

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 779**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2009 E 09812172 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2328923**

54 Título: **Epítupos CD133**

30 Prioridad:

02.09.2008 US 190718 P

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

06.04.2016

73 Titular/es:

**CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER (100.0%)
8700 Beverly Boulevard
Los Angeles, California 90048, US**

72 Inventor/es:

**YU, JOHN S.;
LIU, GENTAO y
BLACK, KEITH L.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 779 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Epítomos CD133

5 Remisión a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/190.718, presentada el 2 de septiembre de 2008.

10 Campo técnico

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de cánceres.

Antecedentes

15 El marcador de superficie celular CD133 (Prominina 1) se expresa por células madre neurales y se ha usado para seleccionar células madre de cáncer cerebral. Además, células CD133 positivas están muy enriquecidas en células madre cancerosas en cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, mieloma múltiple, y melanoma.

20 Sumario

Esta invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de péptidos de CD133 humano que se unen a antígenos de leucocitos humanos (HLA). Estos péptidos pueden usarse en inmunoterapia de cánceres. Por consiguiente, la invención incluye al menos composiciones para inmunoterapia del cáncer y métodos para inducir respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer contra antígenos tumorales.

25 Se describe en este documento un inmunógeno que incluye un péptido aislado de 800 restos de aminoácido o menos (por ejemplo, 700 restos de aminoácido o menos, 600 restos de aminoácido o menos, 500 restos de aminoácido o menos, 400 restos de aminoácido o menos, 300 restos de aminoácido o menos, 200 restos de aminoácido o menos, 150 restos de aminoácido o menos, 100 restos de aminoácido o menos, 80 restos de aminoácido o menos, 60 restos de aminoácido o menos, 50 restos de aminoácido o menos, 40 restos de aminoácido o menos, 30 restos de aminoácido o menos, 20 restos de aminoácido o menos, 15 restos de aminoácido o menos, 14 restos de aminoácido o menos, 13 restos de aminoácido o menos, 12 restos de aminoácido o menos, 11 restos de aminoácido o menos, 10 restos de aminoácido o menos, o 9 restos de aminoácido) que incluye la secuencia amino de cualquiera de las SEC ID N.º 1-13 con cuatro o menos (por ejemplo, tres o menos, dos o menos, una o menos, o cero) sustituciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones conservativas). En algunos ejemplos, el inmunógeno incluye una variante superagonista de cualquiera de las SEC ID N.º 1-11. En algunas realizaciones, el inmunógeno incluye una o más secuencias no CD133.

40 Se describen además composiciones que incluyen un inmunógeno descrito en este documento unido a un vehículo inmunogénico, por ejemplo, una albúmina sérica, toxoide tetánico, hemocianina de lapa californiana, dextrano, un agonista de un receptor tipo Toll (TLR), o una partícula de virus recombinante.

45 Se describen además polinucleótidos que incluyen una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno descrito en este documento. Los polinucleótidos pueden incluir un vector de expresión, por ejemplo, un plásmido o un vector viral no replicante (por ejemplo, vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la encefalitis equina venezolana, virus adeno-asociado, y adenovirus). En algunos ejemplos, el vector de expresión es un virus, por ejemplo, un virus ARN o ADN.

50 Se describen además composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas o de vacuna) que incluyen un inmunógeno o polinucleótido descrito en este documento. La composición puede incluir adicionalmente un adyuvante (por ejemplo, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, Montanide ISA-51, LAG-3, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, o saponina), una citoquina (por ejemplo, interleuquina-1 (IL-1), IL-2, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de células madre (SCF), o factor estimulador de colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF)), y/o un agonista de un receptor tipo Toll (TLR) (por ejemplo, un agonista de TLR-3, TLR-4, TLR-7, o TLR-9). Las composiciones pueden incluir un vehículo, por ejemplo, un liposoma (por ejemplo, una emulsión, una espuma, una micela, una monocapa insoluble, un cristal líquido, una dispersión de fosfolípido, o una capa lamelar), un complejo inmunoestimulador (ISCOM), o una partícula de liberación lenta.

60 Se describen además en este documento métodos de inmunización que incluyen administrar a un sujeto un inmunógeno, polinucleótido, o composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria.

65 Se describen además métodos para tratar a un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan una molécula MHC clase I o para inhibir o suprimir un cáncer caracterizado por células tumorales que

expresan una molécula MHC clase I en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto un inmunógeno, polinucleótido, o composición descrita en este documento en una cantidad eficaz para inducir una respuesta CTL dirigida contra las células tumorales. En algunos ejemplos, los métodos incluyen identificar que el sujeto tiene un

5 En un aspecto adicional, la invención destaca métodos para tratar a un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A2 o para inhibir o suprimir un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A2 en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto linfocitos T citotóxicos (CTL) inducidos en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de lisis directa o para lograr la destrucción de las

10 células tumorales de forma indirecta a través de la elaboración de citoquinas, donde los CTL se inducen mediante un proceso que incluye inducir un CTL in vitro que es específico para las células tumorales poniendo en contacto un CTL precursor con un inmunógeno descrito en este documento en condiciones que generan una respuesta CTL contra las células tumorales. En algunos ejemplos, los métodos incluyen identificar que el sujeto tiene un cáncer

15 caracterizado por células tumorales que expresan una molécula MHC clase I o inhibir o suprimir un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A2.

Se describen además en este documento métodos para tratar a un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan cualquier molécula MHC clase I o para inhibir o suprimir un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan una molécula MHC clase I en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto

20 linfocitos T citotóxicos (CTL) inducidos en una cantidad suficiente para destruir o inhibir las células tumorales a través de lisis directa o para lograr la destrucción o inhibición de las células tumorales de forma indirecta a través de la elaboración de citoquinas, donde los CTL se inducen mediante un proceso que comprende inducir un CTL in vitro que es específico para dichas células tumorales poniendo en contacto un CTL precursor con un inmunógeno descrito en este documento en condiciones que generan una respuesta CTL contra las células tumorales. En

25 algunos ejemplos, los métodos incluyen identificar que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan una molécula MHC clase I.

En un aspecto adicional, la invención destaca métodos para inducir un linfocito T citotóxico (CTL) in vitro que es específico para una célula tumoral que expresa HLA-A2. Los métodos incluyen poner en contacto un CTL precursor con un inmunógeno descrito en este documento en condiciones que generan una respuesta CTL contra las células tumorales.

30

En otro aspecto, la invención destaca métodos para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) in vitro que es específica para una célula tumoral que expresa HLA-A2. Los métodos incluyen poner en contacto un CTL precursor con una célula que incluye un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido que incluye un inmunógeno descrito en este documento.

35

En un aspecto adicional, la invención destaca métodos para tratar a un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A2 o para inhibir o suprimir un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A2 en un sujeto. Los métodos incluyen administrar CTL inducidos mediante un método descrito en este documento en una cantidad eficaz para destruir las células tumorales a través de lisis directa o para lograr la destrucción de las células tumorales de forma indirecta a través de la elaboración de citoquinas. En algunas realizaciones, los métodos incluyen identificar que el sujeto tiene un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A2.

40

45

También se describen en este documento métodos para tratar, inhibir, o suprimir un cáncer en un sujeto. Estos métodos incluyen administrar al sujeto una composición que incluye células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), donde las células presentadoras de antígeno presentan en su superficie un epítipo peptídico que comprende cualquiera de las SEC ID N.º 1-13 con cuatro o menos (por ejemplo, tres o menos, dos o menos, una o menos, o cero) sustituciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones conservativas) o una variante superagonista de cualquiera de las SEC ID N.º 1-11. En algunos ejemplos, las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas) adquieren los epítopos peptídicos in vitro mediante exposición a péptidos sintéticos que incluyen los epítopos peptídicos. En algunos ejemplos, los métodos incluyen identificar primero que el sujeto está en necesidad de tratamiento, inhibición, o supresión del cáncer.

50

55

En un aspecto adicional, la invención destaca métodos para preparar una vacuna celular para tratar, inhibir, o suprimir un cáncer. Los métodos incluyen obtener células mononucleares derivadas de médula ósea de un paciente, cultivar las células mononucleares in vitro en condiciones en que las células mononucleares se vuelven adherentes a un recipiente de cultivo; seleccionar un subconjunto de las células mononucleares que comprenden células adherentes; cultivar las células adherentes en presencia de una o más citoquinas en condiciones en que las células se diferencian en células presentadoras de antígeno; y cultivar las células presentadoras de antígeno en presencia de un inmunógeno descrito en este documento en condiciones en que las células presentan los péptidos en moléculas de histocompatibilidad principal clase I, preparando de ese modo una vacuna celular.

60

En otro aspecto, la descripción destaca kits que incluyen uno o más inmunógenos, polinucleótidos, y/o composiciones descritas en este documento.

65

En aspectos adicionales, la descripción destaca un inmunógeno, polinucleótido, o composición descrita en este documento para su uso como medicamento; para su uso en terapia; para su uso en el tratamiento, inhibición, o supresión de un tumor o cáncer; o para su uso como medicamento para el tratamiento, inhibición, o supresión de un tumor o cáncer. En otros aspectos, la descripción destaca el uso de un inmunógeno, polinucleótido, o composición descrita en este documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, inhibición, o supresión de un tumor o cáncer.

Un péptido "superagonista" o "superantígeno" es un péptido que incluye una o más mutaciones (por ejemplo, uno, dos, o tres cambios de aminoácido, respecto a una secuencia nativa (de tipo silvestre)) y que provoca una respuesta inmunológica específica de antígeno que es más potente que una respuesta provocada contra un péptido que tiene una secuencia nativa. Por ejemplo, un péptido superagonista estimula niveles mayores de liberación de IFN- γ por células T específicas de antígeno, en comparación con células T estimuladas con el péptido nativo. El aumento en los niveles de liberación de IFN- γ estimulados por un péptido superagonista es mayor que los niveles estimulados por un péptido nativo en una cantidad estadísticamente significativa. En algunas realizaciones, un superagonista estimula niveles de IFN- γ que son al menos un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 200 %, o 500 % mayores que los niveles provocados por el péptido nativo.

Salvo que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3.^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); Marzo, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5.^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001); y Lutz et al., Handbook of Dendritic Cells: Biology, Diseases and Therapies, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2006), proporcionan a los expertos en la materia directrices generales respecto a muchos de los términos usados en la presente solicitud. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las FIG. 1 a 5 son un conjunto de diagramas de dispersión de análisis de citometría de flujo de CTL inducidos por péptidos teñidos con HLA-A*0201/tetrámeros peptídicos conjugados con ficoeritrina (eje-y) y mAb anti-CD8 humano-FITC (eje-x). FIG. 1, tetrámeros CD133-405. FIG. 2, tetrámeros CD133-117. FIG. 3, tetrámeros CD133-301. FIG. 4, tetrámeros CD133-708. FIG. 5, tetrámeros CD133-804.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que representa la producción de IFN- γ por células T CD8⁺ estimuladas con las células indicadas. Las células T CD8⁺ se prepararon previamente in vitro con células dendríticas que se cultivaron en presencia de células madre cancerosas (CSC) de glioblastoma multiforme (GBM) irradiadas.

La FIG. 7 es un diagrama de dispersión de un análisis de citometría de flujo de CTL inducidos por GBM CSC teñidos con HLA-A*0201/tetrámeros pépticos 405 conjugados con ficoeritrina (eje-y) y mAb anti-CD8 humano-FITC (eje-x).

La FIG. 8 es un histograma de la cantidad de células T2 (eje-y) que tienen la intensidad de fluorescencia indicada (eje-x). Fluorescencia por encima del control (0 μ M) indica unión del péptido de ratón (10 μ M o 100 μ M) a las células.

La FIG. 9 es una alineación de un epítipo CD133 humano (Hs; SEC ID N.º 1) y epítipos correspondientes de chimpancé (Pt; SEC ID N.º 6); perro (Cf, SEC ID N.º 7); caballo (Ec, SEC ID N.º 8); ganado vacuno (Bt, SEC ID N.º 9); rata (Rn, SEC ID N.º 10); y ratón (Mm, SEC ID N.º 11). "*", los restos son idénticos en todas las secuencias; ":", sustituciones conservadas; ".", sustituciones semi-conservadas.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a inmunógenos y composiciones inmunogénicas, y a métodos de uso de los mismos, para la prevención, tratamiento, y/o diagnóstico de cánceres. Se describen en este documento inmunógenos que incluyen proteínas o polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos incluyen uno o más oligopéptidos epitópicos. Además, la invención se refiere adicionalmente a polinucleótidos que pueden usarse para estimular una respuesta CTL contra cánceres.

Se describen en este documento secuencias oligopeptídicas específicas con secuencias de aminoácidos mostradas

en las SEC ID N.º 1-13, que representan péptidos epitópicos (es decir, secuencias oligopeptídicas inmunogénicas) de al menos aproximadamente 9-10 aminoácidos de longitud.

5 CD133 está presente en varios cánceres humanos (Mizrak et al., 2008, J. Pathol., 214:3-9; Neuzil et al., 2007, Biochem. Biophys. Res. Commun., 355:855-859), incluyendo cáncer cerebral, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, mieloma múltiple, y melanoma.

10 Una secuencia de CD133 humano ejemplar tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º 14). Las secuencias epitópicas identificadas en este documento (SEC ID N.º 1-5) están subrayadas.

MALVLGSLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKA
 GPIGILFELVHIFLYVVQPRDFPEDTLRKFLQKAYESKIDYDKPETVIL
 GLKIVYYEAGIILCCVLGLLFIILMPLVGYFFCMCRCCNKC GGEMHQRO
 KENGPFLRKCF AISLLVICIIISIGIFYGFVANHQVRTRIKRSRKLADS
 NFKDLRLLNETPEQIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGGILDRL
 RPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKSLHQQSTQLSSSLTSV
 KTSLSRSSLNDPLCLVHPSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQLPPVDAELD
 NVNNVLRITDLGLVQGGYQSLNDIPDRVQRQTTTVVAGIKRVLNSIGSD
 IDNVTQRLPIQDILSAFSVYVNNNTESYIHRNLPTLEEYDSYWWLGGGLVI
 CSLLTLIVIFYYLGLLGCYVCGYDRHATPTTRGCVSNTGGVFLMVGVLGSL
 FLFCWILMIIVVLTFVFGANVEKLI CE PYTSKELFRVLDTPYLLNEDWE
 YYLSGKLFNKSMMKLTFEQVYSDCKKNRGTYGTLHLQNSFNI SEHLNIN
 EHTGSISSELESKVNLNIFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDSYLAQ
 TGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANS LPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVL
 PIEQSLSTLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASLDFAQNFITNNTSSVI
 IEETKKYGRTIIGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKPVATALDTAVDVFLC
 SYIIDPLNLFWFEGIGKATVFLLPALIFAVKLAKYYRRMDS EDVYDDVET
 IPMKNMENGNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH (SEC ID N.º 14)

15 También pueden usarse equivalentes de cualquiera de las SEC ID N.º 1-5 de otros animales (por ejemplo, mamíferos) como inmunógenos. Equivalentes ejemplares de la SEC ID N.º 1 de otras especies incluyen ILSEFSVYV (chimpancé; SEC ID N.º 6); KLSDFIGYI (perro; SEC ID N.º 7); KLSNFMDYI (caballo; SEC ID N.º 8); TLSNFVRYI (ganado vacuno; SEC ID N.º 9); VLLQFSHYL (rata; SEC ID N.º 10); y MLLQVSHYL (ratón; SEC ID N.º 11). Una alineación de estas secuencias se presenta en la FIG. 9.

20 Una secuencia consenso del epítipo CD133 ejemplar tiene la siguiente fórmula: (I/K/T/V)-L-(S/L)-(A/E/N/D/Q)-F-(S/M/V/I)-(V/D/R/G/H)-Y-(V/I/L) (SEC ID N.º 12). Otra secuencia consenso del epítipo CD133 ejemplar tiene la fórmula: (I/K/T/V/M)-L-(S/L)-(A/E/N/D/Q)-(F/V)-(S/M/V/I)-(V/D/R/G/H)-Y-(V/I/L) (SEC ID N.º 13).

25 Los polipéptidos que forman los inmunógenos descritos en este documento tienen secuencias de aminoácidos que incluyen las SEC ID N.º 1-13 y variantes de las mismas con cuatro o menos (por ejemplo, tres o menos, dos o menos, una o menos, o cero) sustituciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones conservativas).

30 Dichos polipéptidos pueden ser de cualquier longitud deseada siempre que tengan actividad inmunogénica porque sean capaces, en un conjunto dado de condiciones deseables, de provocar in vitro o in vivo la activación de linfocitos T citotóxicos (CTL) (es decir, una respuesta CTL) contra una presentación de CD133 in vitro o in vivo por una célula presentadora de antígeno (APC). Polipéptidos ejemplares incluyen aquellos de 800 restos de aminoácido o menos (por ejemplo, 700 restos de aminoácido o menos, 600 restos de aminoácido o menos, 500 restos de aminoácido o menos, 400 restos de aminoácido o menos, 300 restos de aminoácido o menos, 200 restos de aminoácido o menos, 150 restos de aminoácido o menos, 100 restos de aminoácido o menos, 80 restos de aminoácido o menos, 60 restos de aminoácido o menos, 50 restos de aminoácido o menos, 40 restos de aminoácido o menos, 30 restos de aminoácido o menos, 20 restos de aminoácido o menos, 15 restos de aminoácido o menos, 14 restos de aminoácido o menos, 13 restos de aminoácido o menos, 12 restos de aminoácido o menos, 11 restos de aminoácido o menos,

10 restos de aminoácido o menos, o 9 restos de aminoácido). Los polipéptidos que forman los inmunógenos descritos en este documento pueden ser de origen natural o pueden sintetizarse químicamente. Los polipéptidos pueden incluir al menos una de las SEC ID N.º 1-13.

5 Los oligopéptidos descritos en este documento pueden prepararse en sí mismos por métodos bien conocidos para los expertos en la materia (Grant, G. A., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, 1992, W. H. Freeman and Company, Nueva York; Coligan, J. E. et al., *Current Protocols en Protein Science*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

10 Además de las secuencias de las SEC ID N.º 1-13, las proteínas y polipéptidos que forman los inmunógenos descritos en este documento también pueden incluir uno o más tramos diferentes de aminoácidos inmunogénicos que se sabe que están asociados con cánceres, y que pueden estimular una respuesta CTL mediante lo cual los péptidos inmunogénicos se asocian con HLA-A2, HLA-A1/A11, supertipos HLA, o cualquier molécula MHC clase I (es decir, MHC-1).

15 Los oligopéptidos y polipéptidos descritos en este documento pueden obtenerse por fraccionamiento de proteínas de origen natural mediante métodos tales como tratamiento con proteasa, o pueden producirse por metodologías recombinantes o sintéticas que son bien conocidas y están claras para los expertos en la materia (véase, Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor). El polipéptido puede incluir un polipéptido recombinante o sintético que incluye al menos una de las SEC ID N.º 1-13, que son secuencias también pueden tener uno, dos, tres, o más de dichos péptidos inmunogénicos dentro de la secuencia de aminoácidos de dichos oligopéptidos y polipéptidos, y dichos péptidos inmunogénicos, o epítomos, pueden ser iguales o pueden ser diferentes, o pueden tener cualquier cantidad de dichas secuencias, donde algunas de ellas son idénticas entre sí en secuencia de aminoácidos mientras que otras dentro de la misma secuencia polipeptídica son diferentes entre sí y dichas secuencias epitópicas pueden existir en cualquier orden dentro de dicha secuencia polipeptídica inmunogénica. La localización de dichas secuencias dentro de la secuencia de un polipéptido que forma un inmunógeno descrito en este documento puede afectar a la actividad inmunogénica relativa. Además, los
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Los péptidos inmunogénicos descritos en este documento también pueden unirse (por ejemplo, unirse covalentemente) directamente a, o a través de un espaciador o enlazador a: un vehículo inmunogénico tal como albúmina sérica, toxoide tetánico, hemocianina de lapa californiana, dextrano, o una partícula de virus recombinante; un agonista del receptor tipo Toll (TLR); un péptido inmunogénico que se sabe que estimula una respuesta inmunitaria de tipo células T auxiliares; una citoquina tal como interferón gamma o GM-CSF; un agente de direccionamiento tal como un anticuerpo o ligando de receptor; un agente estabilizante tal como un lípido; o un conjugado de una pluralidad de epítomos a una estructura central de lisina ramificada, tal como el llamado "péptido antigénico múltiple" descrito en Posneft et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263:1719-25; un compuesto tal como polietilenglicol para aumentar la semi-vida del péptido; o aminoácidos adicionales tales como una secuencia líder o de secreción, o una secuencia empleada para la purificación de las secuencia madura. Los espaciadores y enlazadores típicamente incluyen moléculas neutras relativamente pequeña, tales como aminoácidos y que están sustancialmente no cargadas en condiciones fisiológicas. Dichos espaciadores se seleccionan típicamente entre el grupo de aminoácidos no polares o polares neutros, tales como glicina, alanina, serina y otros aminoácidos similares. Dichos espaciadores o enlazadores opcionales no tienen que incluir los mismos restos y por tanto pueden ser homo- o hetero-oligómeros. Cuando están presentes, dichos enlazadores habitualmente serán de una longitud de al menos uno o dos, habitualmente 3, 4, 5, 6, y posiblemente tanto como 10 o incluso hasta 20 restos (en el caso de aminoácidos). Además, dichos enlazadores no tienen que estar compuestos de aminoácidos sino que servirá también cualquier estructura oligómera siempre que proporcione el espaciado correcto para optimizar el nivel deseado de actividad inmunogénica de los inmunógenos descritos en este documento. El inmunógeno, por lo tanto, puede adoptar cualquier forma que sea capaz de provocar una respuesta CTL.

Además, los péptidos inmunogénicos descritos en este documento pueden ser parte de una estructura inmunogénica mediante uniones diferentes a enlaces peptídicos convencionales. Por tanto, cualquier modo de unir los péptidos a un inmunógeno descrito en este documento, tal como un polipéptido inmunogénico, podría proporcionar una estructura inmunogénica. Por tanto, los inmunógenos, tales como proteínas, oligopéptidos y polipéptidos, son estructuras que contienen los péptidos descritos pero dichos péptidos inmunogénicos puede que no se unan necesariamente a los mismos por los medios convencionales de usar enlaces peptídicos normales. Los inmunógenos descritos en este documento simplemente contienen dichos péptidos como parte de su composición, pero el modo en que dichos péptidos tienen que combinarse para formar el inmunógeno final se deja al talento e imaginación del usuario y no está de ningún modo restringido o limitado por la descripción contenida en este documento.

Péptidos modificados

Los péptidos que se procesan y unen de forma natural a una molécula MHC clase I, y que se reconocen por un CTL específico de tumor, no son necesariamente los péptidos óptimos para estimular una respuesta CTL. Véase, por ejemplo, Parkhurst et al., 1996, J. Immunol., 157:2539-48; Rosenberg et al., 1998, Nat. Med., 4:321-32. Por tanto, puede haber utilidad en modificar un péptido, de modo que induzca de forma más fácil o eficaz una respuesta CTL. Típicamente, los péptidos pueden modificarse en dos tipos de posiciones. Los péptidos pueden modificarse en restos de aminoácido que se ha predicho que interaccionan con la molécula MHC clase I, en cuyo caso el objetivo es crear un péptido que tenga una afinidad mayor por la molécula MHC clase I que el péptido original. Los péptidos también pueden modificarse en restos de aminoácido que se ha predicho que interaccionan con el receptor de células T en el CTL, en cuyo caso el objetivo es crear un péptido que tenga una afinidad mayor por el receptor de células T que el péptido original. Estos dos tipos de modificaciones pueden producir un péptido variante que está relacionado con un péptido original, pero que es más capaz de inducir una respuesta CTL que el péptido original. Como se usa en este documento, la expresión "péptido original" significa un oligopéptido con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEC ID N.º 1-11.

Los péptidos originales descritos en este documento pueden modificarse mediante la sustitución de uno o más restos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservativa, por ejemplo, cuando un aminoácido se reemplaza por un aminoácido de estructura y características similares, tal como cuando se reemplaza un aminoácido hidrófobo por otro aminoácido hidrófobo. Incluso más conservativo sería el remplazo de aminoácidos del mismo tamaño y naturaleza química o similar, tal como cuando se reemplaza leucina por isoleucina. En estudios de variaciones de secuencia en familias de proteínas homologas de origen natural, ciertas sustituciones de aminoácido a menudo se toleran más que otras, y estas a menudo muestran correlación con similitudes en tamaño, carga, polaridad, e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su remplazo, y ésta es la base para definir "sustituciones conservativas".

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

Sustituciones menos conservativas podrían implicar el remplazo de un aminoácido por otro que tiene características similares, pero es algo diferente en tamaño, tal como el remplazo de una alanina por un resto de isoleucina. Remplazos altamente no conservativos podrían implicar la sustitución de un aminoácido ácido en el lugar de uno que es polar, o incluso de uno que es de carácter básico, o viceversa.

Dichas sustituciones también pueden implicar estructuras diferentes a los L-aminoácidos comunes. Por tanto, podrían sustituirse D-aminoácidos en el lugar de los L-aminoácidos habitualmente encontrados en los péptidos antigénicos descritos en este documento y aún estarían abarcados por la presente descripción. Además, también pueden usarse aminoácidos que poseen grupos R no convencionales (es decir, grupos R diferentes a los encontrados en los 20 aminoácidos comunes de proteínas naturales) con propósitos de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos.

En base a ensayos de citotoxicidad, un péptido epitópico sustituido se considera sustancialmente idéntico al péptido de referencia si tiene al menos un 10 % de la actividad antigénica del péptido de referencia definida por la capacidad del péptido sustituido de reconstituir el epítipo reconocido por un CTL en comparación con el péptido de referencia. Por tanto, cuando se compara la actividad lítica en la parte lineal de las curvas efector:diana con concentraciones equimolares de los péptidos de referencia y sustituidos, el porcentaje observado de eliminación específica de las células diana incubadas con el péptido sustituido debe ser igual al del péptido de referencia a una relación efector:diana que no sea mayor de 10 veces por encima de la relación efector:diana del péptido de referencia a la cual se está haciendo la comparación.

Por tanto, los epítipos descritos en este documento pueden ser idénticos a epítipos asociados a tumor o específicos de tumor de origen natural o pueden incluir epítipos que difieren en no más de 4 restos del péptido de referencia, siempre que tengan actividad antigénica sustancialmente idéntica.

Debe apreciarse que un inmunógeno descrito en este documento puede consistir solamente en un péptido de la SEC ID N.º 1-13, o incluir un péptido de la SEC ID N.º 1-13, o incluir una pluralidad de péptidos seleccionados entre las SEC ID N.º 1-13, o incluir un polipéptido que en sí mismo incluye uno o más de los péptidos epitópicos de las SEC ID N.º 1-13. En algunas realizaciones, un inmunógeno, composición, o kit descrito en este documento puede incluir adicionalmente un polipéptido, epítipo, u otra composición antigénica descrita en el documento US 2007/0020297, documento US 2008/0206286, o documento US 2008/0311142.

Preparación de péptidos y estructuras inmunogénicas

Los péptidos y polipéptidos inmunogénicos descritos en este documento pueden prepararse de forma sintética, por

tecnología de ADN recombinante, o pueden aislarse de fuentes naturales tales como células tumorales que expresan el producto proteico original.

5 Los polipéptidos y oligopéptidos descritos en este documento pueden sintetizarse en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Están disponibles en el mercado diversos sintetizadores automatizados de péptidos y pueden usarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Grant, G. A., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, 1992, W. H. Freeman and Company, Nueva York; Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. También pueden sintetizarse fragmentos de polipéptidos descritos en este documento como intermedios en la síntesis de un polipéptido más grande.

10 Puede emplearse tecnología de ADN recombinante donde una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o polipéptido inmunogénico de interés se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula hospedadora apropiada, y se cultiva en condiciones adecuadas para su expresión. Estos procedimientos son bien conocidos en la técnica para los expertos en la materia, como se describe en Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Immunology*, 2006, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Por tanto, pueden usarse péptidos o polipéptidos producidos de forma recombinante como los inmunógenos descritos en este documento.

15 También pueden sintetizarse las secuencias codificantes de péptidos de la longitud contemplada en este documento en sintetizadores automatizados de ADN disponibles en el mercado usando protocolos que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Grant, G. A., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, 1992, W. H. Freeman and Company, Nueva York; Coligan, J. E. et al., *Current Protocols in Protein Science*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las secuencias codificantes también pueden modificarse de modo que se produzca un péptido o polipéptido que incorpore una sustitución deseada de aminoácido. La secuencia codificante puede estar provista de enlazadores apropiados, puede ligarse en vectores adecuados de expresión que están habitualmente disponibles en la técnica, y la molécula resultante de ADN o ARN puede transformarse o transfectarse en hospedadores adecuados para producir la proteína de fusión deseada. Están disponibles varios de estos vectores y sistemas hospedadores adecuados, y su selección se deja al experto en la materia. Para la expresión de las proteínas de fusión, la secuencia codificante puede estar provista de codones de inicio y parada unidos de forma funcional, regiones promotoras y terminadoras, y un sistema de replicación para proporcionar un vector de expresión para la expresión en la célula hospedadora deseada. Por ejemplo, pueden proporcionarse secuencias promotoras compatibles con hospedadores bacterianos en plásmidos que contienen sitios convenientes de restricción para la inserción de la secuencia codificante deseada. Los vectores de expresión resultantes se transforman en hospedadores bacterianos adecuados. También pueden usarse células hospedadoras de levadura, insecto y mamífero, empleando vectores y secuencias de control adecuadas.

20 Pueden modificarse por ingeniería genética células hospedadoras (por ejemplo, transducirse, transformarse, o transfectarse) con los vectores descritos en este documento que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula vírica, un fago, etc. Las células hospedadoras modificadas por ingeniería pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según lo apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para los expertos en la materia.

25 La presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias ampliamente descritas anteriormente. Las construcciones incluyen un vector, tal como un plásmido o vector viral, en que se ha insertado una secuencia descrita en este documento, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción incluye adicionalmente secuencias reguladoras incluyendo, por ejemplo, un promotor, unidas de forma funcional a la secuencia. Los expertos en la materia conocen grandes cantidades de vectores y promotores adecuados, y están disponibles en el mercado.

30 En una realización adicional, la presente invención se refiere a células hospedadoras que contienen las construcciones descritas anteriormente. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula hospedadora puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede lograrse por transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano, o electroporación (Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor). Dichas células pueden utilizarse de forma rutinaria para ensayar la actividad CTL obteniendo dichas células hospedadoras modificadas por ingeniería genética o recombinantes que expresan los péptidos inmunogénicos descritos en este documento.

35 También pueden emplearse diversos sistemas de cultivo celular de mamífero para expresar proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos renales de mono, descritas por Gluzman, 1981, *Cell*, 23:175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por

ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero incluirán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y también cualquier sitio necesario de unión al ribosoma, sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de ajuste, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Pueden usarse secuencias de ADN derivadas del ajuste de SV40, y sitios de poliadenilación para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios.

Los polipéptidos pueden recuperarse y purificarse de cultivos celulares recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita, y cromatografía con lectina. Pueden usarse etapas de re-plegamiento proteico, si fuera necesario, para completar la configuración de los péptidos y proteínas maduras. Puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas finales de purificación.

Típicamente se incuban células presentadoras de antígeno que tienen que usarse para estimular una respuesta CTL con un péptido de una longitud óptima, por ejemplo, un nanopéptido, que permite la unión directa del péptido a la molécula MHC clase I sin procesamiento adicional. Oligopéptidos y polipéptidos más grandes generalmente son ineficaces en la unión a moléculas MHC clase I ya que no se procesan de forma eficaz en un péptido de tamaño apropiado en el medio extracelular. Se conoce en la técnica una diversidad de enfoques, sin embargo, que permiten que los oligopéptidos y polipéptidos se adquieran de forma exógena por una célula, que después permite su posterior procesamiento y presentación por una molécula MHC clase I. Ejemplos representativos pero no limitantes de dichos enfoques incluyen electroporación de las moléculas en la célula (Harding, 1992, Eur. J. Immunol., 22:1865-69), encapsulación de las moléculas en liposomas que se fusionan a las células de interés (Reddy et al., 1991, J. Immunol. Methods, 141:157-163), o choque osmótico en que las moléculas se captan mediante pinocitosis (Moore et al., 1988, Cell, 54:777-785). Por tanto, pueden proporcionarse oligopéptidos y polipéptidos que incluyen uno o más de los péptidos descritos en este documento a células presentadoras de antígeno de tal modo que se suministren al citoplasma de la célula, y se procesen posteriormente para permitir la presentación de los péptidos.

También pueden prepararse células presentadoras de antígeno adecuadas para estimular una respuesta CTL in vitro que sea específica para uno o más de los péptidos descritos en este documento introduciendo vectores polinucleotídicos que codifican las secuencias en las células. Estos polinucleótidos pueden diseñarse de modo que expresen solamente un único péptido, múltiples péptidos, o incluso una pluralidad de péptidos. Se conoce en la técnica una diversidad de enfoques que permiten introducir polinucleótidos y expresarlos en una célula, proporcionando por tanto uno o más péptidos descritos en este documento a la ruta de unión de la molécula MHC clase I. Ejemplos representativos pero no limitantes de dichos enfoques incluyen la introducción de ADN plasmídico a través de transferencia génica mediada por partículas o electroporación (Tuting et al., 1998, J. Immunol., 160:1139-47), o la transducción de células con un adenovirus que expresa el polinucleótido de interés (Perez-Diez et al., 1998, Cancer Res., 58:5305-09). Por tanto, pueden proporcionarse oligonucleótidos que codifican uno o más de los péptidos descritos en este documento a células presentadoras de antígeno de tal modo que los péptidos se asocien con moléculas MHC clase I y se presenten en la superficie de la célula presentadora de antígeno y, por consiguiente, estén disponibles para estimular una respuesta CTL.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en este documento incluyen un método para inducir una respuesta CTL in vitro que es específica para una célula tumoral que expresa una molécula de los supertipos A1, A2, o A3 (A11 es un miembro del supertipo A3), mediante lo cual el método incluye poner en contacto un linfocito precursor de CTL con una célula presentadora de antígeno que se ha unido a un inmunógeno que comprende uno o más de los péptidos descritos en este documento.

En realizaciones específicas, los métodos descritos en este documento incluyen un método para inducir una respuesta CTL in vitro que es específica para una célula tumoral que expresa una molécula de los supertipos A1, A2, o A3, mediante lo cual el método incluye poner en contacto un linfocito precursor de CTL con una célula presentadora de antígeno que ha adquirido de forma exógena un oligopéptido o polipéptido inmunogénico que incluye uno o más de los péptidos descritos de acuerdo con la invención.

Una realización adicional más descrita en este documento se refiere a un proceso para inducir una respuesta CTL in vitro que es específica para una célula tumoral que expresa una molécula de los supertipos A1, A2, o A3, que comprende poner en contacto un linfocito precursor de CTL con una célula presentadora de antígeno que está expresando un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en este documento, y donde dicho polinucleótido está unido de forma funcional a un promotor.

Existe una diversidad de técnicas para ensayar la actividad de CTL. Estas técnicas incluyen el marcaje de células diana con radionúclidos tales como $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ o ^3H -timidina, y medir la liberación o retención de los radionúclidos desde las células diana como índice de muerte celular. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Como alternativa, se sabe que los CTL liberan una diversidad de citoquinas cuando se estimulan por una célula diana apropiada, tal como una célula tumoral que expresa la molécula MHC clase I relevante y el péptido correspondiente. Ejemplos no limitantes de dichas citoquinas incluyen IFN- γ , TNF- α , y GM-CSF. Ensayos para estas citoquinas son bien conocidos en la técnica. La metodología para medir tanto la muerte de células diana como la liberación de

citoquinas como una medida de la reactividad de CTL se da en Coligan, J. E. et al. (Current Protocols in Immunology, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Después de la expansión de los CTL específicos de antígeno, éstos últimos pueden entonces transferirse de nuevo al paciente, donde destruirán su célula diana específica. La utilidad de dicha transferencia adoptiva se demuestra en North et al. (199, Infect. Immun., 67:2010-12) y Riddell et al. (1992, Science, 257:238-241). En la determinación de la cantidad de células a reinfundir, los expertos en la materia se verán guiados por la cantidad total de células disponibles, la actividad de los CTL medida in vitro, y el estado del paciente. Típicamente, se infunden de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{12} (por ejemplo, de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{11} o de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10}) CTL específicos de péptido. Los métodos para reinfundir células T en un paciente son bien conocidos y se ejemplifican en la patente de Estados Unidos n.º 4.844.893 de Honski, et al., y la patente de Estados Unidos n.º 4.690.915 de Rosenberg.

Los CTL específicos de péptido pueden purificarse a partir de las células estimuladoras antes de su infusión en el paciente. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la proteína de superficie celular CD8, presente en CTL, junto con una diversidad de técnicas de aislamiento tales como panning de anticuerpos, clasificación por citometría de flujo, y separación con perlas magnéticas para purificar los CTL específicos de péptido de cualquier linfocito no específico de péptido restante o de las células estimuladoras. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Debe apreciarse que la generación de CTL específicos de péptido de este modo, obvia la necesidad de estimular los CTL en presencia de tumor. Por tanto, no hay posibilidad de reintroducir de forma accidental células tumorales en el paciente.

Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a un proceso para tratar a un sujeto que tiene cáncer caracterizado por células tumorales que expresan complejos una molécula de los supertipos A1, A2, o A3, por ejemplo, HLA-A1, HLA-A2, o HLA-A11, mediante lo cual se administran CTL producidos in vitro de acuerdo con los métodos descritos en este documento en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de lisis directa o para lograr la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas.

Otra realización de la presente invención se refiere a un proceso para tratar a un sujeto con cáncer caracterizado por células tumorales que expresan cualquier molécula MHC clase I y un epítipo de la SEC ID N.º 1-13, mediante lo cual se producen CTL in vitro y son específicos para el epítipo o proteína original y se administran en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de lisis directa o para lograr la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas.

Los CTL generados ex vivo pueden usarse para identificar y aislar moléculas de receptor de células T específicas para el péptido. Los genes que codifican las cadenas alfa y beta del receptor de células T pueden clonarse en un sistema de vector de expresión y transferirse y expresarse en células T vírgenes de sangre periférica, células T de ganglios linfáticos, o células progenitoras de linfocitos T de médula ósea. Estas células T, que después estarían expresando un receptor de células T específico de péptido, tendrían entonces reactividad anti-tumoral y podrían usarse en terapia adoptiva de cánceres.

Métodos de detección y diagnóstico

Además de su uso para propósitos terapéuticos o profilácticos, los péptidos inmunogénicos descritos en este documento son útiles como agentes de detección y diagnóstico. Por tanto, los péptidos inmunogénicos descritos en este documento, junto con técnicas modernas de detección génica, hacen posible seleccionar pacientes por la presencia de genes que codifican dichos péptidos en células obtenidas por biopsia de tumores detectados en dichos pacientes. Los resultados de dicha detección pueden ayudar a determinar la eficacia de continuar con el régimen de tratamiento descrito en este documento usando los inmunógenos descritos en este documento.

Como alternativa, los péptidos inmunogénicos descritos en este documento, así como homólogos funcionalmente similares de los mismos, pueden usarse para seleccionar una muestra por la presencia de CTL que reconocen específicamente los epítopos correspondientes. Los linfocitos a detectar en este ensayo normalmente se obtendrán de la sangre periférica, pero pueden obtenerse linfocitos de otras fuentes, incluyendo ganglios linfáticos, bazo, tumores, y líquido pleural. Los péptidos descritos en este documento pueden entonces usarse como herramienta de diagnóstico para evaluar la eficacia de los tratamientos inmunoterapéuticos descritos en este documento. Por tanto, la generación in vitro de CTL como se ha descrito anteriormente se usaría para determinar si los pacientes tienen probabilidad de responder al péptido in vivo. Asimismo, la generación in vitro de CTL podría hacerse con muestras de linfocitos obtenidos del paciente antes y después del tratamiento con los péptidos. La generación satisfactoria de CTL in vivo entonces debe reconocerse mediante una capacidad correspondientemente más fácil de generar CTL específicos de péptido in vitro a partir de linfocitos obtenidos después del tratamiento en comparación con aquellos obtenidos antes del tratamiento.

Los oligopéptidos descritos en este documento, tales como las SEC ID N.º 1-13, también pueden usarse para preparar multímeros, que pueden usarse, por ejemplo, junto con citometría de flujo, para cuantificar la frecuencia de CTL específicos de péptido que están presentes en una muestra de linfocitos de un individuo. Por ejemplo, podrían

combinarse moléculas MHC clase I que comprenden péptidos de las SEC ID N.º 1-13, para formar tetrámeros como se ejemplifica en la patente de Estados Unidos n.º 5.635.363. Dichos tetrámeros pueden usarse para controlar la frecuencia de CTL en la sangre periférica, ganglios linfáticos, o masa tumoral de un individuo que está experimentando inmunoterapia con los péptidos, proteínas, o polinucleótidos descritos en este documento, y se espera que la inmunización satisfactoria condujera a un aumento en la frecuencia de CTL específicos de péptido. Puede encontrarse una descripción de tetrámeros de péptidos y métodos para usarlos en Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Immunology, 2006, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Métodos de terapia

Como se ha indicado anteriormente, una vacuna puede incluir uno o más de los polipéptidos o fragmentos activos de los mismos descritos en este documento, o una composición, o combinación, de péptidos inmunogénicos descritos en este documento. Cuando se emplea más de un polipéptido o fragmento activo, pueden usarse dos o más polipéptidos y/o fragmentos activos como una mezcla física o como una fusión de dos o más polipéptidos o fragmentos activos. El fragmento de fusión o polipéptido de fusión puede producirse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o mediante el uso de enlazadores apropiados para fusionar polipéptidos o fragmentos activos preparados previamente.

Las moléculas inmunogénicas descritas en este documento, incluyendo composiciones de vacuna, pueden utilizarse de acuerdo con los métodos descritos en este documento con el propósito de inhibir, suprimir, o tratar enfermedades, causando la expresión de los péptidos inmunogénicos descritos en este documento, tal como cuando el antígeno se está expresando por células tumorales. Como se usa de acuerdo con la presente solicitud, el término "inhibir" se refiere a un proceso de profilaxis en que un animal, especialmente un mamífero, y más especialmente un ser humano, se expone a un inmunógeno descrito en este documento antes de la inducción o aparición del proceso de enfermedad. Esto podría hacerse cuando un individuo tiene una genealogía genética que indica una predisposición hacia la aparición del estado patológico a prevenir. Por ejemplo, esto podría ser cierto de un individuo cuya ascendencia muestra una predisposición hacia ciertos tipos de cáncer. Como alternativa, el inmunógeno podría administrarse a la población general como se hace frecuentemente para enfermedades infecciosas.

Como alternativa, el término "supresión" se usa a menudo para describir un estado donde el proceso de enfermedad ya ha comenzado, pero aún tienen que reconocerse síntomas obvios de dicha afección. Por tanto, las células de un individuo pueden llegar a ser cancerosas, pero aún no se han reconocido clínicamente signos externos de la enfermedad. En cualquier caso, el término profilaxis puede aplicarse para abarcar tanto inhibición como supresión. En cambio, el término "tratamiento" se utiliza a menudo para indicar la aplicación clínica de agentes para combatir una afección ya existente cuya presentación clínica ya se ha reconocido en el paciente. Esto sucedería típicamente cuando ya se ha diagnosticado que un individual tiene un tumor.

Se entiende que la dosificación adecuada de un inmunógeno descrito en este documento dependerá de la edad, sexo, salud, y peso del destinatario, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado. Sin embargo, la dosificación más preferida puede adaptarse al sujeto individual, determinada por el investigador o clínico. La dosis total necesaria para cualquier tratamiento dado se determinará habitualmente con respecto a una dosis de referencia convencional establecida por un fabricante, tal como se hace habitualmente con vacunas, administrándose dicha dosis en un tratamiento único o en una serie de dosis, cuyo éxito dependerá de la producción de un resultado inmunológico deseado (es decir, producción satisfactoria de una respuesta mediada por CTL contra el antígeno, dando lugar dicha respuesta a la inhibición y/o tratamiento deseado). Por tanto, debe considerarse el programa global de administración al determinar el éxito de un curso de tratamiento y no si una dosis individual, dada de forma aislada, produciría o no el resultado o efecto terapéutico inmunológicamente deseado.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene uno o más de los inmunógenos descritos en este documento es una cantidad suficiente para inducir una respuesta CTL eficaz para inhibir o detener la progresión de la enfermedad. Por tanto, esta dosis dependerá, entre otras cosas, de la identidad de los inmunógenos usados, la naturaleza del estado patológico, la gravedad del estado patológico, la magnitud de cualquier necesidad para prevenir dicha afección cuando no se haya detectado aún, el modo de administración impuesto por la situación que requiera dicha administración, el peso y estado de salud del individuo que está recibiendo dicha administración, y el criterio sensato del médico o investigador. Por tanto, con el propósito de administración profiláctica o terapéutica, las cantidades eficaces en general se encontrarían dentro del intervalo de 1,0 µg a aproximadamente 5.000 µg de péptido por un paciente de 70 kg, seguido de dosificaciones de refuerzo de aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 1.000 µg de péptido de conformidad con un régimen de refuerzo durante días, semanas o meses, dependiendo de la respuesta del destinatario y según se requiera mediante el control posterior de la actividad mediada por CTL en el torrente sanguíneo. Por supuesto, dichas dosificaciones tienen que considerarse solamente como directrices generales y, en una situación dada, la dosificación real puede exceder dichos regímenes de dosificación sugeridos cuando el clínico crea que la afección del destinatario justifica un programa más agresivo de administración. La eficacia de administrar dosis adicionales, y de aumentar o disminuir el intervalo, puede reevaluarse en una base continua, en vista de la inmunocompetencia del destinatario (por ejemplo, el nivel de actividad CTL con respecto a antígenos asociados a tumor o específicos de tumor).

Para dichos propósitos, las composiciones inmunogénicas descritas en este documento pueden usarse contra un estado patológico tal como cáncer mediante su administración a un individuo por una diversidad de vías. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral u oral y, si es por vía parenteral, de forma sistémica o tópica. Las vías parenterales incluyen vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, o bucal. Puede emplearse una o más de dichas vías. La administración parenteral puede ser, por ejemplo, por inyección en bolo o por perfusión gradual en el tiempo.

Típicamente, se preparan vacunas como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones acuosas. También son bien conocidas vacunas en una base oleosa, tales como para inhalación. También pueden formularse formas sólidas que se disuelven o suspenden antes de su uso. Generalmente se añaden vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticos que son compatibles con los ingredientes activos y aceptables para uso farmacéutico. Ejemplos de dichos vehículos incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones salinas, dextrosa, o glicerol. También pueden usarse combinaciones de vehículos. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización bien conocidas incluyendo filtración a esterilidad. Las soluciones resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o las soluciones acuosas pueden liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con agua estéril antes de su administración. Las composiciones de vacuna pueden incorporar adicionalmente sustancias adicionales para estabilizar el pH, o para que funcionen como adyuvantes, agentes humectantes, o agentes de emulsión, que pueden servir para mejorar la eficacia de la vacuna.

La concentración de péptidos estimuladores de CTL descritos en este documento en formulaciones farmacéuticas está sujeta a una amplia variación, incluyendo cualquier punto desde menos del 0,01 % en peso hasta tanto como el 50 % o más. También deben considerarse factores tales como el volumen y la viscosidad de la composición resultante. Los disolventes, o diluyentes, usados para dichas composiciones incluyen agua, dimetilsulfóxido, PBS (solución salina tamponada con fosfato), o solución salina en sí misma, u otros posibles vehículos o excipientes.

Los inmunógenos descritos en este documento también pueden confinarse en estructuras creadas de forma artificial tales como liposomas, ISCOM, partículas de liberación lenta, y otros vehículos que aumentan la inmunogenicidad y/o semi-vida de los péptidos o polipéptidos en suero. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y similares. Los liposomas para su uso en los métodos y composiciones descritas en este documento se forman a partir de lípidos convencionales que forman vesículas que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esterol, tal como colesterol. La selección de lípidos se determina generalmente por consideraciones tales como el tamaño y estabilidad del liposoma en la sangre. Están disponibles diversos métodos para preparar liposomas como se revisa, por ejemplo, por (Coligan, J. E. et al., Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York) y véanse también las patentes de Estados Unidos n.º 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, y 5.019.369. Los liposomas que contienen los péptidos o polipéptidos descritos en este documento pueden estar dirigidos al sitio de células linfoides donde los liposomas después suministran los inmunógenos seleccionados directamente a células presentadoras de antígeno. El direccionamiento puede conseguirse incorporando moléculas adicionales tales como proteínas o polisacáridos en las membranas externas de dichas estructuras, provocando de ese modo el suministro de las estructuras a áreas particulares del cuerpo, o a células particulares dentro de un órgano o tejido dado. Dichas moléculas de direccionamiento pueden incluir una molécula que se une a un receptor en células presentadoras de antígeno. Por ejemplo, podría usarse un anticuerpo que se une a CD80 para dirigir los liposomas a células dendríticas.

Los inmunógenos descritos en este documento también pueden administrarse en forma de composiciones sólidas. Vehículos sólidos no tóxicos convencionales incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, magnesio, celulosa, glucosa, sacarosa, sacarina sódica, y similares. Dichas composiciones sólidas a menudo se administrarán por vía oral, mediante lo cual se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando los péptidos y polipéptidos descritos en este documento con cualquiera de los vehículos enumerados anteriormente. Generalmente, dichas composiciones contendrán un 10-95 % de ingrediente activo, y más preferiblemente un 25-75 % de ingrediente activo.

La administración en aerosol también es una alternativa, que requiere solamente que los inmunógenos se dispersen apropiadamente en un propulsor de aerosol. Porcentajes típicos de los péptidos o polipéptidos descritos en este documento son el 0,01 %-20 % en peso, por ejemplo, el 1 %-10 %. El uso de un tensioactivo para dispersar apropiadamente el inmunógeno puede ser necesario. Tensioactivos representativos incluyen los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácido caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linoléico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir un 0,1-20 % en peso de la composición, por ejemplo, un 0,25-5 %. Los propulsores típicos para dicha administración pueden incluir ésteres y agentes químicos similares, pero no se limitan a ellos de ningún modo. También puede incluirse un vehículo, tal como lecitina, para suministro intranasal.

Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento también pueden suministrarse con un adyuvante. Los adyuvantes incluyen, aunque sin limitación, agonistas del receptor tipo Toll (TLR), bacilo de Calmette Guerin (BCG),

adyuvante completo o incompleto de Freund, un oligodesoxinucleótido de citosina y guanina (CpG-ODN), Montanide ISA-51, gen de activación-3 (LAG-3), fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre, y saponina. También pueden obtenerse efectos adyuvantes administrando una o más citoquinas junto con los inmunógenos descritos en este documento. Estas citoquinas incluyen, aunque sin limitación IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, y GM-CSF. Se describen agonistas ejemplares de TLR en Ghosh et al., 2006, Cell. Immunol., 243:48-57 y Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology, Lippincott Williams & Wilkins; (1 de julio de 2007), ISBN-10: 0781795435, página 17.

Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento también pueden añadirse a células presentadoras de antígeno profesionales tales como células dendríticas que se han preparado ex vivo. Por ejemplo, las células dendríticas pueden prepararse a partir de células madre CD34 positivas de la médula ósea, o pueden prepararse a partir de monocitos CD14 positivos obtenidos de la sangre periférica. Las células dendríticas se generan ex vivo usando citoquinas tales como GM-CSF, IL-3, IL-4, TNF, y SCF. Las DC cultivadas después se pulsan con péptidos a diversas concentraciones usando métodos convencionales que son bien conocidos en la técnica. Las células dendríticas pulsadas con péptido después pueden administrarse por vía intravenosa, subcutánea, o intradérmica, y la inmunización también puede incluir citoquinas tales como IL-2 o IL-12.

Puede suministrarse una vacuna contra el cáncer basada en células presentadoras de antígeno (APC) a un paciente o animal de ensayo mediante cualquier vía adecuada de suministro, que puede incluir inyección, infusión, inoculación, suministro quirúrgico directo, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna contra el cáncer se administra a un ser humano en la región deltoide o región axilar. Por ejemplo, la vacuna se administra en la región axilar como una inyección intradérmica. En otras realizaciones, la vacuna se administra por vía intravenosa.

Un vehículo apropiado para administrar APC puede seleccionarlo un experto en la materia por técnicas rutinarias. Por ejemplo, el vehículo farmacéutico puede ser una solución salina tamponada, por ejemplo, medio de cultivo celular, y puede incluir DMSO para conservar la viabilidad celular.

La cantidad de APC apropiada para administración a un paciente como vacuna contra el cáncer puede basarse en una diversidad de factores, como puede ser la formulación de la propia vacuna. Algunos de estos factores incluyen las características físicas del paciente (por ejemplo, edad, peso, y sexo), las características físicas del tumor (por ejemplo, localización, tamaño, tasa de crecimiento, y accesibilidad), y el grado al cual se están llevando a cabo otras metodologías terapéuticas (por ejemplo, quimioterapia, y radioterapia con haces) en relación con un régimen de global de tratamiento. A pesar de la diversidad de factores que debe considerarse al llevar a cabo los métodos descritos en este documento para tratar un estado patológico, puede administrarse a un mamífero de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 APC (por ejemplo, 10^7 APC) en de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 2 ml de solución (por ejemplo, solución salina) en una única administración. Pueden realizarse administraciones adicionales, dependiendo de los factores descritos anteriormente y otros factores, tales como la gravedad de la patología tumoral. En una realización, se realiza de aproximadamente una a aproximadamente cinco administraciones de aproximadamente 10^6 APC a intervalos de dos semanas.

La vacunación con APC puede ir acompañada por otros tratamientos. Por ejemplo, un paciente que recibe vacunación con APC también puede estar recibiendo quimioterapia, radiación, y/o terapia quirúrgica de forma concurrente. Se describen métodos para tratar el cáncer usando vacunación con APC junto con quimioterapia en Wheeler et al., publicación de patente de Estados Unidos n.º 2007/0020297. En algunas realizaciones, un paciente que recibe vacunación con DC ya ha recibido quimioterapia, radiación, y/o tratamiento quirúrgico para el cáncer. En una realización, un paciente que recibe vacunación con DC se trata con un inhibidor de COX-2, como se describe en Yu y Akasaki, documento WO 2005/037995 y documento US 2008/0199484.

La presente invención también se refiere a una vacuna en que se suministra o administra un inmunógeno descrito en este documento en forma de un polinucleótido que codifica el polipéptido o fragmento activo como se describe en este documento, mediante lo cual se produce in vivo el péptido o polipéptido o fragmento activo. El polinucleótido puede incluirse en un vector de expresión adecuado y combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos podrían expresarse en ADN plasmídico y vectores virales no replicativos tales como vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la encefalitis equina venezolana, adenovirus, u otros virus ARN o ADN. Estos ejemplos se entienden como ilustrativos solamente y no deben verse como limitantes. Está disponible una amplia diversidad de otros vectores y son evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción dada en este documento. En este enfoque, se modifica por ingeniería una parte de la secuencia de nucleótidos del vector viral para que exprese los péptidos o polipéptidos descritos en este documento. Se describen vectores vaccinia y métodos útiles en protocolos de inmunización en la patente de Estados Unidos n.º 4.722.848.

Independientemente de la naturaleza de la composición dada, agentes terapéuticos adicionales pueden también acompañar a los inmunógenos descritos en este documento. Por tanto, con el propósito de tratar tumores, composiciones que contienen los inmunógenos descritos en este documento pueden, además, contener otros agentes farmacéuticos antitumorales. El uso de dichas composiciones con múltiples ingredientes activos se deja al criterio del clínico.

Además, los inmunógenos descritos en este documento pueden usarse para estimular la producción de anticuerpos para su uso en inmunoterapia pasiva, para su uso como reactivos de diagnóstico, y para su uso como reactivos en otros procesos tales como cromatografía de afinidad.

La presente invención también se refiere a anticuerpos que reaccionan con inmunógenos, tal como un polipéptido que comprende uno o más de los péptidos epitópicos de las SEC ID N.º 1-13 como se describe en este documento. También se contemplan específicamente fragmentos activos de dichos anticuerpos. Dichos anticuerpos, y fragmentos activos de dichos anticuerpos, por ejemplo, y estructuras Fab, pueden reaccionar con, incluyendo cuando son altamente selectivo o específicos para, una estructura inmunogénica que comprende 2, 3, 4 o más de los péptidos epitópicos descritos en este documento.

Con la llegada de métodos de biología molecular y tecnología recombinante, ahora es posible que los expertos en la materia produzcan moléculas de anticuerpos por medios recombinantes y de ese modo generen secuencias génicas que codifican secuencias específicas de aminoácidos encontradas en la estructura polipeptídica de los anticuerpos. Dichos anticuerpos pueden producirse clonando las secuencias génicas que codifican las cadenas polipeptídicas de dichos anticuerpos o por síntesis directa de dichas cadenas polipeptídicas, con ensamblaje in vitro de las cadenas sintetizadas para formar estructuras tetraméricas activas (H₂L₂) con afinidad por epítomos y determinantes antigénicos específicos. Esto ha permitido la fácil producción de anticuerpos que tienen secuencias características de anticuerpos neutralizantes de diferentes especies y fuentes.

Independientemente de la fuente de los anticuerpos o nanocuerpos, o el modo en que el experto en la materia elige producir dichos anticuerpos o nanocuerpos, incluyendo contruidos de forma recombinante o sintetizados, in vitro o in vivo, usando animales transgénicos, tales como vacas, cabras y ovejas, o usando cultivos celulares en biorreactores, o por síntesis química directa empleando organismos no vivos en cualquier fase del proceso, todos los anticuerpos y nanocuerpos tienen regiones capaces de interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Las regiones que interactúan con la diana se mencionan como regiones "variables" o "V" y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de anticuerpos de diferente especificidad antigénica.

Los anticuerpos también pueden ser completamente sintéticos, donde las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos se sintetizan y, posiblemente, se optimizan para la unión a los polipéptidos descritos en este documento como si fueran receptores. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados y pueden ser de estructura completamente tetramérica, o pueden ser dimericos e incluir solamente una única cadena pesada y una única cadena ligera. Dichos anticuerpos también pueden incluir fragmentos, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, capaces de reaccionar con y unirse a cualquiera de los polipéptidos descritos en este documento como si fueran receptores.

En este documento se describe además un método para inducir una respuesta CTL en un sujeto, que comprende administrar a sujetos que expresan antígenos del supertipo HLA A1, A2 o A3 una cantidad eficaz (es decir, estimuladora de CTL) de un inmunógeno descrito en este documento, por ejemplo, una cantidad suficiente para inducir una respuesta CTL contra células tumorales que expresan al menos HLA-A1 o HLA-A2, según sea el caso, provocando de este modo una respuesta celular contra dichas células tumorales.

Una realización adicional más de la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta CTL en un sujeto, donde el inmunógeno está en forma de un polinucleótido. En un ejemplo no limitante, el método incluye administrar a sujetos que expresan HLA-A2 al menos un epítomo CTL, donde dicho epítomo o epítomos se seleccionan entre un grupo que comprende los péptidos descritos en este documento, y están codificados dentro de una secuencia polinucleotídica que no incluye la región codificante completa de la proteína, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta CTL contra células tumorales que expresan HLA-A2.

Los péptidos e inmunógenos descritos en este documento también pueden incluir mutaciones (por ejemplo, mutaciones internas) que los vuelven "superantígenos" o "superagonistas" para estimulación de células T. Pueden generarse péptidos superantígenos detectando células T con una biblioteca combinatoria de péptidos sintéticos de exploración posicional (PS-CSL) como se describe en Pinilla et al., 1992, *Biotechniques*, 13:901-5; Borrás et al., 2002, *J. Immunol. Methods*, 267:79-97; el documento US 2004/0072246; y Lustgarten et al., 2006, *J. Immunol.*, 176:1796-1805. Cuando se conoce un epítomo de célula T virgen, se encuentra que aproximadamente el 25 % de los miméticos de epítomo identificados son superagonistas. Se ha informado de miméticos de epítomo superagonistas que son 3 órdenes de magnitud más eficaces que el ligando nativo (Hemmer et al., 2000, *J. Immunol.*, 164: 861-871; La Rosa et al., 2001, *Blood*, 97:1776-86).

Pueden usarse bibliotecas combinatorias sintéticas de exploración posicional (PS-SCL) que representan trillones de péptidos de diferentes longitudes como fuentes imparciales de antígenos peptídicos en ensayos de activación de células T para la identificación de epítomos de células T. Las PS-SCL (Pinilla et al., 1992, *Biotechniques*, 13:901-905) están compuestas de mezclas organizadas sistemáticamente. En el caso de PS-SCL definida de posición única, cada compuesto presente en una mezcla dada tiene un aminoácido individual común en una posición dada, mientras que las posiciones restantes están compuestas de mezclas de los 19 L-aminoácidos naturales (cisteína omitida). Los

datos de detección de una PS-SCL dada permiten la identificación de restos clave en cada posición del péptido. Es importante observar, sin embargo, que la actividad encontrada para una mezcla se debe a la presencia de uno o más péptidos activos específicos dentro de la mezcla, y no a los aminoácidos individuales como entidades diferentes. La combinación de todos los aminoácidos definidos en las mezclas más activas conduce a los compuestos individuales activos.

Las respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno de sujetos vacunados pueden controlarse por varios ensayos diferentes, tales como ensayos de tetrameros, ELISPOT, y PCR cuantitativa. Las siguientes secciones proporcionan ejemplos de protocolos para detectar respuestas con estas técnicas. Están disponibles métodos y protocolos adicionales. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, Coligan, J. et al., Eds., (John Wiley & Sons, Inc.; Nueva York, N.Y.).

Pueden usarse tetrameros compuestos de moléculas MHC recombinantes en complejo con péptido para identificar poblaciones de células T específicas de antígeno. Para detectar células T específicas para antígenos tales como CD133, se sintetizan y proporcionan complejos tetraméricos de péptido específico marcado con fluorocromo (por ejemplo, ficoeritrina (PE)-tHLA) que contienen péptidos de estos antígenos por Beckman Coulter (San Diego, California). Se resuspenden células CD8 de clon CTL específico a 10^5 células/50 μ l de tampón FACS (tampón fosfato más tampón FCS inactivado al 1 %). Se incuban las células con 1 μ l de tHLA durante 30 minutos a temperatura ambiente y se continúa la incubación durante 30 minutos a 4 °C con 10 μ l de mAb anti-CD8 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Las células se lavan dos veces en 2 ml de tampón FACS frío antes del análisis por FACS (Becton Dickinson).

Pueden usarse ensayos ELISPOT para detectar células secretoras de citoquinas, por ejemplo, para determinar si hay células en un paciente vacunado que secretan citoquina en respuesta a antígeno, demostrando de este modo si se han provocado respuestas específicas de antígeno. Se suministran kits de ensayo ELISPOT de R & D Systems (Minneapolis, Minnesota) y se realizan como se describe por las instrucciones del fabricante. Se siembran 1×10^5 células PBMC de pacientes respondedores (R) de antes y después de la vacunación en placas de 96 pocillos con insertos de membrana de nitrocelulosa recubiertos con Ab de captura. Se añaden células estimuladoras (S) (células T2 TAP-deficientes pulsadas con antígeno) a la relación R:S de 1:1. Después de una incubación de 24 horas, las células se retiran lavando las placas 4 veces. Se añade Ab de detección a cada pocillo. Las placas se incuban a 4 °C durante una noche y se repetirán las etapas de lavado. Después de una incubación de 2 horas con estreptavidina-AP, se lavan las placas. Se añaden alícuotas (100 μ l) de cromógeno BCIP/NBT a cada pocillo para revelar las manchas. La reacción se detiene después de 60 min lavando con agua. Las manchas se exploran y cuentan con análisis de imágenes asistido por ordenador (Cellular Technology Ltd, Cleveland, Ohio). Cuando los valores experimentales son significativamente diferentes de la cantidad media de manchas frente a células T2 no pulsadas (valores de fondo), determinada por un ensayo de suma de rango de Wilcoxon bilateral, se sustraen los valores de fondo de los valores experimentales.

La PCR cuantitativa es otro medio para evaluar respuestas inmunitarias. Para examinar la producción de IFN- γ en pacientes por PCR cuantitativa, se descongelan PBMC criopreservadas de muestras pre-vacunación y post-vacunación de los pacientes y células dendríticas autólogas en medio de cultivo RPMI DC con suero del paciente al 10 %, se lavan y se cuentan. Se siembran PBMC a 3×10^6 PBMC en 2 ml de medio en placa de 24 pocillos; se siembran células dendríticas a 1×10^6 /ml y se pulsan 24 horas con 10 μ g/ml de péptido tumoral en 2 ml en cada pocillo en placa de 24 pocillos. Se recogen las células dendríticas, se lavan, y se diluyen hasta 1×10^6 /ml, y se añaden 3×10^5 (es decir, 300 μ l de solución) a los pocillos con PBMC (DC:PBMC = 1:10). Se añaden 2,3 μ l de IL-2 (300 UI/ml) cada 3-4 días, y las células se recogen entre el día 10 y el día 13 después del inicio del cultivo. Las células recogidas después se estimulan con células tumorales o PBMC autólogas pulsadas con 10 μ g/ml de péptido tumoral durante 4 horas a 37 °C. En los días 11-13, se recogen los cultivos, se lavan dos veces, después se dividen en cuatro pocillos diferentes, dos pocillos que se usan para el control (sin diana); y otros dos pocillos de CTL co-cultivados con células tumorales (1:1) si hay células tumorales disponibles. Si no hay células tumorales disponibles, se añaden 10 μ g/ml de lisado tumoral a los CTL. Después de 4 horas de estimulación, se recogen las células, se extrae el ARN, y se evalúa la expresión de ARNm de IFN- γ y CD8 con un sistema de termociclador/cámara de fluorescencia. La eficacia de amplificación por PCR sigue la progresión logarítmica natural, demostrando los análisis de regresión lineal coeficientes de correlación en exceso de 0,99. En base al análisis empírico, se interpreta una diferencia de un ciclo como una diferencia de factor dos en la cantidad de ARNm, y se determinan cantidades de IFN- γ normalizadas a CD8. Un aumento de > 1,5 veces en IFN- γ post-vacuna respecto a pre-vacuna es la norma establecida para sensibilidad a vacuna de tipo I positiva.

Puede usarse el siguiente protocolo para producir CTL específicos de antígeno in vitro a partir de PBMC derivadas de pacientes. Para generar células dendríticas, se cultivan las células adherentes al plástico a partir de PBMC en medio AIM-V suplementado con GM-CSF humano recombinante e IL-4 humana recombinante a 37 °C en una incubadora humidificada de CO₂ (5 %). Seis días después, se estimulan las células dendríticas inmaduras en los cultivos con TNF- α humano recombinante para la maduración. Después se recogen las células dendríticas maduras en el día 8, se resuspenden en PBS a 1×10^6 por ml con péptido (2 μ g/ml), y se incuban durante 2 horas a 37 °C. Se enriquecen las células T CD8+ autólogas a partir de PBMC usando microperlas magnéticas (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Las células T CD8+ (2×10^6 por pocillo) se co-cultivan con 2×10^5 por pocillo de células dendríticas

pulsadas con péptido en 2 ml/pocillo de medio AIM-V suplementado con suero AB humano al 5 % y 10 unidades/ml de rhlL-7 (Cell Sciences) en cada pocillo de placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Se añaden aproximadamente 20 U/ml de IL-2 24 h después a intervalos regulares, 2 días después de cada re-estimulación. En el día 7, se re-estimulan los linfocitos con células dendríticas autólogas pulsadas con péptido en medio AIM-V suplementado con suero AB humano al 5 %, rhlL-2, y rhlL-7 (10 unidades/ml cada una). Se añaden aproximadamente 20 U/ml de IL-2 24 h después a intervalos regulares, 2 días después de cada re-estimulación. En el séptimo día, después de las tres rondas de re-estimulación, se recogen las células y se ensaya la actividad de CTL. Las células cultivadas CD8+ estimuladas (CTL) se co-cultivan con células T2 (una línea celular humana TAP-deficiente) pulsadas con 2 µg/ml de Her-2, gp100, AIM-2, MAGE-1, o péptidos α2 del receptor de IL13. Después de 24 horas de incubación, se mide el IFN-γ en el medio por ensayo ELISA.

La vacunación (por ejemplo, vacunación con DC) puede evaluarse en modelos animales. Los modelos adecuados para cánceres incluyen modelos de inyección, en que se inyectan células de una línea celular tumoral en el animal, y modelos genéticos, en que surgen tumores durante el desarrollo.

Para evaluar la vacunación con células dendríticas en un modelo animal, se aíslan células dendríticas funcionales de células derivadas de médula ósea del animal y se diferencian in vitro en presencia de citoquinas, como se ha detallado anteriormente. Las células dendríticas maduras se pulsan con antígenos tumorales (por ejemplo, antígenos tumorales derivados de la línea celular tumoral que se implantará en el animal o péptidos sintéticos correspondientes a epítomos de esos antígenos). Se implanta a los animales las células de la línea celular tumoral. Después del implante, se vacuna a los animales con células dendríticas pulsadas con antígeno una o más veces. Se mide la supervivencia y sensibilidad inmunitaria.

Kits

La presente descripción también se refiere a kits para tratar cánceres. Los kits son útiles para poner en práctica el método de la invención para tratar el cáncer con una vacuna que comprende un antígeno o APC cargadas con un antígeno como se describe en este documento. El kit es un ensamblaje de materiales o compuestos, incluyendo al menos una de las composiciones de la invención. Por tanto, en algunas realizaciones, el kit incluye un conjunto de péptidos para su uso en vacunación o para preparar células para vacunación. El kit también puede incluir agentes para preparar células (por ejemplo, citoquinas para inducir la diferenciación de DC in vitro). La descripción también proporciona kits que contienen una composición que incluye una vacuna que comprende células dendríticas (por ejemplo, células dendríticas crioconservadas) cargadas con los antígenos como se describe en este documento.

La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit de la invención depende de su fin previsto. Por ejemplo, algunas realizaciones están configuradas con el fin de tratar cáncer cerebral, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, mieloma múltiple, y melanoma. En una realización, el cáncer cerebral es un glioma. En otra realización, el cáncer cerebral es glioblastoma multiforme (GBM). En otra realización, el cáncer cerebral es un astrocitoma. En una realización, el kit está configurado particularmente con el fin de tratar sujetos mamíferos. En otra realización, el kit está configurado particularmente con el fin de tratar sujetos humanos. En otras realizaciones, el kit está configurado para aplicaciones veterinarias, para tratar sujetos tales como, aunque sin limitación, animales de granja, animales domésticos, y animales de laboratorio.

Pueden incluirse instrucciones de uso en el kit. Las "instrucciones de uso" típicamente incluyen una expresión tangible que describe la técnica a emplear en el uso de los componentes del kit para lograr un resultado deseado, tal como tratar el cáncer. Por ejemplo, las instrucciones pueden incluir instrucciones para administrar una vacuna (por ejemplo, que comprende células dendríticas cargadas con los antígenos descritos en este documento) al paciente. Las instrucciones de uso también pueden incluir instrucciones para administraciones repetidas de la vacuna; por ejemplo, para administrar las tres dosis de la vacuna en intervalos de dos semanas.

Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como diluyentes, tampones, vehículos farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteo o medición, u otra parafernalia útil, como reconocerán fácilmente los expertos en la materia.

Los materiales o componentes ensamblados en el kit pueden proporcionarse al facultativo almacenados de cualquier manera conveniente y adecuada que conserve su viabilidad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada, o liofilizada; pueden proporcionarse a temperatura ambiente, refrigerada o congelada. Los componentes están típicamente contenidos en uno o más materiales adecuados de embalaje. Como se emplea en este documento, la expresión "material de embalaje" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para alojar los contenidos del kit, tales como composiciones de la invención y similares. El material de embalaje se construye por métodos bien conocidos, preferiblemente para proporcionar un entorno estéril, libre de contaminante. Los materiales de embalaje empleados en el kit son aquellos utilizados normalmente en tratamientos contra el cáncer o en vacunaciones. Como se usa en este documento, el término "envase" se refiere a una matriz sólida adecuada o material tal como vidrio, plástico, papel, papel metalizado, y similares, capaz de retener los componentes individuales del kit. Por tanto, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio usado para contener cantidades adecuadas de una composición que contiene una vacuna, por ejemplo, una vacuna que comprende un

inmunógeno o células dendríticas cargadas con los antígenos como se describe en este documento. El material de embalaje generalmente tiene una etiqueta externa que indica los contenidos y/o el propósito del kit y/o sus componentes.

5 **Ejemplos**

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

10 Ejemplo 1. Epítomos CD133 HLA-A2 restringidos

Se identificó un epítomo HLA-A2 de CD133 humano, ILSAFSVYV (SEC ID N.º 1). Para demostrar que el péptido se une a moléculas HLA-A2, se incubaron células T2 durante una noche con 100 µM de cada péptido identificado en la Tabla 1. Las células después se incubaron con Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO) a 10 µg/ml durante 1 hora, se lavaron, se incubaron a 37 °C durante 0, 3, o 6 horas en presencia de Brefeldina A (0,5 µg/ml), y después se tiñeron con mAb BB7.2. Para cada punto temporal, se calculó la expresión de HLA-A*0201 inducida por péptido (MFI) como: fluorescencia media de células T2 pre-incubadas con péptido - fluorescencia media de células T2 tratadas en condiciones similares en ausencia de péptido. La CD50 se definió como el tiempo necesario para la pérdida del 50 % de los complejos HLA-A*0201/péptido estabilizados a t = 0. La SEC ID N.º 1 se unió fuertemente a las moléculas HLA-A2.

Tabla 1. Unión de péptidos a HLA-A2

Péptido	Secuencia	SEC ID N.º	MFI			CD50
			0 horas	3 horas	6 horas	
CD133-117	LLFIILMPLV	2	5,5	7,5	1,01	
CD133-301	SLNDPLCLV	3	10,69	14,3	13,3	
CD133-405	ILSAFSVYV	1	79,69	69,26	44,5	>6 h
CD133-708	GLLERVTRI	4	13,07	14,81	1,3	
CD133-804	FLLPALIFAV	5	89	67,59	34,7	
gp100-209-2M	IMDQVPFSV	15	49,41	32,13	30,5	

25 Para generar CTL específicos de péptido, se aislaron células T CD8 (+) de donantes sanos, después se estimularon por DC autólogas pulsadas con péptido. Se generaron células T específicas después de estimular las PBMC por DC autólogas pulsadas con células madre cancerosas apoptóticas (CSC) irradiadas. Se sintetizaron HLA-A*0201/tetrámeros peptídicos conjugados con ficoeritrina. Las células se tiñeron con tetrámeros (5 ng/ml) en PBS + suero AB humano al 0,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron una vez en el mismo tampón, se tiñeron con mAb anti-CD8 humana-FITC (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 °C seguido por análisis de citometría de flujo. Se descubrió que había un 3,72 % de células Tetrámero 405 positivas (SEC ID N.º 1), que era mucho mayor (FIG. 1) que los otros cuatro péptidos ensayados (las FIG. 2, 3, 4 y 5 muestran los resultados de los péptidos de las SEC ID N.º 2, 3, 4, y 5, respectivamente).

35 También se ensayó la unión de los CTL preparados con péptido a células humanas HLA-A2 positivas. Para generar células dendríticas, se cultivaron células adherentes al plástico a partir de PBMC en medio AIM-V suplementado con GM-CSF humano recombinante e IL-4 humana recombinante a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Seis días después, se estimularon las células dendríticas inmaduras con TNF-alfa humano recombinante para la maduración. Después se recogieron las células dendríticas maduras el día 8, se re-suspendieron en PBS a 1 x 10⁶/ml con los péptidos indicados (2 µg/ml), y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Se co-cultivaron PBMC autólogas (2 x 10⁶ por pocillo) con 2 x 10⁵ por pocillo de células dendríticas pulsadas con péptido en 2 ml/pocillo de medio AIM-V suplementado con suero AB humano al 5 % y 10 unidades/ml de rhIL-7 (Cell Sciences) en cada pocillo de placas de cultivo tisular de 24 pocillos.

45 En el siguiente día y después cada 3 días después de ello, se añadieron 300 UI/ml de IL-2 al medio. En el día 7, se re-estimularon los linfocitos con células dendríticas autólogas en medio AIM-V suplementado con suero AB humano al 5 %, rhIL-2, y rhIL-7 (10 unidades/ml cada una). Para generar CTL específicos de péptido, se aislaron células T CD8 (+) de donantes sanos, después se estimularon por DC autólogas pulsadas con péptido. Después de tres ciclos de estimulación, estos CTL pudieron reconocer de forma eficaz tanto HLA-A2 como células madre cancerosas CD133 positivas, medido por la cantidad de IFN-γ (pg/ml) en sobrenadante detectado por ELISA (Tabla 2). Sin embargo, no pudieron reconocer las células madre neurales normales CD133 positivas debido a su ausencia de expresión de MHC. Estos hallazgos demostraron que epítomos derivados de CD133 podían procesarse de forma natural y presentarse por sus MHC autólogos en la superficie celular.

Tabla 2. Unión de CTL estimulados por péptido a CSC HLA-A2 y CD133+

Diana	IFN- γ (pg/ ml) inducido por estímulos de PBMC para la generación de CTL				
	péptido 117	péptido 301	péptido 405	péptido 708	péptido 804
T2 solo	275	179	289	206	211
T2+117	322	174	334	281	275
T2+301	247	165	311	234	148
T2+405	262	185	2450	326	294
T2+708	192	214	394	286	247
T2+804	336	252	390	258	409
CSC4	262	390	2311	403	450

Para ensayar si células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC) podían presentar de forma cruzada el péptido 405 a través de la adquisición de cuerpos apoptóticos de GBM CSC, se cultivaron MoDC en presencia de la línea 4 de GBM CSC irradiada y se usaron para preparar células T CD8⁺ específicas de antígeno CSC in vitro. Como se muestra en la FIG. 6, se produjo un nivel significativamente elevado de IFN- γ (2481 ± 46 pg/ml) cuando se mezcló el cultivo CTL preparado con la línea 66 de GBM CSC en comparación con células madre neurales normales HLA nulas (77 ± 7 pg/ml) y control no diana (85 ± 9 pg/ml). El cultivo CTL preparado también se co-cultivó con otras dos líneas CSC, las líneas 1157 y 1189, y de nuevo se detectaron niveles significativamente mayores de IFN- γ (1328 ± 29 y 1327 ± 7 pg/ml respectivamente) que los controles. Sin embargo, estos niveles fueron significativamente inferiores que el nivel cuando se usaba la línea 4 de GBM CSC primaria como diana (FIG. 6). La tinción con tetrámero del cultivo de preparación de CTL mostró la presencia de CTL específicos de péptido 405, y la frecuencia fue comparable con la del cultivo de preparación de CTL usando MoDC pulsadas con péptido 405, lo que contribuye posiblemente a la mayoría de la producción de IFN- γ (FIG. 7).

Globalmente, estos resultados muestran que el péptido 405 se une de forma relativamente fuerte a la molécula HLA-A*0201 y es altamente inmunogénico. El péptido 405 representa muy probablemente un epítipo CD133 inmunodominante restringido por alelo HLA-A*0201 y es adecuado para inmunoterapia.

Ejemplo 2. Péptidos CD133 superagonistas

Se producen péptidos superagonistas de los epítipos CD133 descritos en este documento por los métodos descritos a continuación. Estos superagonistas péptídicos muestran una capacidad superior de inducir respuestas CTL.

Para esta aplicación, se generan líneas y clones de células T a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de pacientes con glioma. Se usan células B autólogas transformadas con Epstein Barr como células presentadoras de antígeno a través de todos los ensayos funcionales y estimulaciones de células T. Se obtiene sangre de pacientes con glioma y se deposita en capas cuidadosamente sobre la parte superior de tubos cónicos de 50 ml (polipropileno, Sarsted) en una relación de 2 volúmenes por 1 volumen de reactivo Histopaque® (Sigma, St Louis, Missouri). Cada tubo después se coloca en una centrífuga clínica oscilante (Beckman) y se centrifuga durante 30 minutos a 400 g a temperatura ambiente. Las PBMC después se recogen de la superficie de contacto con una pipeta de plástico de transferencia (Samco) y se lavan 2x con D-PBS a 250 g y 1x con medio de cultivo (IMDM, Bio-whittaker, Walkersville, Mariland) que contiene suero humano AB al 8 % (Gemini Bio-products, Woodland, California) a 200 g durante 10 minutos cada etapa. El sobrenadante se aspira y se desecha, y las células se re-suspenden en medio de cultivo.

Se aíslan células T CD8⁺ y CD4⁺ de PBMC por selección positiva siguiendo las instrucciones del fabricante (kits de selección positiva de CD8 y CD4, Dynal Biotech Inc. Lake Success, NY). Las células aisladas se usan inmediatamente para protocolos de estimulación.

Se realiza transformación de células B a partir de PBMC por virus Epstein Barr (EBV) inmediatamente después del aislamiento de PBMC. En resumen, se descongelan PBMC congeladas, se lavan, y se re-suspenden en FBS al 10 % en CRPMI. Se re-suspenden de 5 a 10 millones de PBMC en 2,5 ml de FBS al 10 % en CRPMI. Después, se añaden 2,5 ml de sobrenadante descongelado de células de Tití B95.8 (que contienen el EBV) a cada tubo cónico que contiene las células. Las células se incuban durante 2 horas en un baño de agua a 37 °C. Después se añade FBS al 10 % en CRPMI que contiene 1 μ g/ml de Ciclosporina A a cada tubo. Se transfieren 10 ml de las suspensiones a matraces T-25 y se incuban durante 3 semanas. En este punto, las células forman cúmulos visibles a simple vista. Por examen microscópico, las células parecen grandes, transparentes y posiblemente pilosas. Estos son indicadores de inmortalización de células B por EBV. Las células se mezclan en sus matraces y los 10 ml de cultivo se dividen en 2 nuevos matraces T-25 (5 ml cada uno). Se añaden 5 ml de medio CRPMI-10 fresco que contiene 1 μ g/ml de ciclosporina A a cada matraz y los cultivos se incuban durante 1 semana a 37 °C. En este punto temporal, se tiñe una alícuota de células de cada donante para la expresión de CD19 (Pharmlingen tinte anti-CD 19-APC) y se analizan por citometría de flujo. Las líneas celulares después se expanden y congelan a 5×10^6 /vial. Las células B inmortalizadas se expanden en cultivo dividiendo 1:3 en medio CRPMI-10 (sin ciclosporina A) en matraces T-25 una vez a la semana e incubando a 37 °C, CO₂ al 5 %. Estas líneas de células B linfoblastoides (EBV-LCL) se

usan como células presentadoras de antígeno en los siguientes ensayos funcionales de células T.

5 Se estimulan las PBMC con los antígenos CD133 presentados y con líneas de células madre cancerosas en presencia de células dendríticas autólogas. En resumen, se usan células T derivadas de un único pocillo o múltiples pocillos (cultivos en masa) después de 6-7 días de estimulación. Se hacen diluciones limitantes de células T a una concentración de 0,3, 1, 3 y 10 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). Se añaden 1×10^5 células dendríticas autólogas irradiadas junto con IL-2 e IL-7 (20 U/ml y 10 ng/ml, respectivamente). Se obtiene de aproximadamente cinco a diez veces la cantidad original de las células sembradas. Los pocillos que muestran crecimiento se expanden por re-estimulación con una cantidad más grande de alimentadores alogénicos irradiados, PHA, e IL-2 hasta que se obtienen cantidades suficientes para ensayos de especificidad. En este punto, algunas células se congelan mientras que otras se ensayan para la reactividad antigénica usando diferentes lecturas de activación de células T, concretamente producción de citoquinas, eliminación y proliferación celular. Se realiza ensayo combinado de citoquinas (Millipore, Billerica, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para cuantificar, de un modo imparcial, un gran espectro de citoquinas para determinar la mejor citoquina o citoquinas para la evaluación de la especificidad antigénica.

15 Se obtienen perfiles TCR de los clones de células T generados para demostrar y controlar la clonalidad. El repertorio V β se determina usando citometría de flujo (como se ha descrito anteriormente) con mAb específicos (disponibles en Immunotech, Miami, Florida) para células que se expanden hasta grandes cantidades (> 10 millones). En este punto, los clones generados contra células madre cancerosas se ensayan con un panel de antígenos tumorales conocidos para asegurarse de que estas células son de especificidad "de péptido desconocido" antes de proseguir a la detección de bibliotecas combinatorias.

20 La inmortalización de las células T humanas sensibles a antígeno a partir de PBMC proporciona una ventaja para el estudio de su especificidad fina con las bibliotecas combinatorias, porque se necesita una gran cantidad de células T para la detección de estas bibliotecas. De hecho, para obtener datos adecuados a partir de bibliotecas combinatorias, las células deben crecer hasta un mínimo de 30 a 100 millones de células. Por esta razón, las líneas y clones de células T definidos se inmortalizan. En resumen, se obtiene transducción por magnetofección en células T en división (recientemente estimuladas), que se lavan, cuentan, y siembran con 100 U/ml de IL-2 en medio completo en placas de 96 pocillos (fondo plano). Se incuba una mezcla del vector retroviral con Viomag R/L (OZ Biosciences) durante 20 minutos antes de recubrirse sobre las células T, y la placa después se deja cuidadosamente sobre la parte superior de la placa magnética y se incuba durante una noche. El siguiente día, las células se re-suspenden en medio completo fresco con IL-2 y se transfieren a un pocillo más grande. Después de 48 horas, se evalúa la eficacia de transfección por citometría de flujo tiñendo con anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso conjugado con ficoeritrina (PE). El enriquecimiento en el lecho magnético de células transducidas se realiza de acuerdo con protocolos Miltenyi usando perlas anti-PE (Miltenyi).

25 Se obtienen líneas y clones de células T específicas de CD133 en 2-4 meses desde la estimulación primaria.

40 Se preparan bibliotecas combinatorias de péptidos para detección de péptidos superagonistas como se ha descrito previamente en Pinilla et al., 1994, *Biochem. J.*, 301:847-853.

45 Se realizan ensayos funcionales de células T en placas de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY). Cada placa puede acomodar 80 muestras en las columnas 3-12, con las 2 primeras columnas reservadas para pocillos de control negativo y positivo. La distribución de muestras y reactivos comunes se consigue usando un instrumento automatizado de manipulación de líquidos Precision™ (Biotek, Winooski, Vermont). Todas las muestras, tanto bibliotecas como compuestos individuales, se almacenan en gradillas de 96 tubos que son compatibles tanto con las placas de 96 pocillos como con la instrumentación de manipulación de líquidos. Se ensayan treinta placas por semana con los ensayos funcionales de células T. Para ensayos que se ejecutan por duplicado, esto genera aproximadamente 1000 puntos de datos por semana. Los datos se adquieren en los instrumentos especificados para cada tipo de ensayo y se transfieren a libros de trabajo de Excel™ diseñados específicamente para un análisis rápido y preciso.

50 Se ensayan mezclas de bibliotecas a una concentración final de 100 o 200 μ g/ml usando el recubrimiento de placa general descrito anteriormente. En resumen, se cultivan 25.000 células T en presencia de 50.000 líneas de células linfoblastoides autólogas irradiadas (LCL) y 25 μ l de cada biblioteca mixta a 2 mg/ml en RPMI completo. Cada mezcla se ensaya por duplicado. Los pocillos de control incluyen células T y LCL sin mezclas y con o sin fitohemaglutinina (a una concentración final de 5 μ g/ml). Como se ha mencionado anteriormente para la especificidad antigénica, se ensayan diferentes lecturas de activación de células T para confirmar que la lectura del ensayo proporciona la mejor señal para la detección con las bibliotecas. Después de la detección con la biblioteca, los resultados se usan para diseñar péptidos individuales combinando la selección de los aminoácidos definidos de las mezclas más activas en cada posición definida. Este enfoque proporciona agonistas y péptidos superagonistas optimizados de los epítomos CD133 descritos en este documento. Los péptidos más activos se seleccionan para determinar su inmunogenicidad in vitro y reactividad cruzada con el antígeno nativo.

60 Se sintetizan péptidos agonistas y superagonistas individuales por el método de síntesis de múltiples péptidos

simultánea (Houghten, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5131-35). La pureza e identidad de cada péptido se caracterizan usando un espectrómetro de masas por electronebulización que interactúa con un sistema de cromatografía líquida.

5 Para ensayar la capacidad estimuladora de los péptidos, se cultivan 25.000 células T en presencia de 50.000 LCL autólogos irradiados y cada uno los péptidos individuales a una concentración final de 10 y 1 µg/ml. La actividad estimuladora de los péptidos positivos se determina con experimentos de titulación de dosis para determinar la concentración que produce una actividad estimuladora del 50 % (CE-50).

10 Estos estudios identifican péptidos superagonistas derivados del CD133 descrito en este documento. Se identifican péptidos agonistas fuertes reconocidos con valores de CE-50 en el intervalo nanomolar.

Ejemplo 3. Inmunización con péptidos CD133

15 Se ensaya la vacunación con péptidos y superagonistas del epítipo CD133 A2 para la eliminación de tumores en ratones transgénicos HLA A2 humanizados. Se ensaya la eficacia de la vacunación con epítipo CD133 y su superagonista con respecto a citotoxicidad periférica, infiltración en tumor intracraneal, y supervivencia.

20 En resumen, se inmunizan ratones HHD con CD133-405 o con cada uno de los superagonistas peptídicos descritos en este documento emulsionados en adyuvante incompleto de Freund y antígeno auxiliar. Se ensayan poblaciones en masa de esplenocitos para la citotoxicidad específica contra las células EL4-HHD pulsadas con CD133405, células EL4-HHD sin pulsar de control, o células EL4-HHD-CD133405. Se realiza la medición de la unión y estabilidad del complejo péptido/HLA-A2. Se compara la supervivencia de animales vacunados con superagonistas de epítipo CD133 con la de ratones inmunizados de forma simulada.

25 Se sintetizan péptidos y superagonistas de CD133 por química de N-(9-fluorenil) metoxicarbonilo a pureza >95 % como se indica por cromatografía líquida de alto rendimiento analítica y análisis espectrométrico de masas. Los péptidos se disuelven en PBS/DMSO al 10 % a una concentración de 2 mg/ml y se almacenan a -20 °C hasta su uso.

30 Los péptidos se ensayan en ratones HHD, que están humanizados con respecto a la expresión de HLA-A2 (Pascolo et al., 1997, J. Exp. Med., 185:2043-51). Los ratones HHD usados son nulos para microglobulina Dbcβ2 y transgénicos para la cadena individual de microglobulina HLA-A*0201-β2 (HHD) (Eguchi et al., 2006, Cancer Res., 66:5883-91; Gross et al., 2004, J. Clin. Invest., 113:425-433).

35 Se crea una línea de células tumorales HHD-singénica que expresa CD133. El fragmento de ADNc de CD133 humana de longitud completa se genera por PCR de transcripción inversa usando cebadores directos (AGTATGGCTTTGCTTTGCTTGGC; SEC ID N.º 16) e inversos (TACCGAGCTCGGATCCACTAGT; SEC ID N.º 17) y ARN total derivado de células madre cancerosas de glioblastoma multiforme CSC1. El ADNc de CD133 después se clona en el plásmido de expresión pEF6/vector V5-His-TOPO (Invitrogen) para generar pEF6/V5-CD133. Las células EL4-HHD después se transfectan con pEF6/V5-CD133 usando el kit Cell Line Nucleofector T (Amaya, Gaithersburg, Mariland), y se selecciona el clon resistente a blasticina que expresa de forma estable el nivel más alto de CD133 en base a la citometría de flujo usando mAb contra CD133 (Tessa) (EL4-HHD-CD133) para uso adicional.

45 Las células se tiñen con tetrámeros HLA-A*0201/SEC ID N.º 1 conjugados con ficoeritrina (10 µg/ml) en PBS que contiene albúmina sérica bovina al 1 % durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavan una vez, y se tiñen con anticuerpo anti-CD8 humano o anti-CD8 de ratón conjugado con FITC (BD Biosciences, San Diego, CA). Se realizan análisis de citometría de flujo usando un citómetro Coulter EPICS (Beckman Coulter, Fullerton, California).

50 Para medir la unión y estabilidad del complejo péptido/HLA-A2, se incuban células T2 (1 x 10⁶ células/ml) con diversas concentraciones (0,1-100 nmol/l) de péptidos en RPMI 1640 libre de suero a 37 °C durante una noche en una atmosfera que contiene CO₂ al 5 %. Las células después se lavan dos veces con PBS y tiñen con el mAb BB7.2 durante 30 minutos a 4 °C. Después del lavado, se usa anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Caltag, Burlingame, California) como anticuerpo secundario. Se examinan los niveles de expresión en superficie de HLA-A2 por citometría de flujo. Se evalúa la unión del péptido determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI).

55 Se vacunan ratones HHD (en los días 0 y 7) con inyecciones s.c. de 100 µg de CD133-405 o con cada uno de los superagonistas péptidos emulsionados en adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco, Detroit, Michigan) en presencia de 140 µg del epítipo T auxiliar VHBcore128 I-Ab-restringido, que estimula una respuesta de células T auxiliares CD4+. Los animales de control reciben IFA que contiene péptido auxiliar HBV solamente. En el día 11 después de la segunda inmunización, se sacrifican los animales, y se estimulan 5 x 10⁷ esplenocitos in vitro con el mismo péptido que se usa para la estimulación in vivo (10 µmol/l). En el día 6 de cultivo, se ensayan poblaciones en masa para citotoxicidad específica contra células EL4-HHD o EL4-HHD-CD133-405.

65 Para evaluar la inmunidad protectora sistémica contra exposición a tumor i.c., en el día 7 después de la segunda

5 inmunización, los ratones HHD reciben una inoculación i.c. de células EL4-HHD-CD133-405. En resumen, se inyectan de forma estereotáctica 5×10^4 células EL4-HHD-CD133-405 a través de un sitio de entrada en el bregma 2 mm a la derecha de la sutura sagital y 3 mm por debajo de la superficie del cráneo de ratones anestesiados usando un marco estereotáctico. Los animales se controlan diariamente después del tratamiento para la manifestación de cualquier signo patológico.

10 Los ratones que albergan tumores EL4-HHD-CD133-405 i.c. reciben inmunizaciones en los días 14 y 21 después de la inoculación del tumor, se sacrifican por aspiración de CO₂ en el día 28, y se perfunden a través del ventrículo cardiaco izquierdo con PBS. Se digieren enzimáticamente los cerebros (Walker et al., 2000, J. Immunol., 165 3128-35; Calzascia et al., 2005, Immunity, 22:175-184), y se resuspenden las células de cada cerebro en Percoll al 70 % (Sigma, Saint Louis, Missouri), se revisten con Percoll al 37 % y 30 % y se centrifugan durante 20 minutos a 500 x g. Se recuperan poblaciones de linfocitos de infiltración cerebral (BIL) enriquecidos en la superficie de contacto de Percoll al 70 % con al 37 %.

15 Se comparan los datos de supervivencia usando un ensayo de rango logarítmico. Se analizan las cantidades comparativas de respuestas de células T por ensayo t de Student para dos muestras con varianzas desiguales. Se determina la significación estadística al nivel < 0,05. También se define la respuesta positiva del siguiente modo: la lisis específica por las células respondedoras contra células diana antígeno-positivas es al menos un 15 % y 2 veces mayor que los niveles líticos en condiciones de control correspondientes en al menos dos relaciones efector/diana (E/T). Se realizan contrastes post-hoc (por ejemplo, ensayo de 't' de Student) para determinar diferencias significativas, es decir, $p < 0,05$ entre los 3 grupos de animales que reciben vacunación con epítipo, vacunaciones de control, y control de vehículo PBS. Se usan diez animales/grupo, suficiente para detectar una diferencia de 1,2 DT entre los grupos a una potencia de 0,8 y a $p = 0,05$.

25 Se mide la inflamación del cerebro en respuesta a vacunación realizando un análisis estereológico cuantitativo de la infiltración de linfocitos T, B, y NK y macrófagos. Se detecta un filtrado celular inmunitario solamente en el tumor intracraneal. Se observa afluencia de células CD4+, CD8+, y NK dentro del tumor y el área peritumoral. También se observa activación aumentada de astrocitos, como se evidencia por la regulación positiva de inmunoreactividad GFAP en astrocitos.

30 Ejemplo 4. Actividad de péptidos superagonistas de CD133

35 Se determina la capacidad de péptidos superagonistas de CD133 de inducir CTL capaces de reaccionar de forma cruzada contra el epítipo de tipo silvestre. Se realizan ensayo de unión a HLA-A2 y estabilidad para determinar si la inmunogenicidad mejorada de los péptidos análogos es al menos parcialmente atribuible a una mayor unión/estabilidad de estos péptidos superagonistas en complejos HLA-A2 que son necesarios para el reconocimiento específico de CTL. Se realizan ensayos de CTL que analizan la reactividad frente a la titulación de dosis de péptido en células diana T2 para detectar si los CTL desarrollados usando los péptidos superagonistas poseen una avidéz funcional mayor que los preparados con péptido de tipo silvestre. Clones CTL creados contra el péptido-epítipo agonista tienen un uso más restringido de receptor de células T (TCR) y mayor avidéz funcional de TCR que los clones CTL creados contra el péptido-epítipo natural.

45 Se obtienen PBMC de pacientes con glioma y donantes sanos según un protocolo aprobado por el Comité de Revisión Institucional. Se valida la expresión de HLA-A2 en las PBMC usando los anticuerpos monoclonales (mAb) MA2.1 (contra HLA A2, B17) y BB7.2 (contra HLA A2, Aw69: ambos de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) en ensayos de inmunofluorescencia indirecta controlada por citometría de flujo.

50 Se generan in vitro clones CTL restringidos a HLA-A*0201 específicos para péptidos-epítipos naturales y superagonistas de CD133. Se pulsan células dendríticas derivadas de monocitos maduros recogidos (mMoDC) con péptidos naturales y superagonistas (20 μM) y, después de lavarlos, se mezclan con células T CD8+ enriquecidas magnéticamente a partir de PBMC CD14 negativas crioconservadas descongeladas o PBMC frescas. Se mezclan mMoDC pulsadas con péptido y células T CD8+ enriquecidas a una relación de 1:20 en presencia de sCD40L (2 $\mu\text{g/ml}$) para iniciar la polarización Th1 de mMoDC, que refuerza la producción de IL-12 (Mailliard et al., 2002, J. Exp. Med., 195:473-483; Mailliard et al., 2004, Cancer Res., 64: 5934-37). En el día tres, el cultivo de preparación se suplementa con IL-2 (50 U/ml) e IL-7 (10 U/ml), y en el día 12 el cultivo se re-estimula con PBMC autólogas pulsadas con péptido. En el día 24-28, el cultivo de preparación se ensaya por tinción con tetrámero para la presencia de CTL preparados expandidos específicos para el péptido usado. Como control positivo, se ejecuta la preparación con p24VIH-1 restringido a HLA-A*0201 (SLYNVATL; SEC ID N.º 18) de forma concurrente (Kan-Mitchell et al., 2006, J. Immunol., 176:6690-6701; Mitchell et al., 2007, Cancer Immunol. Immunother., 56:287-301).

60 Para la evaluación de la estabilidad, se incuban células T2 derivadas de pacientes (1×10^6 por ml) durante una noche con 100 $\mu\text{mol/l}$ de cada péptido en RPMI 1640 sin suero a 37 °C. Después de ello, las células se lavan cuatro veces para retirar los péptidos libres y se incuban a 37 °C durante 0, 3, o 6 horas. Las células se tiñen con el mAb BB7.2 para evaluar la expresión de la molécula HLA-A2 en cada punto temporal. Se evalúa la expresión de HLA-A2 inducida por péptido calculando la fluorescencia media de células T2 incubadas con péptido menos la fluorescencia media de células T2 en ausencia de péptido. Se mide la CD50 como el tiempo necesario para la pérdida del 50 % de

los complejos HLA-A2/péptido estabilizados a $t = 0$.

Se determina el uso de TCR de clones CTL por expresión de la región variable de la cadena β (V- β) de TCR. Se evalúa la expresión de TCR-V- β y V- α entre células T CD8 expandidas de forma clonal por PCR a tiempo real usando una sonda fluorogénica (Lang et al., 1997, *J. Immunol. Methods*, 203:181-192). Este método ofrece un grado similar de sensibilidad a la detección convencional de la expresión de TCR-V- β con tiempo reducido de procesamiento. En resumen, se realiza la extracción del ARN total y transcripción inversa. En la etapa de PCR, se usa una sonda V- β -específica 5', cebadores comunes CB 3', y una sonda fluorogénica interna para amplificar 26 posibles genes V- β . La detección y cuantificación de productos de PCR se hace usando un sistema de PCR a tiempo real 7900HT Fast (Applied Biosystems), con que es posible calcular la relación semi-cuantitativa de expresión de V- β de TCR entre células T CD8 expandidas de forma clonal. Una vez determinada la expresión de una V- β de TCR particular, usando el mismo cebador específico de V- β se determina la secuencia correspondiente a la CDR 3. Esto permite la delineación de la clonalidad de los CTL.

Se realiza análisis de descomposición de tetrámeros para determinar la avidéz de TCR de los clones CTL (Savage et al., 1999, *Immunity*, 10:485-492). Se tiñen clones CTL con tetrámero (1-25 nM), como en los experimentos de unión en equilibrio anteriores. Las células se lavan dos veces con tampón FACS (FCS al 4 % y azida sódica al 0,1 % en PBS) y se mantienen en hielo hasta que se mezclan con un exceso de mAb anti-HLA-A02 (BB7.2, BD Biosciences) y después se incuban a temperatura ambiente para permitir la disociación del tetrámero. El mAb anti-HLA-A02 se usa para bloquear la unión de nuevo del tetrámero al TCR. Se hace seguimiento de la disociación durante 0-180 minutos, después de lo cual las células se lavan rápidamente con tampón enfriado en hielo para retirar todo el tetrámero no unido y bloquear el mAb. Las células después se fijan para análisis de citometría de flujo (CyanADP, Beckman-Coulter). Se representa el logaritmo natural del porcentaje de la media geométrica de la fluorescencia (GMF) a cada punto temporal (en comparación con 0 minutos) frente al tiempo. Se deriva la semi-vida de cada multímero pMHC a partir de la pendiente por la ecuación $t_{1/2} = -\ln_2/\text{pendiente}$.

La actividad CTL de los clones CTL preparados in vitro se mide por ensayo citométrico de flujo (Betts et al., 2003, *J. Immunol. Methods*, 281:65-78; Betts et al., 2004, *Methods Cell Biol.*, 75:497-512). En resumen, se mezcla 1:1 el cultivo de preparación que contiene el clon CTL con células T2 pulsadas con péptido durante 6 horas en presencia de CD107a, Monensina, y Brefeldina A. Después de la incubación de 6 horas, las células se tiñen con tetrámeros correspondientes y mAb anti-CD8, seguido de tinción con IFN- γ y TNF α intracelulares. Las células teñidas se ejecutan en analizador ADP Beckman-Coulter CyAn™ (9 colores, 11 parámetros) para análisis citométrico de flujo. Todos los ensayos se ejecutan por triplicado.

Para medir la citotoxicidad, se marcan las dianas con 100 μCi de ^{51}Cr durante 60 minutos, se siembran en placas con fondo en V de 96 pocillos (3×10^3 células/pocillo), y se pulsan con péptidos (1 μM) a 37 °C durante 2 horas. Se añaden efectores y se incuban a 37 °C durante 4 horas adicionales. Se recogen cien microlitros de sobrenadante, y se mide la radiactividad en un contador gamma. El porcentaje de lisis específica se determina como: $(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea}) \times 100$.

Como marcador sustituto para respuestas CTL, pueden controlarse las respuestas de citoquinas, tales como IFN- γ (Mailliard et al., 2004, *Cancer Res.*, 64:5934-37; Herr et al., 2000, *Blood*, 96:1857-64) e IL-2 (Carrabba et al., 2003, *Cancer Res.*, 63: 1560-67). Se miden los niveles de secreción de IFN- γ e IL-2 de cultivos de CTL estimulados con péptidos nativos o superagonistas usando ELISA específico de citoquinas y ensayos de inmunospot ligado a enzimas de IFN- γ .

Se mide la afinidad relativa (RA) de péptidos superagonistas de CD133 por HLA-A*0201. En resumen, se incuban células T2 con diversas concentraciones de péptidos que varían de 100 a 0,1 μM durante una noche y después se tiñen con mAb BB7.2 para cuantificar la expresión en superficie del alelo HLA-A*0201. Para cada concentración de péptido, se calcula la tinción específica de HLA-A*0201 como el porcentaje de tinción obtenida con 100 μM del péptido de referencia VIHpol589 (IVGAETFYV; SEC ID N.º 19). La RA se determina como: $\text{RA} = (\text{concentración de cada péptido que induce el 20 \% de expresión de HLA-A*0201} / \text{concentración del péptido de referencia que induce el 20 \% de expresión de HLA-A*0201})$.

Se evalúa la estabilidad de complejos péptido superagonista/HLA-A*0201. En resumen, se incuban células T2 durante una noche con 100 μM de cada péptido. Las células después se incuban con Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO) a 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 hora, se lavan, se incuban a 37 °C durante 0, 2, 4, o 6 horas en presencia de Brefeldina A (0,5 $\mu\text{g/ml}$), y después se tiñen con mAb BB7.2. Para cada punto temporal, se calcula la expresión de HLA-A*0201 inducida por péptido como: fluorescencia media de células T2 preincubadas con péptido - fluorescencia media de células T2 tratadas en condiciones similares en ausencia de péptido. La CD50 se define como el tiempo necesario para la pérdida del 50 % de los complejos HLA-A*0201/péptido estabilizados a $t = 0$.

Se generan CTL a partir de PBMC humanas. Se recogen PBMC por leucofóresis de voluntarios HLA-A*0201 sanos. Se producen células dendríticas a partir de células adherentes (2×10^6 células/ml) cultivadas durante 7 días en presencia de 500 UI/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (Leucomax; Schering-Plough, Kenilworth, Nueva Jersey) y 500 UI/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) en medio completo [RPMI

1640 suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10 %, L-glutamina 2 μM (Invitrogen) y antibióticos]. En el día 7, se recogen las células dendríticas y se pulsan con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de péptido en presencia de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de $\beta 2\text{m}$ (Sigma) durante 4 horas a 20 °C y después se irradian (4200 rad). Se aíslan las células T CD8+ por selección positiva con perlas inmunomagnéticas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se co-cultiva un total de $0,5 \times 10^6$ células T CD8+ con $0,25 \times 10^5$ células dendríticas en un volumen final de 0,5 ml/pocillo en una placa de 48 pocillos en presencia de 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems). Se añade IL-10 humana (R&D Systems) a 10 ng/ml el siguiente día, y se añaden 30 UI/ml de IL-2 humana (Proleukin; Chiron Corp.) en el día dos. Siete y 14 días después de la estimulación primaria, se vuelven a estimular las células T CD8+ con células adherentes irradiadas pulsadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de péptido en presencia de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de $\beta 2\text{m}$. Se añaden IL-10 humana (10 ng/ml) e IL-2 (50 UI/ml) 24 y 48 horas después, respectivamente. Siete días después de la segunda re-estimulación, se ensayan pocillos individuales de los cultivos para citotoxicidad específica de péptido sobre células T2 cargadas con péptido en presencia de células K562 frías (relación diana caliente/fría 1:33).

También se generan CTL a partir de pacientes con glioblastoma. Se evalúan las PBMC de un total de 30 pacientes con glioma HLA-A2+ para su sensibilidad in vitro contra péptidos de tipo silvestre y superagonistas. Se determina la proporción de pacientes humanos que desarrollarán CTL específicos capaces de reconocer el péptido CD133 de tipo silvestre después de estimulación con el péptido superagonista. También se determina si estos CTL reconocen células T2 pulsadas con péptido o líneas de células madre cancerosas HLA-A2+ que expresan CD133.

Se detecta producción intracelular de IFN- γ . Se incuba un total de 5×10^4 células T con 10^5 células T2 cargadas con péptido o con 10^5 células tumorales en presencia de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Brefeldina A a 37 °C. Seis horas después, las células se tiñen con mAb anti-CD8 conjugado con ficoeritrina (Caltag Laboratories, Burlingame, California) en PBS durante 25 minutos a 4 °C y se fijan con paraformaldehído al 4 % en PBS (Sigma). Las células después se permeabilizan con PBS + BSA al 0,5 % + saponina al 0,2 % (Sigma) y se tiñen con mAb anti-IFN- γ conjugado con proteína de la poliposis adenomatosa coli (PharMingen, Mississauga, Ontario, Canadá) durante 25 minutos a 4 °C. Las células se analizan en un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Se usan kit de ensayo de inmunospot absorbente ligado a enzimas (ELISPOT) (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota) para detectar respuestas inmunitarias. Se siembran 1×10^5 células PBMC de pacientes respondedores (R) de antes y después de la vacunación en placas de 96 pocillos con insertos de membrana de nitrocelulosa recubiertos con Ab de captura. Se añaden células estimuladoras (S) (T2 pulsadas con péptido potencial) a la relación R:S de 1:1. Después de una incubación de 24 horas, se retiran las células lavando las placas 4 veces. Se añade el Ab de detección a cada pocillo. Las placas se incubarán a 4 °C durante una noche, y se repiten las etapas de lavado. Después de una incubación de 2 horas con estreptavidina-fosfatasa alcalina, se lavan las placas. Se añaden alícuotas (100 μl) de solución de sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT a cada pocillo para revelar las manchas. La reacción se detiene después de 60 minutos lavando con agua. Las manchas se exploran y cuentan con análisis de imágenes asistido por ordenador (Cellular Technology Ltd, Cleveland, Ohio). Cuando los valores experimentales son significativamente diferentes de la cantidad media de manchas frente a células T2 no pulsadas (valores de fondo), determinada por un ensayo de suma de rango de Wilcoxon bilateral, se sustraen los valores de fondo de los valores experimentales. Este ensayo proporciona un coeficiente de variación intra-ensayo para ELISPOT de menos del 10 %.

Los CTL inducidos por superagonista poseen avidéz mayor, debido a su mayor afinidad o estabilidad entre TCR y complejos péptido-MHC. La mayor avidéz se correlaciona con la avidéz de interacciones célula T-diana y la sensibilidad antitumoral de células T. La intensidad (Yee et al., 1999, J. Immunol., 162:2227-34), o estabilidad (Dutoit et al., 2002, J. Immunol., 168:1167-71) de tinción de células T específica con tetrámeros HLA, y el umbral de tinción positiva usando dosis de titulación de tetrámeros (Ercolini et al., 2005, J. Exp. Med., 201:1591-1602) son indicativos de la avidéz relativa de células T específicas.

50 Ejemplo 5. Epítipo restringido a HLA-A2 de CD133 de ratón

El equivalente de ratón de la SEC ID N.º 1, MLLQVSHYL (SEC ID N.º 11) también se unió a HLA-A2, a pesar de tener solamente dos restos de aminoácido en común. Se incubaron células T2 durante una noche con 0 μM , 10 μM , o 100 μM de la SEC ID N.º 11. Las células después se incubaron con Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO) a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hora, se lavaron, se incubaron a 37 °C en presencia de Brefeldina A (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), y después se tiñeron con mAb BB7.2. Se midió la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo. La fluorescencia celular aumentó de un modo dependiente de la dosis (FIG. 8), lo que indica que la SEC ID N.º 11 se unía a las moléculas HLA-A2. Este ejemplo indica que equivalentes de la SEC ID N.º 1 de otras especies también son epítipos HLA-A2.

60 Otras realizaciones

Se han descrito varias realizaciones de la invención. No obstante, se entenderá que pueden hacerse diversas modificaciones sin alejarse del alcance de la invención.

65

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno aislado que consiste en un péptido aislado de 30 restos de aminoácido o menos que comprende la secuencia amino ILSAFSVYV (SEC ID N.º 1) con dos o menos sustituciones de aminoácido, en el que el inmunógeno es capaz de unirse a antígeno de leucocitos humanos (HLA), en el que el inmunógeno está unido opcionalmente a uno cualquiera de: un vehículo inmunogénico, un agonista del receptor tipo Toll, un péptido inmunogénico que se sabe que estimula una respuesta inmunitaria del tipo de células T auxiliares, una citoquina, un anticuerpo, un ligando de receptor, un lípido, un péptido antigénico múltiple, polietilenglicol, una secuencia líder, una secuencia de secreción, o una secuencia empleada para la purificación del péptido.
2. El inmunógeno de la reivindicación 1, en el que la secuencia amino ILSAFSVYV tiene dos o menos sustituciones conservativas de aminoácido.
3. El inmunógeno de la reivindicación 1 o 2, en el que las dos o menos sustituciones en el péptido no suceden en la posición 2 u 8 de la SEC ID N.º 1.
4. El inmunógeno de la reivindicación 1, en el que la secuencia amino ILSAFSVYV tiene una sustitución de aminoácido.
5. El inmunógeno de la reivindicación 1, en el que el inmunógeno es capaz de provocar *in vitro* o *in vivo* la activación de una respuesta CTL contra una presentación de CD133 *in vitro* o *in vivo* por una célula presentadora de antígeno.
6. El inmunógeno de la reivindicación 1, en el que el péptido es una variante superagonista de la SEC ID N.º 1.
7. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el HLA es HLA-A2.
8. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el inmunógeno es de 15 aminoácidos o menos, 14 aminoácidos o menos, 13 aminoácidos o menos, 12 aminoácidos o menos, 11 aminoácidos o menos, 10 aminoácidos o menos, o 9 aminoácidos.
9. El inmunógeno de la reivindicación 1, en el que el péptido aislado de 30 restos de aminoácido o menos comprende la secuencia amino ILSAFSVYV (SEC ID N.º 1) sin ninguna sustitución de aminoácido en la SEC ID N.º 1.
10. El inmunógeno de la reivindicación 1, en el que el péptido aislado de 30 restos de aminoácido o menos consiste en la secuencia amino ILSAFSVYV (SEC ID N.º 1).
11. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el inmunógeno está unido a uno cualquiera de: un vehículo inmunogénico, un agonista del receptor tipo Toll, un péptido inmunogénico que se sabe que estimula una respuesta inmunitaria del tipo de células T auxiliares, una citoquina, un anticuerpo, un ligando de receptor, un lípido, un péptido antigénico múltiple, polietilenglicol, una secuencia líder, una secuencia de secreción, o una secuencia empleada para la purificación del péptido.
12. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
13. Una composición que comprende el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el polinucleótido de la reivindicación 12 y un adyuvante o citoquina.
14. Una célula dendrítica aislada que presenta en su superficie celular en el contexto de un HLA-A2 el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
15. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el polinucleótido de la reivindicación 12, para su uso como medicamento.
16. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o el polinucleótido de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el cáncer se caracteriza por células tumorales que expresan HLA-A2.
17. Vacuna celular que se puede preparar usando una célula presentadora de antígeno y el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el polinucleótido de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de un cáncer.
18. La vacuna celular de la reivindicación 17, en la que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.
19. Un método para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) *in vitro* que es específica para una célula tumoral que expresa HLA-A2, comprendiendo el método poner en contacto un CTL precursor con el inmunógeno de

una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en condiciones que generan una respuesta CTL contra dichas células tumorales.

- 5 20. Un método para inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) *in vitro* que es específica para una célula tumoral que expresa HLA-A2, comprendiendo el método poner en contacto un CTL precursor con una célula que comprende el polinucleótido de la reivindicación 12.

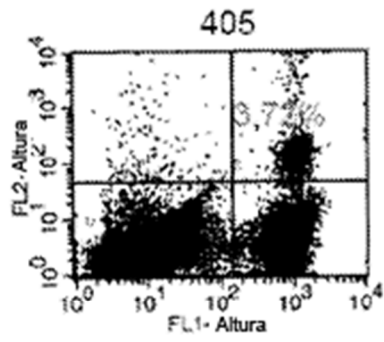


Fig. 1

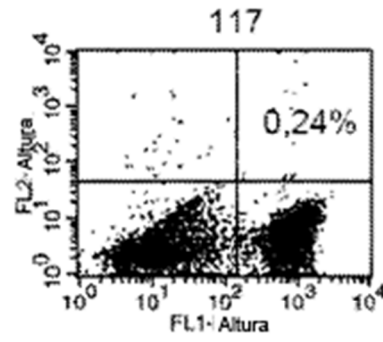


Fig. 2

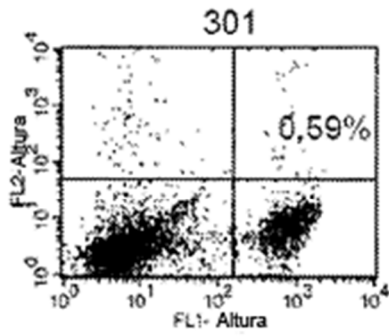


Fig. 3

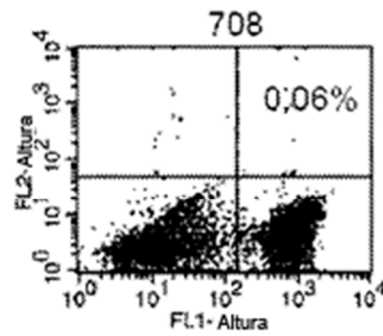


Fig. 4

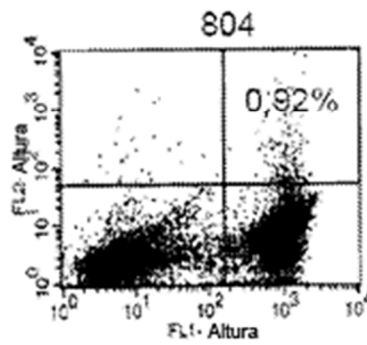


Fig. 5

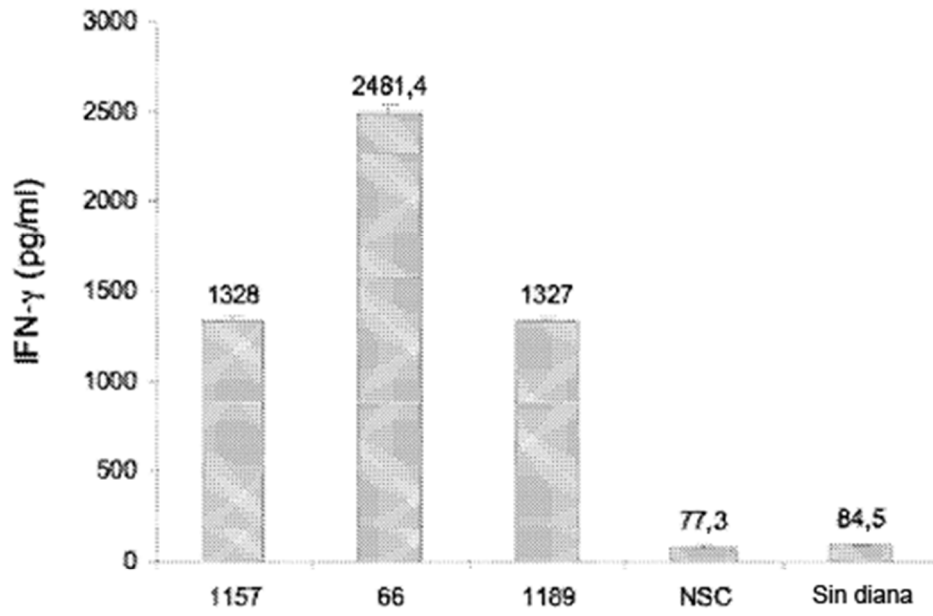


Fig. 6

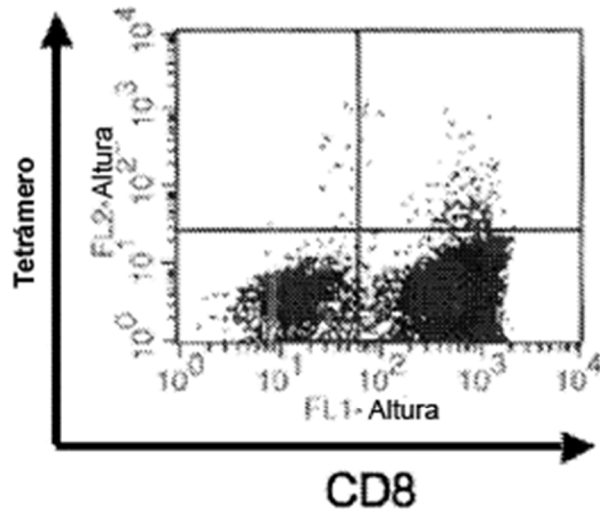


Fig. 7

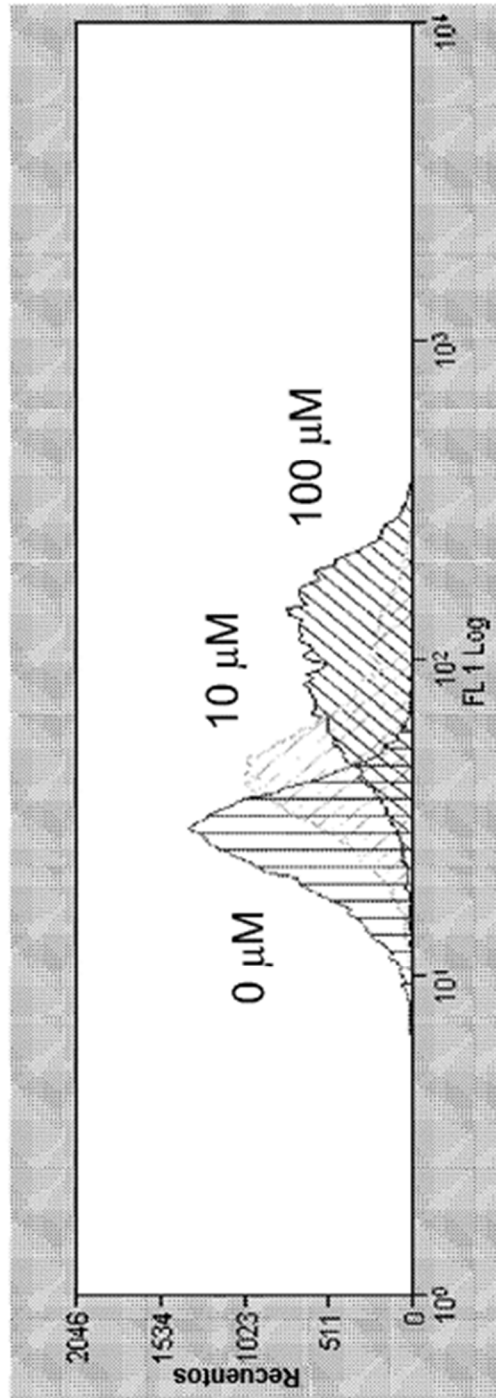


Fig. 8

Hs	ILSAFSVYV	(SEC ID N.º 1)
Pt	ILSEFSVYV	(SEC ID N.º 6)
Cf	KLSDFIGYI	(SEC ID N.º 7)
Ec	KLSNFMDYI	(SEC ID N.º 8)
Bt	TLSNFVRYI	(SEC ID N.º 9)
Rn	VLLQFSHYL	(SEC ID N.º 10)
Mm	MLLQVSHYL	(SEC ID N.º 11)
	* . *:	

Fig. 9