillo se cuentan utilizando un analizador de inmunospot Becton-Dickinson. Combinando los datos del ensayo de proliferación con los datos de ELISPOT, se identifican los péptidos de AOF/PRLi que inducen los linfocitos Tc CD8 (que secretan el interferón- γ) y los péptidos que inducen los linfocitos Ts CD8 (que secretan IL-10). El mismo análisis de linfocitos T CD4 permite determinar si los diferentes péptidos presentados en el ALH de clase II inducen linfocitos Th1 CD4 en lugar de linfocitos Th2 CD4. Si lo hacen, la inmunidad mediada por las células contra el tumor aumenta mediante la inmunización solamente con péptidos de AOF/PRLi que inducen Th1.

Una vez obtenidos estos datos, se recurre a la base de datos de motivos de anclaje de ALH para determinar qué proteína de ALH de clase I es responsable de la presentación de los péptidos que se desean utilizar. En este punto, se conocen el genotipo de ALH del paciente y la secuencia peptídica de AOF/PRLi que inducen la proliferación de linfocitos T y la secreción del interferón- γ . Una vez completada la realización de este análisis en bastantes pacientes, un banco de datos suficientemente extenso revela qué péptidos requeridos se acumulan para su utilización en la inmunización en un paciente con un haplotipo de ALH obtenido. Por consiguiente, para un haplotipo de ALH obtenido, existe un conjunto obtenido de péptidos de AOF/PRLi que induce la inmunoterapia eficaz del tumor.

Aplicabilidad industrial

La presente invención tiene aplicabilidad en la medicina y la investigación contra el cáncer.

- 10 Todas las publicaciones citadas en la memoria descriptiva (p. ej., el listado de citas a continuación) son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención.

Listado de citas

1. Astrow, A. B., *Lancet* 343:494 (1994).
2. Bailar, J. C., y col., *N. Engl. J. Med.* 314:1226 (1986).
- 15 3. Gallagher, H. S., y col., *Cancer* 23:855 (1969).
4. Sprat, J. S., y col., *Cancer Res.* 46:970 (1986).
5. Zhuang, A., y col., *Cancer Res.* 55:467 (1995).
6. Leffel, M. S., y col., *Cancer Res.* 37:4112 (1977).
7. Coggin, J. H., Jr., *Mol. Biother.* 1:223 (1989).
- 20 8. Van den Eynde, B. J., y col., *Curr. Opinion Immunol.* 9:684 (1997).
9. Melief, C., y col., *Immunol. Rev.* 145:167 (1995).
10. Breenberg, P. D., y col., *Adv. Immunol.* 49:281 (1991).
11. Coulie, P. G., y col., *J. Immunother.* 14:104 (1993).
12. Hellstrom, I., y col., *Crit. Rev. Immunol.* 18:1 (1998).
- 25 13. Nabeta, Y. *Mod., Asp. Immunobiol.* 1:17 (2000).
14. Coggin, J. H., Jr., y col., *Immunol. Today* 19:405 (1998).
15. Seiter, S., y col., *Mod. Asp. Immunobiol.* 1:121 (2000).
16. Landowski, T. H., y col., *Biochem.* 34:11276 (1995).
17. Castronovo, V., *Invasion Metastasis* 13:1 (1993).
- 30 18. van den Brule, F. A., y col., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 201:388 (1994).
19. Menard, S., y col., *Biochem.* 67:155 (1997).
20. Coggin, J. H., Jr., y col., *Anticancer Res.* 19:1 (1999).
21. Liotta, L. A., y col., *Prog. Clin. Biol. Res.* 256:3 (1988).
22. Azavoorian, S., y col., *Cancer* 71:1368 (1993).
- 35 23. Terranova, V. P., y col., *Cancer Res.* 42:2261 (1982).
24. Terranova, V. P., y col., *Science* 226:982 (1984).
25. Ardini, E., y col., *J. Biol. Chem.* 272:2342 (1997).
26. Romanov, V., y col., *Cell Adhes. Commun.* 2:201 (1994).
27. Turpeeniemi, H. T., y col., *J. Biol. Chem.* 261:1883 (1986).
- 40 28. Sweeney, T. M., y col., *Cancer Metastasis Rev.* 10:245 (1991).
29. D'Erico, A. S., y col., *Mol. Pathol.* 4:239 (1991).
30. Monteagudo, C. M., y col., *Am. J. Pathol.* 136:585 (1990).
31. Grigoni, W. F., y col., *Am. J. Pathol.* 138:647 (1991).
- 45 32. Sobel, M. E., *Semin. Cancer Biol.* 4:311 (1993).
33. Martignone, S., y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 85:398 (1993).
34. Waltregny, D., y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 89:1224 (1997).
35. Pellegrini, R., y col., *Breast Cancer Res. Treat.* 35:195 (1995).
36. Menard, S., y col., *Br. J. Cancer* 69:1126 (1994).
37. Vollmers, H. P., y col., *FEBS Letters* 172:17 (1984).
- 50 38. Wu, S. Chung-hua Ping Li Hsueh Tsa Chih 22:207 (1993).
39. Terranova, V. P., y col., *Cancer Res.* 42:2265 (1982).
40. Rohrer, J. W., y col., *J. Immunol.* 154:2266 (1995).
41. Coggin, J. H., Jr., y col., *Am. J. Pathol.* 130:136 (1988).
42. Rohrer, J. W., y col., *J. Immunol.* 155:5719 (1995).
- 55 43. Coggin, J. H., Jr., y col., *Int. J. Rad. Biol.* 71:81 (1997).
44. Rohrer, J. W., y col., *J. Immunol.* 162:6880 (1999).
45. Zelle-Reiser, C., y col., *J. Urol.* 165:1705 (2001).
46. van den Brule, F. A., y col., *Hum. Pathol.* 27:1185 (1996).
47. Payne, W. J., Jr., y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 75:527 (1985).
- 60 48. Gussack, G. S., y col., *Cancer* 62:57.
49. Rohrer, J. W., y col., *Mod. Asp. Immunobiol.* 1:191 (2001).
50. Rao, y col., *Biochemistry* 28:7476-7486 (1989).

51. Yow, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85:6394-6398 (1988).
52. Coggin, y col., *Anticancer Res.* 19:5535-5542 (1999).
53. Van den Brule, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:388-3993 (1994).
54. Coggin, y col., *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.* 119:1257-1266 (1993).

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una pluralidad de fragmentos de antígeno oncofetal (AOF) distintos, no superpuestos que contienen epítomos que estimulan de manera específica los linfocitos T citotóxicos en un mamífero, y un transportador, en la que dicha composición no comprende ningún epítomo de AOF que estimule de manera específica los linfocitos T supresores.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho transportador comprende una vesícula.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que dicha vesícula comprende un liposoma.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos epítomos se une a un grupo lipófilo.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha pluralidad de epítomos se selecciona entre el grupo que consiste en:
- (i) restos de aminoácidos 52-60 de AOF murino,
 - (ii) restos de aminoácidos 80-88 de AOF murino,
 - (iii) restos de aminoácidos 155-163 de AOF murino,
 - (iv) restos de aminoácidos 155-163 de PRLi murina,
 - (v) secuencia de aminoácidos RTWEKLLL,
 - (vi) secuencia de aminoácidos NTGQRAVL,
 - (vii) secuencia de aminoácidos GEWTAPAP,
 - (viii) secuencia de aminoácidos CNTDSPLR, y
 - (ix) secuencia de aminoácidos YVDIAIPC.
6. La composición de la reivindicación 5, que comprende además células dendríticas producidas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica obtenidos de un paciente mamífero que padece cáncer.
7. La composición de la reivindicación 6, que comprende además al menos un coestimulante.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que el coestimulante se selecciona entre el grupo que consiste en FNT-alfa, interleucinas y prostaglandina.
9. La composición de la reivindicación 1, que comprende además al menos un epítomo de AOF que estimula de manera específica los linfocitos T auxiliares.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que al menos dicho epítomo de AOF que estimula de manera específica los linfocitos T auxiliares se une a un grupo lipófilo.
11. La composición de la reivindicación 9, que comprende al menos dos epítomos de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos T auxiliares.
12. La composición de la reivindicación 9, en la que cada uno de dichos epítomos de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos T auxiliares se selecciona entre el grupo que consiste en
SPLRYVDIAI,
GEWTAPAPEF,
AQPEVADWSE,
QVPSVPIQQF,
SAAPTAQATE, y
TEWVGATTDW.
13. La composición de la reivindicación 9, en la que al menos dicho epítomo de AOF que estimula de manera específica los linfocitos T auxiliares posee aproximadamente 8 a aproximadamente 30 aminoácidos.
14. La composición de la reivindicación 13, en la que al menos dicho epítomo de AOF que estimula de manera específica los linfocitos T auxiliares posee aproximadamente 8 a aproximadamente 12 aminoácidos.
15. La composición de la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
16. Un procedimiento de preparación de una composición inmunoterapéutica para el tratamiento del cáncer en un ser humano, que comprende:
- (a) identificar una pluralidad de fragmentos de antígeno oncofetal (AOF) distintos, no superpuestos que contiene epítomos que estimulan de manera específica los linfocitos T citotóxicos en un ser humano; y
 - (b) formular dos o más de los epítomos identificados en (a) con un transportador, formando así la composición inmunoterapéutica, en la que dicha composición inmunoterapéutica no comprende ningún epítomo de AOF que estimule de manera específica los linfocitos T supresores.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, que comprende además c) identificar una pluralidad de fragmentos de antígeno oncofetal (AOF) que estimula de manera específica los linfocitos T auxiliares en un ser humano, y en el que b) comprende formular uno o más de los epítomos de AOF identificados en c) con los dos o más epítomos identificados en a) y el transportador.
- 5 18. Un procedimiento de preparación de células dendríticas para su uso en el tratamiento contra el cáncer, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (a) obtener monocitos de sangre periférica obtenidos de un paciente mamífero que padece cáncer;
 - (b) generar células dendríticas maduras a partir de monocitos de sangre periférica; y
 - (c) poner en contacto las células dendríticas maduras con una composición que comprende una pluralidad de
- 10 fragmentos de antígeno oncofetal (AOF) distintos, no superpuestos que contiene epítomos que estimulan de manera específica los linfocitos T citotóxicos en condiciones apropiadas para programar las células dendríticas maduras para potenciar la inmunidad mediada por los linfocitos T, en el que dicha composición inmunoterapéutica no comprende ningún epítomo de AOF que estimule de manera específica los linfocitos T supresores.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha producción comprende el cultivo de monocitos de sangre periférica en un medio que comprende FEC-G e IL-4 para producir células dendríticas inmaduras, seguido del cultivo de las células dendríticas inmaduras en un medio que comprende ARN poli I:C, para elaborar células dendríticas maduras.
- 20 20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que dicha puesta en contacto comprende cultivar las células dendríticas maduras en un medio que comprende uno o más epítomos de AOF que estimulan de manera específica los linfocitos T citotóxicos, en el que uno o más de dichos epítomos comprenden los restos de aminoácidos 52-60 de AOF murino, los restos de aminoácidos 80-88 de AOF murino, los restos de aminoácidos 155-163 de AOF murino, y/o los restos de aminoácidos 155-163 de PRLi murina.