

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 337**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2004 PCT/US2004/041921**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2005 WO05058937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2004 E 04814140 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1697399**

54 Título: **Un epítopo de linfocito T citotóxico humano y su epítopo agonista del número no variable de secuencias de repetición en tándem de MUC-1**

30 Prioridad:

12.12.2003 US 529329 P

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

12.06.2017

73 Titular/es:

**GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPR. BY THE SECR. OF THE DEPT. OF HEALTH AND HUMAN SERVICES AND HIS SUCCESSORS (100.0%)
Washington, DC 20231, US**

72 Inventor/es:

**SCHLOM, JEFFREY y
TSANG, KWONG-YOK**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 616 337 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

Un epítipo de linfocito T citotóxico humano y su epítipo agonista del número no variable de secuencias de repetición en tándem de MUC-1

5

Campo de la invención

Se han identificado secuencias epitópicas de CTL fuera de los antígenos tumorales inmunogénicos MUC-1 tradicionales y los residuos de anclaje de HLA. En particular, la invención describe un método para la activación de células T mediante la modificación de residuos de anclaje de HLA para proporcionar una respuesta inmunitaria más fuerte a los antígenos nativos asociados con tumores sólidos, leucemias o linfomas.

10

Antecedentes de la invención

El antígeno asociado a tumor MUC-1, o DF-3/MUC-1, se expresa en exceso en la superficie celular de muchos adenocarcinomas humanos, tales como carcinoma de ovario, mama, páncreas, colorrectal y de próstata y neoplasias malignas hematológicas incluyendo el mieloma múltiple y algunos linfomas no Hodgkin de células B. Mientras MUC-1 se expresa en algunos tejidos epiteliales normales en las superficies lumbinales, se ha demostrado que la localización apical de MUC-1 se pierde en los tejidos tumorales. Además, MUC-1 está infra-glicosilada en los adenocarcinomas humanos en comparación con los tejidos normales y por lo tanto los epítopos antigénicos de la proteína central están más expuestos. También se ha demostrado que un alto nivel de expresión y secreción de MUC-1 está asociado con un mal pronóstico y un alto potencial metastásico. Inicialmente se demostró que las células T citotóxicas no restringidas por el complejo de histocompatibilidad (MHC) podrían establecerse a partir de sujetos con carcinoma de páncreas, cáncer de ovario y mieloma múltiple; se mostró que estas células T reconocían el núcleo de la proteína MUC-1 en el número variables de 20 aminoácidos de la región de repeticiones en tándem (VNTR)². Si bien la región VNTR es inmunogénica para los CTL no restringidos por MHC así como para la producción de anticuerpos específicos para MUC-1, se encuentra disponible una información relativamente limitada con respecto a la inmunogenicidad de la región fuera de la VNTR.

15

20

25

Brossart et al. (1999; Blood 93: 4309-4317) identifican dos epítopos de células T restringidos por HLA-A2 derivados de MUC-1 y sugieren el uso de los péptidos para el desarrollo de terapias de vacunación basadas en células dendríticas.

30

Heukamp et al. (2001; Int. J. Cancer 91: 385-392) identifican tres epítopos de células T restringidos por HLA-A*0201 no derivados de MUC-1 VNTR que inducen inmunidad antitumoral protectora en ratones transgénicos para HLA-A2/K^b.

35

El tratamiento actual de los cánceres incluye la terapia de radiación y la quimioterapia, que tienen efectos particularmente adversos en un sujeto sometido a este tipo de terapias.

40

En consecuencia, existe una necesidad de mejorar los tratamientos más seguros que tienen efectos protectores de larga duración para la prevención y el tratamiento de tumores. En particular, existe una necesidad de tratamientos que sean más específicos y menos tóxicos que los agentes terapéuticos actualmente disponibles.

Compendio de la invención

45

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido aislado de hasta 12 aminoácidos de longitud y que comprende la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1, 14, 15, 16, ó 19.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente.

50

Se proporciona adicionalmente un vector de ácido nucleico que comprende una o más moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente, conectado operablemente a un promotor inducible.

55

La invención también proporciona una célula anfitriona que comprende el vector definido anteriormente.

También se proporciona el uso de la molécula de ácido nucleico aislada que se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1.

60

Se proporciona adicionalmente de acuerdo con la invención el uso del vector de ácido nucleico definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral

MUC-1.

La invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico aislada como se define anteriormente para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1.

5 También se proporciona el uso de uno o más de los polipéptidos tal como se definen anteriormente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a un tumor MUC-1.

10 Se proporcionan adicionalmente uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a un tumor MUC-1.

15 Además se proporciona el uso de células dendríticas de un sujeto que sufre cáncer, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor MUC-1, en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto que sufre cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente antes de ser administradas al sujeto.

20 También se proporcionan de acuerdo con la invención células dendríticas de un sujeto que padece cáncer para el uso en el tratamiento de un tumor MUC-1, en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto que padece cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente antes de ser administradas al sujeto. Se proporciona adicionalmente el uso de uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente fusionados a un inmunógeno débil para la fabricación de un medicamento para la generación de una respuesta inmunitaria al inmunógeno débil.

25 Se proporcionan adicionalmente uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente fusionados a un inmunógeno débil para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria al inmunógeno débil.

30 La invención proporciona adicionalmente el uso de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor MUC-1, en donde las PBMC se activan poniendo en contacto las PBMC con células dendríticas, y en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto que padece cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente antes de que las PBMC activadas sean administradas al sujeto.

35 También se proporcionan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto que padece cáncer para su uso en el tratamiento de un tumor MUC-1, en donde las PBMC se activan poniendo en contacto las PBMC con células dendríticas, y en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto que padece cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos definidos anteriormente antes de que las PBMC activadas sean administradas al sujeto.

40 Otras características de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas y se describen a continuación.

45 La invención describe la identificación y caracterización de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) anti-tumorales. En particular, se describen los epítomos de CTL de MUC-1 en la región extracelular de la región de repeticiones terminales en tándem de número no variable (VNTR) de MUC-1. La VNTR no es una región de MUC-1, que se sabe tradicionalmente que tienen epítomos inmunogénicos. La invención también describe la generación de epítomos agonistas potenciadores que generan una reacción de las células inmunitarias más fuerte que los péptidos nativos.

50 La invención describe una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un antígeno polipeptídico agonista derivado de un antígeno tumoral, tal como, por ejemplo, MUC-1, en donde el polipéptido agonista estimula una respuesta inmunitaria más fuerte en comparación con un polipéptido nativo.

55 El polipéptido agonista se puede unir a moléculas HLA con una alta avidéz en comparación con los polipéptidos nativos. Preferiblemente, el polipéptido agonista tiene una constante de asociación (K_a) superior para las moléculas HLA que un polipéptido nativo. También preferiblemente, el polipéptido agonista tiene una constante de disociación (K_d) inferior para moléculas HLA que un polipéptido nativo.

El polipéptido agonista de la invención deriva de una región de repeticiones en tándem de número no variable de MUC-1. El polipéptido agonista genera una respuesta inmunitaria.

60 En un aspecto de la invención, la respuesta inmunitaria generada es una respuesta inmunitaria celular. Las respuestas inmunitarias celulares incluyen respuestas de células T citotóxicas, respuestas de células T auxiliares, y las respuestas inmunitarias de células B.

ES 2 616 337 T3

La descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente a (es decir, que puede codificar) cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos. Los SEQ ID NO: 1 a 19 se identifican por:

SEQ ID NO (péptido)	Secuencia peptídica	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO (n.t.)
1	ATWGQDVTSV	GCC/ACC/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	20
2	ALWGQDVTSV	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	21
3	ALLVLCVLLV	GCC/CTG/CTG/GTC/CTG/GTC/TGC/GTC/CTG/GTC	22
4	TISDVSVSDV	ACC/ATC/TCG/GAT/GTC/TCG/GTC/TCG/GAT/GTC	23
5	ALAIYYLIAL	GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG/ATC/GCC/CTG	24
6	VLVALAIVYL	GTC/CTG/GTC/GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG	25
7	YLIALAVCQC	TAC/CTG/ATC/GCC/CTG/GCC/GTC/TGC/AAC/TGC	26
8	WGQDVTSVPV	TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC/ACC/GTC	27
9	REGTINVHDV	AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC/CAC/GAT/GTC	28
10	GTQSPFFLLL	GGC/ACC/CAG/TCT/AAC/TTC/TTC/CTG/CTG/CTG	29
11	LAFREGTINV	CTG/GCC/TTC/AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC	30
12	TLASHSTKTD	ACT/CTG/GCC/TCG/CAC/TCG/ACC/AAG/ACC/GAT	31
13	LQRDISEMFL	CTG/AAC/AGA/GAT/ATC/TCG/GAA/ATG/TTC/CTG	32
14	AIWGQDVTSV	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	33
15	ALWGQDVTSL	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	34
16	AMWGQDVTS V	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	35
17	AMWGQDVTSL	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	36
18	AIWGQDVTSL	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	37
19	ALWGQDVTSV		

5 El vector de la invención puede comprender moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias, tales como por ejemplo, B7-1, ICAM-1 y LFA-331.

10 La descripción proporciona la transducción de células dendríticas con un vector que comprende cualquiera de las moléculas identificadas por los SEQ ID NO: 1 a 19, los fragmentos o variantes de los mismos, y opcionalmente, las moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias, tales como por ejemplo, B7-1, ICAM-1 y LFA-3.35.

15 Las células dendríticas transducidas con el vector que comprende cualquiera de las moléculas identificadas por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos, y opcionalmente, las moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias, puede generar una respuesta inmunitaria, tal como la activación de una respuesta de células T citotóxicas.

20 La descripción proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos como los identificados por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos, conectado operablemente a un promotor inducible.

25 El vector de ácido nucleico puede ser un vector viral, un plásmido y similares. El vector de ácido nucleico puede comprender un promotor inducible que es específico del tejido, y, opcionalmente, moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias.

La célula anfitriona de la invención puede ser una célula presentadora de antígeno, tal como por ejemplo, un monocito/macrófago, célula dendrítica o similares.

En un aspecto de la invención, el polipéptido comprende el fragmento de unión a HLA del SEQ ID NO: 19.

En otro aspecto de la invención, el inmunógeno débil es un antígeno de diferenciación, o un antígeno tumoral.

5 En otra realización preferida, el fragmento de unión a HLA del SEQ ID NO: 19 se fusiona a un antígeno carcinoembrionario, un antígeno tumoral, un auto-antígeno, un antígeno viral y similares.

10 En un aspecto de la invención, el polipéptido comprende el SEQ ID NO: 19. Preferiblemente, el polipéptido se une a moléculas HLA con una alta avididad y tiene una constante de asociación (K_a) superior para el HLA que un polipéptido nativo y/o una constante de disociación (K_d) inferior para el HLA que un polipéptido nativo.

15 En otro aspecto de la invención, la presentación de antígenos, por las células presentadoras de antígenos de los polipéptidos induce una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria celular. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria celular es una respuesta de las células T citotóxicas, una respuesta de las células T auxiliares, o una respuesta inmunitaria de células B.

Se describen otros aspectos de la invención más abajo.

Breve descripción de las figuras

20 Las Figuras 1A y 1B son gráficos que muestran la unión del péptido P-92 de MUC-1 y los agonistas P-93L y P-93I a la molécula HLA-A2. La Figura 1A es un gráfico que muestra el uso de los péptidos a concentraciones de 0-50 $\mu\text{g/ml}$. La Figura 1B es un gráfico que muestra el uso de los péptidos a concentraciones de 0-12,5 $\mu\text{g/ml}$. Péptido P-92 de MUC-1 (cuadrado abierto), P-93L (cuadrado cerrado), P-93I (triángulo cerrado). Los resultados se expresan en intensidad media de fluorescencia (IMF).

25 La Figura 2 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad del complejo del péptido P-92, P-93L o P-93I con HLA-A2. Se incubaron células T2 durante la noche con péptido P-92 (cuadrado abierto), P-93L (cuadrado cerrado) o P-93I (triángulo cerrado) a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y después se eliminó el péptido no unido y se incubaron con brefeldina-A para bloquear el suministro de nuevas moléculas de clase I a la superficie celular. En los tiempos indicados, las células se tiñeron para determinar la presencia de complejos péptido de superficie-HLA-A2. Los resultados se expresan en porcentaje relativo de unión en comparación con el 100% a tiempo 0.

30 La Figura 3 es un gráfico que muestra la capacidad de las células B autólogas pulsadas con péptido P-92 (cuadrado abierto), péptido P-93L (cuadrado cerrado) y péptido P-93I (triángulo cerrado) de MUC-1 nativa para inducir la producción de IFN- γ por las células T específicas de MUC-1. Los péptidos se utilizaron a concentraciones de 0-6,25 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se expresan en pg/ml.

35 La Figura 4 es un gráfico que muestra la citotoxicidad de las líneas de células T específicas de MUC-1 contra las células C1R-A2 pulsadas con péptido P-92 y P-93L. T-1191-P-93L contra C1R-A2 pulsadas con péptido P-93L (cuadrado cerrado), T-1191-P-93L contra C1R-A2 pulsadas con péptido P-92 (cuadrado abierto), T-1191-P-93L contra C1R-A2 pulsadas con péptido CAP1-6D (círculo cerrado), T-1191-P-92 contra C1R-A2 pulsadas con péptido P-93L (triángulo cerrado), T-1191-P-92 contra C1R-A2 pulsadas con péptido P-92 (triángulo abierto), T-1191-P-92 contra C1R-A2 pulsadas con péptido CAP1-6D (círculo abierto). Razón E:T = 25:1 y 12,5:1 en un análisis de liberación de In^{111} de 16 h. Barras = DT.

La Figura 5 muestra una representación esquemática de ciertos constructos virales.

45 La Figura 6 es una representación gráfica de un análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie sobre DC (por sus siglas en inglés) humanas sin infectar, infectadas con el vector de control (V-WT), o infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM. Las DC (1×10^6) se incubaron en 1 ml de medio Opti-MEM a 37°C con rV-CEA/MUC/TRICOM o vector de control (V-WT) durante 1 hora, a una MOI de 5:1. Las DC infectadas se suspendieron en 10 ml de medio completo templado, de nueva aportación que contenía 100 ng/ml de rhGM-CSF y 20 ng/ml de rhIL-4, y después se cultivaron durante 24 horas. Los números en cada histograma indican el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis).

50 La Figura 7 es una representación gráfica de un análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie sobre las DC humanas sin infectar, infectadas con el vector de control (FP-WT), o infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM. Las DC (1×10^6) se incubaron en 1 ml de medio Opti-MEM a 37°C con rF-CEA/MUC/TRICOM o vector de control (FP-WT) durante 2 horas, a una MOI de 40:1. Las DC infectadas se suspendieron en 10 ml de medio completo templado de nueva aportación que contenía 100 ng/ml de rhGM-CSF y 20 ng/ml de rhIL-4, y luego se cultivaron durante 24 h. Los números en cada histograma indican el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis).

La figura 8 muestra un análisis de inmunotransferencia de CD humanas no infectadas o infectadas con rF-CEA/TRICOM, rF-MUC-1/TRICOM, rF-CEA/MUC/TRICOM y rV-CEA/MUC/TRICOM. Los anticuerpos monoclonales COL-1 y DF-3 fueron utilizados para la detección de CEA y MUC-1, respectivamente.

60 La Figura 9 es la secuencia de nucleótidos del vector wMUC-1(6) (SEQ ID NO: 41).

La Figura 10 es la secuencia de aminoácidos de wMUC-1(6) (SEQ ID NO: 42).

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención describen en la presente memoria, *entre otros*, la identificación de nuevos epítomos HLA-A2 de clase I de MUC-1 que residen fuera de la región de repeticiones en tándem de número variable (VNTR) que son importantes para las terapias inmunológicas en el tratamiento del cáncer. Los autores de la presente invención han demostrado la capacidad de estos epítomos para activar las células T humanas medida por la producción de IFN- γ . En particular, un epítomo, ATWGQDVTSV (SEQ ID NO: 1), en la posición de aminoácidos 92-101 y denominada P-92), demostró el nivel más alto de unión de HLA-A2 y que inducía el mayor nivel de IFN- γ en células T humanas. La invención proporciona también la generación de epítomos agonistas potenciadores, identificados por el epítomo, ALWGQDVTSV, (SEQ ID NO: 19; denominado P-93L).

Prácticamente todos los tumores expresan múltiples antígenos asociados a tumores y la gran mayoría de ellos se expresan de forma heterogénea en masas tumorales. Se ha demostrado que esto es atribuible a la heterogeneidad antigénica inherente, los factores ambientales en el medio del tumor tales como la configuración espacial, o la deriva antigénica debida a la intervención terapéutica. Por lo tanto, las vacunas que expresan transgenes múltiples pueden también ayudar a aliviar este obstáculo de la heterogeneidad antigénica. El CEA (por sus siglas en inglés) se expresa en la inmensa mayoría de los tumores colorrectales, pancreáticos, y gástricos, y en aproximadamente 70% de los cánceres de pulmón de células no pequeñas, 50% de los cánceres de mama, así como otros tipos de tumores tales como el carcinoma de cabeza y cuello y los subconjuntos de carcinoma de ovario (Thompson JA, Grunert F, Zimmermann, W. Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. J Clin Lab Anal 1991;5:344-66; y Robbins PF, Eggensperger D, Qi CF, Schlom J. Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas. Int J Cancer 1993;53:892-7). La MUC-1, por otro lado, se expresa en exceso en la inmensa mayoría de los cánceres colorrectales, pancreáticos, de mama y de ovario, así como otros tipos de carcinoma (Kufe D, Inghirami G, Abe M. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. Hybridoma 1984;3:223-32; Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, et al. Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. Cancer Res 1987;47: 5476-82; Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J. Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. Cancer Rev 1988;11-12: 55-101; Kotera Y, Fontenot JD, Pcher G, Metzgar RS, Finn OJ. Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients. Cancer Res 1994;54:2856-60; and Goydos JS, Eler E, Whiteside TL, Finn OJ, Lotze MT. A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma. J Surg Res 1996;63:298-304). Por lo tanto, el direccionamiento, ya sea individual ya sea de múltiples dianas, de estos dos antígenos puede resultar ventajoso para aquellos tipos de cáncer que expresan ambos antígenos.

Las siguientes definiciones de ciertos términos que se utilizan en la presente, se exponen a continuación.

Según se utiliza en la presente memoria, "molécula" se utiliza genéricamente para abarcar cualquier vector, anticuerpo, proteína, fármaco y similares, que se utilizan en la terapia y se puede detectar en un sujeto por los métodos de la invención. Por ejemplo, múltiples tipos diferentes de vectores de suministro de ácido nucleico que codifican diferentes tipos de genes que pueden actuar conjuntamente para promover un efecto terapéutico, o para aumentar la eficacia o la selectividad de la transferencia de genes y/o la expresión génica en una célula. El vector de suministro de ácido nucleico se puede proporcionar en forma de ácidos nucleicos desnudos o en un vehículo de suministro asociado con una o más moléculas para facilitar la entrada de un ácido nucleico en una célula. Los vehículos de suministro adecuados incluyen, pero no se limitan a: formulaciones liposomales, polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos, formulaciones virales (p. ej., incluyendo virus, partículas virales, envolturas virales artificiales y similares), vehículos de suministro de células, y similares.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "administrar una molécula a una célula" (p. ej., un vector de expresión, ácido nucleico, citoquinas, un vehículo de suministro, un agente, y similares) se refiere a la transducción, transfección, microinyección, electroporación, o disparo, a las células con la molécula. En algunos aspectos, las moléculas se introducen en una célula diana poniendo en contacto la célula diana con una célula de suministro (p. ej., mediante fusión celular o mediante lisis de la célula de suministro cuando está en la proximidad de la célula diana).

El término "o" puede ser inclusivo o exclusivo.

A "modificación genética" se refiere a cualquier adición, delección o interrupción en los nucleótidos normales de una célula. Cualquier método que puede lograr la modificación genética de las APC está dentro del espíritu y alcance de esta invención. Los métodos reconocidos en la técnica incluyen la transferencia génica mediada por virus, la transferencia mediada por liposomas, la transformación, la transfección y la transducción.

Los términos "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" se utilizarán indistintamente en toda la memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario. Según se utiliza en la presente memoria, "molécula de ácido nucleico" se refiere a la forma polimérica de éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de ARN") o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; "moléculas de ADN"), o cualquiera de los análogos de fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, ya sea en forma de hebra sencilla o de hélice de doble hebra. Son posibles hélices de doble cadena ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. El término molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, se refiere sólo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria en particular. Por lo tanto, este término incluye ADN de doble hebra encontrado, *entre otras*, en moléculas de ADN lineal o circular (p. ej., fragmentos de restricción), plásmidos y cromosomas. Al comentar la estructura de moléculas de ADN de doble hebra particulares, las secuencias pueden describirse en la presente memoria de acuerdo con la convención normal de proporcionar sólo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una "molécula de ADN recombinante" es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular.

Hay que señalar que, según se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula anfitriona" incluye una pluralidad de tales células anfitrionas, la referencia al "anticuerpo" es una referencia a uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "fragmento o segmento", aplicado a una secuencia de ácido nucleico, gen o polipéptido, normalmente tendrá una longitud de al menos aproximadamente 5 bases de ácido nucleico (para la secuencia de ácido nucleico o gen) o aminoácidos (para los polipéptidos) contiguos, típicamente al menos aproximadamente 10 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, más típicamente al menos aproximadamente 20 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, habitualmente al menos aproximadamente 30 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos aproximadamente 40 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos, e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 60 a 80 o más bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguos. "Fragmentos solapantes", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos o péptidos contiguos que comienzan en el extremo amino terminal de un ácido nucleico o proteína y terminan en el extremo terminal carboxi del ácido nucleico o proteína. Cada fragmento de ácido nucleico o péptido tiene al menos aproximadamente una posición de ácido nucleico o aminoácido contigua en común con el siguiente fragmento de ácido nucleico o péptido, más preferiblemente al menos aproximadamente tres posiciones de bases de ácido nucleico o aminoácidos contiguas, lo más preferiblemente al menos aproximadamente diez posiciones de bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguas en común.

Un "fragmento" significativo en un contexto de ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos 20 nucleótidos, más generalmente al menos 23 nucleótidos, comúnmente al menos 26 nucleótidos, más comúnmente al menos 29 nucleótidos, a menudo al menos 32 nucleótidos, más a menudo al menos 35 nucleótidos, típicamente al menos 38 nucleótidos, más típicamente al menos 41 nucleótidos, normalmente al menos 44 nucleótidos, más normalmente al menos 47 nucleótidos, preferiblemente al menos 50 nucleótidos, más preferiblemente al menos 53 nucleótidos, y en realizaciones particularmente preferidas serán al menos 56 o más nucleótidos.

Un "vector" es una composición que puede transducir, transfectar, transformar o infectar una célula, haciendo de ese modo que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintos de los nativos de la célula, o de una manera que no es nativa para la célula. Una célula es "transducida" por un ácido nucleico cuando el ácido nucleico se transloca a la célula desde el entorno extracelular. Se puede utilizar cualquier método de transferencia de un ácido nucleico a la célula; el término, a menos que se indique lo contrario, no implica ningún método particular de suministro de un ácido nucleico a una célula. Una célula es "transformada" por un ácido nucleico cuando el ácido nucleico es transducido a la célula y replica de manera estable. Un vector incluye un ácido nucleico (generalmente ARN o ADN) que va a ser expresado por la célula. Un vector incluye opcionalmente materiales que contribuyan a conseguir la entrada del ácido nucleico en la célula, tal como una partícula viral, un liposoma, un recubrimiento de proteína o similar. Un "vector de transducción celular" es un vector que codifica un ácido nucleico susceptible de replicación estable y de expresión en una célula una vez que el ácido nucleico se transduce a la célula.

"Secuencia reguladora de la transcripción" es un término genérico utilizado en toda la memoria descriptiva para referirse a secuencias de ADN, tales como señales de inicio, potenciadores, promotores, elementos de silenciamiento, que inducen, inhiben o controlan la transcripción de secuencias codificantes de proteínas con las que están unidas operablemente.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "aguas abajo", cuando se utiliza en referencia a una dirección a lo largo de una secuencia de nucleótidos significa en la dirección del extremo 5' al extremo 3'. Del mismo modo, el término "aguas arriba" significa en la dirección desde el 3' al extremo 5'.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término "gen" representa el gen y todas las variantes conocidas en la actualidad del mismo y cualquier variante posterior que pudiera ser descubierta.

10 El término "variante", cuando se utiliza en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede abarcar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen de tipo salvaje. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes "alélicas", "de corte y empalme", "de especie", o "polimórficas". Una variante de corte y empalme puede tener una identidad significativa con una molécula de referencia, pero en general tendrá un número mayor o menor de polinucleótidos debido al corte y empalme alternativo de los exones durante el procesamiento del ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Tienen una utilidad particular en la invención de genes diana de tipo salvaje. Las variantes pueden ser el resultado de al menos una mutación en la secuencia de ácido nucleico y pueden dar como resultado ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o no puede estar alteradas. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede ocurrir solo o combinado con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

25 Según se utiliza en la presente memoria, "variante" de polipéptidos se refiere a una secuencia de aminoácidos que es alterada por uno o más residuos de aminoácidos. La variante puede tener cambios "conservativos", en donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (p. ej., sustitución de leucina por isoleucina). Más raramente, una variante puede tener cambios "no conservativos" (p. ej., la sustitución de glicina por triptófano). Las variaciones minoritarias análogas también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas cosas. La orientación en la determinación de qué residuos de aminoácidos puede ser sustituidos, insertados o eliminados sin abolir la actividad biológica se pueden encontrar utilizando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el soporte lógico LASERGENE (DNASTAR).

35 Los polipéptidos resultantes tendrán generalmente una identidad de aminoácidos significativa entre sí. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre los sujetos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden abarcar "polimorfismos de un solo nucleótido" (SNP,) o mutaciones de una sola base en las que la secuencia de polinucleótidos varía en una base.

40 Los términos "complementario" o "complementos" se utilizan indistintamente de principio a fin y significa que dos secuencias son complementarias cuando la secuencia de uno se puede unir a la secuencia del otro en un sentido anti-paralelo en donde el extremo 3' de cada secuencia se une al extremo 5' de la otra secuencia y cada A, T(U), G, y C de una secuencia se alinea con una T(U), A, C, y G, respectivamente, de la otra secuencia. Normalmente, la secuencia complementaria del oligonucleótido tiene al menos 80% o 90%, preferiblemente 95%, lo más preferiblemente 100%, de complementariedad con una secuencia definida. Preferiblemente, los alelos o variantes de las mismas pueden ser identificados. También se puede emplear un programa BLAST para evaluar dicha identidad de secuencia.

45 El término "secuencia complementaria" que se refiere a una secuencia de polinucleótidos, se refiere a la secuencia de bases en otra molécula de ácido nucleico por las reglas de emparejamiento de bases. Más particularmente, el término o un término similar se refiere a la hibridación o emparejamiento de bases entre los nucleótidos o ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, entre las dos hebras de una molécula de ADN de doble hebra o entre un cebador oligonucleotídico y un sitio de unión al cebador en un ácido nucleico de hebra sencilla que se vaya a secuenciar o amplificar. Los nucleótidos complementarios son, en general, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos moléculas de ARN o ADN de hebra sencilla son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una hebra, óptimamente alineados y comparados y con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, se emparejan con al menos aproximadamente 95% de los nucleótidos de la otra hebra, por lo general al menos aproximadamente 98%, y más preferiblemente de aproximadamente 99% a aproximadamente 100%. Las secuencias de polinucleótidos complementarias pueden ser identificadas por una variedad de enfoques incluyendo el uso de algoritmos informáticos y soporte lógico bien conocidos, por ejemplo el programa BLAST.

60 El término "identidad de secuencia sustancial", cuando se utiliza en relación con secuencias de péptidos/aminoácidos, se refiere a secuencias de péptidos/aminoácidos, que son sustancialmente idénticas o similares en secuencia, dando lugar a una identidad de secuencia en la conformación y por lo tanto a una actividad biológica similar. No se pretende que el término implique una evolución común de las secuencias.

Típicamente, las secuencias de péptidos/aminoácidos que tienen una "identidad de secuencia sustancial" son secuencias que tienen una identidad de secuencia de al menos 50%, más preferiblemente al menos 80%, al menos en algunas de las regiones que se sabe que están involucradas en la actividad deseada. Lo más preferiblemente, no más de cinco residuos, con excepción de los extremos, son diferentes. Preferiblemente, la divergencia en la secuencia, al menos en las regiones mencionadas anteriormente, es en forma de "modificaciones conservativas".

Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de péptidos/aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para una comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden no tenerse en cuenta a efectos de comparación). Por ejemplo, la longitud de una secuencia de referencia alineada para su comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80 %, o 90% de la longitud de la secuencia de referencia (p. ej., cuando se alinea una segunda secuencia a la primera secuencia de aminoácidos que tiene por ejemplo 100 residuos de aminoácido, al menos 30, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente al menos 50, incluso más preferiblemente al menos 60, e incluso más preferiblemente al menos 70, 80 o 90 residuos de aminoácido están alineados). Los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, en ese caso las moléculas son idénticas en esa posición (según se utiliza en la presente memoria la "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a la "identidad de secuencia" de aminoácidos o de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que han de ser introducidos para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria. El término "péptido" se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a una cadena de dos o más aminoácidos o análogos de aminoácidos (incluyendo los aminoácidos no naturales), con los aminoácidos adyacentes unidos enlaces peptídicos (-NHCO-). Por lo tanto, los péptidos de la invención incluyen oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, mimotopos y peptidomiméticos. Los métodos para preparar mimotopos y peptidomiméticos se conocen en la técnica.

Los términos "mimotopo" y "peptidomimético" se usan indistintamente en la presente memoria. Un "mimotopo" de un compuesto X se refiere a un compuesto en el que las estructuras químicas de X necesarias para la actividad funcional de X se han sustituido por otras estructuras químicas que imitan la conformación de X. Los ejemplos de peptidomiméticos incluyen compuestos peptídicos en los que la cadena principal del péptido está sustituida con una o más moléculas de benzodiazepina (véase p. ej., James, G. L. et al. (1993) Science 260:1937-1942) y péptidos "retro-inversos" (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.752 de Sisto). Los términos "mimotopo" y "peptidomimético" también se refieren a un radical, distinto de un aminoácido de origen natural, que sirve conformacionalmente y funcionalmente como un sustituto de un aminoácido particular en un compuesto que contiene el péptido sin interferir negativamente en un grado significativo en la función del péptido. Los ejemplos de los miméticos de aminoácidos incluyen los D-aminoácidos. Los péptidos sustituidos con uno o más D-aminoácidos se pueden preparar utilizando procedimientos de síntesis de péptidos bien conocidas. Las sustituciones adicionales incluyen análogos de aminoácidos que tienen cadenas laterales variantes con grupos funcionales, por ejemplo, b-cianoalanina, canavanina, ácido djenkólico, norleucina, 3-fosfoserina, homoserina, dihidroxifenilalanina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilhistidina, o 3-metilhistidina.

Según se utiliza en la presente memoria un "análogo" de un compuesto X se refiere a un compuesto que conserva las estructuras químicas de X necesarias para la actividad funcional de X, incluso que también contiene ciertas estructuras químicas que difieren de X. Un ejemplo de un análogo de un péptido de origen natural es un péptido que incluye uno o más aminoácidos de origen no natural. También se pretende que el término "análogo" incluya mimotopos y/o peptidomiméticos modificados, péptidos y polipéptidos modificados, y variantes alélicas de péptidos y polipéptidos. Los análogos de un péptido por lo tanto producirán un análogo de péptido que sea sustancialmente homólogo o, en otras palabras, tiene una identidad de secuencia sustancial con el péptido original. El término "aminoácido" incluye su significado reconocido en la técnica. Los aminoácidos preferidos incluyen los aminoácidos de origen natural, así como derivados sintéticos, y los aminoácidos derivados de proteínas, p. ej., proteínas tales como caseína, es decir, casaminoácidos, o productos de digestión enzimática o química, p. ej., de levadura, un producto animal, p. ej., un producto digerido de carne, o un producto de planta, p. ej., proteína de soja, proteína de semilla de algodón, o aguas de infusión de maíz (véase, p. ej., Traders' Guide to Fermentation Media, Traders Protein, Memphis, TN (1988), Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1989), and Product Data Sheet for Corn Steep Liquor, Grain Processing Corp., IO).

Los polipéptidos recombinantes de la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células anfitrionas modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células anfitrionas que están modificadas por ingeniería genética con tales sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. Los sistemas de traducción libres de células también se pueden emplear para producir tales proteínas utilizando derivados de ARN de los constructos de ADN de la presente invención.

Para la producción recombinante, las células anfitrionas pueden ser modificadas genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos para los polinucleótidos de la presente invención. La introducción de polinucleótidos en células anfitrionas se puede efectuar mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Tales métodos preferidos incluyen, por ejemplo, la transfección con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transvección, la microinyección, la transfección mediada por lípidos catiónicos, la electroporación, la transducción, la carga por legrado, la introducción balística o la infección.

Un componente "heterólogo" se refiere a un componente que se introduce en o se produce dentro de una entidad diferente de aquella en la que se encuentra de forma natural. Por ejemplo, un polinucleótido derivado de un organismo e introducido por técnicas de ingeniería genética en un organismo diferente es un polinucleótido heterólogo que si se expresa puede codificar un polipéptido heterólogo. Del mismo modo, un promotor o potenciador que se retira de su secuencia codificante nativa y se une operablemente a una secuencia de codificación diferente es un promotor o potenciador heterólogo. Una posible terminología alternativa incluye "foráneo" o "exógeno". Una secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar una secuencia de aminoácidos, es decir, un péptido o un polipéptido.

Un "promotor", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que controla la transcripción de un gen o secuencia codificante a la que está ligado operablemente. Se conoce en la técnica un gran número de promotores, incluyendo promotores constitutivos, inducibles y reprimibles, de una variedad de fuentes diferentes, y se encuentra disponible como o dentro de secuencias de polinucleótidos clonados (de, p. ej., depósitos tales como la ATCC, así como otras fuentes comerciales o de sujetos).

Un "potenciador", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que potencia la transcripción de un gen o una secuencia codificante a los que está conectado operablemente. Es bien conocido en la técnica un gran número de potenciadores, de una variedad de fuentes diferentes y está disponible como o dentro de secuencias de polinucleótidos clonados (de, p. ej., depósitos tales como la ATCC, así como de otras fuentes comerciales o de sujetos). Una serie de polinucleótidos que comprenden secuencias promotoras (tales como el promotor de CMV utilizado comúnmente) también comprenden secuencias potenciadoras.

"Conectado operablemente" se refiere a una yuxtaposición, en donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Un promotor está unido operablemente a una secuencia codificante si el promotor controla la transcripción de la secuencia codificante. Aunque un promotor conectado operablemente generalmente se encuentra aguas arriba de la secuencia codificante, no es necesariamente contiguo a la misma. Un potenciador está conectado operablemente a una secuencia codificante si el potenciador incrementa la transcripción de la secuencia codificante. Los potenciadores conectados operablemente pueden estar situados aguas arriba, dentro o aguas abajo de las secuencias codificantes. Una secuencia de poliadenilación está conectada operablemente a una secuencia codificante si está situada en el extremo aguas abajo de la secuencia codificante de tal manera que la transcripción prosigue a través de la secuencia codificante hacia la secuencia de poliadenilación.

"Suministro de genes", "transferencia de genes", y similares según se utiliza en la presente memoria, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces referidos como "transgenes") en una célula anfitriona, independientemente del método utilizado para la introducción. Tales métodos incluyen una variedad de técnicas bien conocidas tales como la transferencia de genes mediada por vectores (mediante, p. ej., infección/transfección viral, u otros varios complejos de suministro de genes basados en proteínas o basados en lípidos), así como técnicas que facilitan el suministro de polinucleótidos "desnudos" (tales como la electroporación, el suministro con "pistola de genes" y otras diversas técnicas utilizadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido se puede mantener de manera estable o transitoria en la célula anfitriona. El mantenimiento estable requiere típicamente que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula anfitriona o se integre en un replicón de la célula anfitriona, tal como un replicón extracromosómico (p. ej., un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se conocen numerosos vectores que son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero, como se conoce en la técnica y se describe en la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, una "célula diana" o "célula receptora" se refiere a una célula objeto o célula que se desea que sea, o haya sido, un receptor de moléculas exógenas de ácido nucleico, polinucleótidos y/o proteínas. También se pretende que el término incluya la progenie de una única célula.

5 Suministro de genes, transferencia génica, terapia génica "in vivo" y similares, según se utilizan en la presente memoria, son términos que se refieren a la introducción de un vector que comprende un polinucleótido exógeno directamente en el cuerpo de un organismo, tal como un ser humano o un mamífero no humano, por medio de los cuales el polinucleótido exógeno se introduce en una célula de semejante organismo in vivo.

10 Una célula es "transducida" por un ácido nucleico cuando el ácido nucleico se transloca a la célula desde el entrono extracelular. Se puede utilizar cualquier método de transferencia de un ácido nucleico a la célula; el término, a menos que se indique lo contrario, no implica ningún método particular de suministro de un ácido nucleico a una célula. Una célula es "transformada" por un ácido nucleico cuando el ácido nucleico es transducido a la célula y replica de manera estable. Un vector incluye un ácido nucleico (generalmente ARN o ADN) que va a ser expresado por la célula. Un vector incluye opcionalmente materiales que contribuyan a conseguir la entrada del ácido nucleico en la célula, tal como una partícula viral, liposoma, recubrimiento de proteína o similar. Un "vector de transducción celular" es un vector que codifica un ácido nucleico susceptible de replicación estable y de expresión en una célula una vez que el ácido nucleico se transduce a la célula.

20 Según se utiliza en la presente memoria, "recombinación homóloga" se refiere a que una secuencia de nucleótidos en un vector es homóloga a una secuencia de nucleótidos en otro vector. El uso de enzimas de restricción para cortar las dos secuencias y la ligación de las dos secuencias da como resultado dos vectores que se combinan. Típicamente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (en los extremos tanto 5' como 3') (véase, p. ej., Thomas y Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga).

25 Las secuencias de ácido nucleico homólogas, cuando se comparan, muestran una identidad o similitud de secuencia significativas. Las normas para la identidad de secuencia en los ácidos nucleicos son medidas para la identidad de secuencia generalmente utilizadas en la técnica mediante comparación de secuencias o basándose en las condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se describen con mayor detalle a continuación.

30 La homología de secuencia y la identidad de secuencia se utilizan de manera indistinta en la presente memoria.

"Rigurosidad" representa la combinación de condiciones a las que los ácidos nucleicos están sujetas que hacen que el dúplex se disocie, tales como la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de aditivos tales como formamida. Las condiciones que son más propensas a causar la disociación del dúplex se denominan "alta rigurosidad", p. ej., mayor temperatura, menor fuerza iónica y mayor concentración de formamida.

40 Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se deseará emplear típicamente condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, p. ej., se seleccionarán condiciones de salinidad relativamente baja y/o alta temperatura, tales como las proporcionados por NaCl de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50° C a aproximadamente 70°C.

45 Para ciertas aplicaciones, se aprecia que se requieren condiciones de rigurosidad inferiores. En estas condiciones, la hibridación se puede producir a pesar de que las secuencias de sonda y la hebra diana no son perfectamente complementarias, sino que no coinciden en una o más posiciones. Las condiciones se pueden volver menos rigurosas aumentando la concentración de sal y disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, unas condiciones de rigurosidad media podrían ser proporcionadas por NaCl de aproximadamente 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37°C a aproximadamente 55°C, mientras que unas condiciones de baja rigurosidad podrían ser proporcionadas con sal de aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varíen de aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. Por lo tanto, las condiciones de hibridación pueden manipularse fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

55 La expresión "condiciones de hibridación" y sus equivalentes gramaticales, cuando se utiliza con un período de tiempo de mantenimiento, supone someter la mezcla de reacción de hibridación, en el contexto de la concentración de los reactivos y de los reactivos complementarios de la mezcla, a unas condiciones de tiempo, temperatura, pH suficientes para permitir que la sonda polinucleotídica hibride con la secuencia diana, por lo general para formar el dúplex de ácido nucleico. Tales condiciones de tiempo, temperatura y pH requeridas para llevar a cabo la hibridación dependen, como es bien conocido en la técnica, de la longitud de la sonda polinucleotídica que se vaya a hibridar, del grado de complementariedad entre la sonda polinucleotídica y la diana, del contenido de guanidina y citosina del polinucleótido, de la rigurosidad de la hibridación deseada, y de la presencia de sales o reactivos adicionales en la mezcla de reacción de hibridación que pueden afectar a la cinética de la hibridación. Los métodos para la optimización de las condiciones de hibridación para una mezcla de reacción de hibridación dada son bien conocidos

en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, "identidad de secuencia sustancial" en el contexto de la comparación de secuencias de ácidos nucleicos significa que los segmentos, o sus hebras complementarias, cuando se comparan, son idénticos cuando se alinean óptimamente, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente 50% de los nucleótidos, generalmente al menos 56%, más generalmente al menos 59%, normalmente al menos 62%, más normalmente al menos 65%, a menudo al menos 68%, más a menudo al menos 71%, típicamente al menos 74%, más típicamente al menos 77%, habitualmente al menos 80%, más habitualmente al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95 a 98% o más, y en realizaciones particulares, tan alto como aproximadamente 99% o más de los nucleótidos. Alternativamente, existe una identidad de secuencia sustancial cuando los segmentos hibridarán en condiciones de hibridación selectivas, a una hebra, o su complemento, típicamente utilizando un fragmento derivado del SEQ ID NO: 1. Típicamente, la hibridación selectiva se producirá cuando exista una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 55% a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 65%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90%. Véase Kanehisa (1984) Nuc. Acids Res. 12:203-213. La longitud de la comparación de identidad de secuencia, como se ha descrito, puede ser a lo largo de tramos más largos, y en ciertas realizaciones será a lo largo de un tramo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 40 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 50 nucleótidos, y más preferiblemente al menos aproximadamente 75 a 100 o más nucleótidos. Los puntos finales de los segmentos pueden estar en muchas combinaciones de pares diferentes. En la determinación de la identidad de secuencia o el porcentaje de homología se emplean adecuadamente los protocolos y programas discutidos más abajo para la similitud de secuencia, incluyendo el algoritmo BLAST.

El término "polimorfismo" se refiere a la coexistencia de más de una forma de un gen o una porción (p. ej., variante alélica) del mismo. Una porción de un gen del cual hay al menos dos formas diferentes, es decir, dos secuencias de nucleótidos diferentes, se denomina una "región polimórfica de un gen". Una secuencia genética específica en una región polimórfica de un gen es un alelo. Una región polimórfica puede ser un solo nucleótido, cuya identidad difiere en los diferentes alelos. Una región polimórfica también puede tener varios nucleótidos de longitud.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención se pueden utilizar además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para identificar, por ejemplo, otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico NIP2b, NIP2cL, y NIP2cS de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de la proteína NIP2b, NIP2cL, y NIP2cS de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Las búsquedas de similitud de secuencias se pueden realizar también manualmente o mediante el uso de varios programas informáticos disponibles conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, se pueden utilizar los algoritmos BLAST y Smith-Waterman, que están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica, y similares. Blast es una herramienta de búsqueda de similitud de secuencias de NCBI diseñada para apoyar el análisis de bases de datos de secuencias de nucleótidos y proteínas. El Paquete GCG ofrece una versión local de Blast que se puede utilizar ya sea con bases de datos de dominio público o con cualquier base de datos disponible a nivel local. El Paquete GCG v9.0 es un paquete de soporte lógico disponible comercialmente que contiene más de 100 programas de soporte lógico relacionados entre sí que permite el análisis de secuencias mediante la edición, cartografiado, comparación y alineamiento de las mismas. Otros programas incluidos en el Paquete GCG incluyen, por ejemplo, los programas que facilitan las predicciones de la estructura secundaria, del ARN, el ensamblaje de fragmentos de ácido nucleico, y el análisis de la evolución. Además, las bases de datos genéticas más prominentes (GenBank, EMBL, PIR y SWISS-PROT) se distribuyen junto con el Paquete GCG y son completamente accesibles con los programas de búsqueda y manipulación de la base de datos. Se puede acceder a GCG a través de Internet, por ejemplo, en <http://www.gcg.com/>. Fetch es una herramienta disponible en GCG que pueden anotar los registros de GenBank basados en los números de acceso y es similar a Entrez. Otra búsqueda de similitud de secuencias pueden realizarse con Geneworld y GeneThesaurus de Pangea. Geneworld 2.5 es una aplicación de alto rendimiento, flexible, automatizada para el análisis de secuencias de polinucleótidos y proteínas. Geneworld permite el análisis

automático y las anotaciones de las secuencias. Al igual que GCG, Geneworld incorpora varias herramientas para la búsqueda de identidad de secuencia, el descubrimiento de genes, el alineamiento de secuencias múltiples, la predicción de estructura secundaria, y la identificación de motivos. GeneThesaurus 1.0™ es un servicio de suscripción de datos de secuencias y anotación que proporciona información de múltiples fuentes, proporcionando un modelo de datos relacional para los datos públicos y locales.

Otra búsqueda de similitud de secuencia alternativa se puede realizar, por ejemplo, por medio de BlastParse. BlastParse es un clasificador en Perl que se ejecuta en una plataforma UNIX que automatiza la estrategia descrita anteriormente. BlastParse toma una lista de números de acceso diana de interés y analiza todos los campos de GenBank en texto "delimitado por tabuladores" que luego pueden ser guardados en un formato de "base de datos relacional" para la búsqueda y el análisis más fácil, lo que proporciona flexibilidad. El resultado final es una serie de registros de GenBank completamente analizados que pueden ser fácilmente ordenados, filtrados y consultados frente, así como una base de datos de anotaciones-relacional.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "hibrida específicamente" o "detecta específicamente" se refiere a la capacidad de una molécula de ácido nucleico para hibridar con al menos aproximadamente 6 nucleótidos consecutivos de un ácido nucleico de la muestra.

"Sustancialmente purificado" se refiere a moléculas de ácidos nucleicos o proteínas que se retiran de su entorno natural y se aíslan o separan, y están al menos aproximadamente 60% libres, preferiblemente aproximadamente 75% libres, y más preferiblemente aproximadamente 90% libres, de otros componentes con los que se asocian de forma natural.

Un "antígeno" es cualquier sustancia que reacciona específicamente con los anticuerpos o linfocitos T (células T). Un "sitio de unión al antígeno" es la parte de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Además, un sitio de unión al antígeno incluye cualquier sitio en cualquier molécula de unión al antígeno, incluyendo, pero no limitada a, una molécula de MHC o un receptor de células T. "Procesamiento antigénico" se refiere a la degradación de un antígeno en fragmentos (p. ej., la degradación de una proteína en péptidos) y a la asociación de uno o más de estos fragmentos (p. ej., a través de la unión) con moléculas del MHC para la presentación por medio de "células presentadoras de antígenos" a las células T específicas.

Las "células dendríticas" (DC) son células presentadoras de antígeno potentes, capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa robusta *in vivo*. Se ha demostrado que las DC maduras, activas proporcionan las señales necesarias para la activación y la proliferación de las células T. Estas señales se pueden clasificar en dos tipos. El primer tipo, que proporciona especificidad a la respuesta inmunitaria, está mediado a través de la interacción entre el complejo receptor de células T/CD3 ("TCR/CD3") y un péptido antigénico presentado por una proteína del complejo principal de histocompatibilidad ("MHC" definido anteriormente) de clase I o II sobre la superficie de las APC. El segundo tipo de señal, denominada una señal co-estimuladora, no es ni específica del antígeno ni restringida por el MHC, y puede conducir a una respuesta de proliferación total de las células T y a la inducción de las funciones efectoras de células T en presencia del primer tipo de señales. Esta señalización doble puede, por lo tanto, dar como resultado una respuesta inmunitaria vigorosa. Como se ha señalado más arriba, en la mayoría de los vertebrados no aviares, las DC se originan a partir de precursores derivados de médula ósea. Las DC inmaduras se encuentran en la sangre periférica y en la sangre del cordón y en el timo. Las poblaciones inmaduras adicionales pueden estar presentes en otros lugares. Las DC de diversas fases de madurez también se encuentran en el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas, y el intestino humano. Las DC aviares también se pueden encontrar en la bolsa de Fabricio, un órgano inmunitario primario único de las aves. En una realización preferida, las células dendríticas de la presente invención son de mamífero, preferiblemente de ser humano, ratón o rata.

Una "molécula co-estimuladora" abarca cualquier molécula o combinación de moléculas que, cuando actúan junto con un complejo de péptido/MHC unido por un receptor de células T sobre la superficie de una célula T, proporcionan un efecto co-estimulador que logra la activación de la célula T que se une al péptido.

Según se utiliza en la presente memoria, "inmunorreceptores" hará referencia al MHC de clase I (HLA-A, -B, -C, -G) y similares) y otros receptores inmunitarios relacionados, tales como por ejemplo Gp49, PIR, PIRA, PIRB, LIR, NKR-P1, NKp46, Digr1, ILT, MIR, KIR y similares. El MHC también puede incluir otras clases tales como MHC de clase II y MHC de clase III, derivados y mutantes de los mismos. El complejo MHC humano también se denomina complejo de antígeno leucocitario humano (HLA). Los antígenos del MHC se dividen en antígenos del MHC de clase I (en los seres humanos, esta clase incluye los antígenos HLA-A, -B, y -C) y antígenos del MHC de clase II (en los seres humanos, esta clase incluye los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR). Por lo tanto, los términos "antígenos MHC-II", "antígenos MHC de clase II", y "antígenos de trasplante de clase II del MHC" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a la clase de proteínas, que en los seres humanos, incluye los antígenos HLA-DP, -DQ y -DR. Mientras los términos "genes de MHC de clase II" y "genes MHC-II" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a los genes que codifican los antígenos de trasplante de la clase II del MHC. El

término "MHC-II" se utiliza en la presente memoria para referirse al locus del gen que codifica los antígenos de trasplante de la clase II del MHC, así como al grupo de las proteínas codificadas por ese locus. Los antígenos de trasplante también incluyen moléculas de la superficie celular distintas de los antígenos del MHC de clase I y II. Estos antígenos incluyen los siguientes: (1) los antígenos ABO implicados en el reconocimiento de células sanguíneas; (2) las moléculas de adherencia celular tales como ICAM, que están implicadas en el reconocimiento célula-célula de leucocitos; y (3) la microglobulina β_2 , un polipéptido asociado con el polipéptido de cadena pesada de 44 kd que comprende los antígenos HLA-I, pero no está codificada por el complejo MHC. Los haplotipos/alotipos de HLA varían de un sujeto a otro y con frecuencia son útiles para determinar el tipo de HLA del sujeto. El tipo de HLA se puede determinar mediante procedimientos de tipificación convencionales y los linfocitos de sangre periférica (PBL) se pueden purificar por medio de gradientes de Ficoll.

"Diagnóstico" o "diagnosticado" representa la identificación de la presencia o naturaleza de una afección patológica. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un análisis de diagnóstico es el porcentaje de sujetos enfermos que dan positivo (porcentaje de los "verdaderos positivos"). Los sujetos enfermos no detectados por el análisis son "falsos negativos". Los sujetos que no están enfermos y que obtienen un resultado negativo en el análisis, se denominan "verdaderos negativos". La "especificidad" de un análisis de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la "tasa de falsos positivos" se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dan positivo. Mientras que un método de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente que el procedimiento proporcione una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

Los términos "sujeto" o "sujeto" se utilizan indistintamente en la presente memoria, y se pretende que represente un sujeto mamífero que se va a tratar, siendo preferidos los sujetos humanos. En algunos casos, los métodos de la invención encuentran uso en animales de experimentación, en aplicaciones veterinarias y en el desarrollo de modelos animales para la enfermedad, incluyendo, pero no limitados a, roedores, incluyendo ratones, ratas y hámsters; y primates.

Las "moléculas de marcaje" son radicales químicos o bioquímicos utilizados para el marcaje de un polinucleótido, un polipéptido, o un anticuerpo. Estos incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes cromogénicos, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas, y similares. Las moléculas informadoras se unen específicamente, establecen la presencia de, y permiten la cuantificación de, un determinado polinucleótido, polipéptido, o anticuerpo.

"Muestra" se utiliza aquí en su sentido más amplio. Una muestra que comprende los polinucleótidos, polipéptidos, péptidos, anticuerpos y similares puede comprender un fluido corporal; una fracción soluble de una preparación de células, o medios en los que se cultivaron las células; un cromosoma, un orgánulo, o membrana aislados o extraídos de una célula; ADN genómico, ARN o ADNc, polipéptidos, o péptidos en solución o unidos a un sustrato; una célula; un tejido; una impresión de tejido; una huella digital, piel o cabello; y similares.

Según se utiliza en la presente memoria, "tumores frescos" se refiere a tumores retirados de un anfitrión por medios quirúrgicos u otros métodos.

Según se utiliza en la presente memoria, "trastorno de crecimiento proliferativo" enfermedad neoplásica", "tumor", "cáncer" utilizados indistintamente en la presente memoria se refieren a una afección caracterizada por el crecimiento incontrolado, anormal de las células. Preferiblemente, el cáncer que se va a tratar es cáncer positivo para MUC-1 y la proliferación anormal de las células puede ser en cualquier célula del órgano. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, blastoma y sarcoma. Según se utiliza en la presente memoria, el término "carcinoma" se refiere a un nuevo crecimiento que surge del epitelio, se encuentra en la piel o, más comúnmente, en el revestimiento de órganos del cuerpo.

"Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología o los síntomas de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. "Tratamiento" también puede especificarse como cuidados paliativos. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. En el tratamiento del tumor (p. ej., cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de las células tumorales, o hacer que las células tumorales sean más susceptibles al tratamiento por otros agentes terapéuticos, p. ej., radiación y/o quimioterapia.

El término "que necesita dicho tratamiento" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a un juicio, realizado por un cuidador tal como un médico, enfermera o profesional de enfermería en el caso de los seres humanos, de que un sujeto requiere o se beneficiaría del tratamiento. Este juicio se realiza basándose a una variedad de factores que están en el ámbito de la experiencia de un cuidador, pero que incluyen el conocimiento de que el sujeto está

enfermo, o estará enfermo, como resultado de una afección que se puede tratar mediante las composiciones de la invención.

Se entiende que "células del sistema inmunitario" o "células inmunitarias" según se utilizan en la presente memoria, incluyen cualquier célula del sistema inmunitario que se puede analizar, incluyendo, pero no limitada a, linfocitos B, también llamados células B, linfocitos T, también llamados células T, células asesinas naturales (NK), células asesinas naturales (NK), células asesinas activadas por linfocinas (LAK), monocitos, macrófagos, neutrófilos, granulocitos, mastocitos, plaquetas, células de Langerhans, células madre, células dendríticas, células mononucleares de sangre periférica, células infiltrantes de tumores (TIL), células inmunitarias modificadas en los genes incluyendo hibridomas, células inmunitarias modificadas por fármacos, y derivados, precursores o progenitores de los tipos de células anteriores.

"Células efectoras inmunitarias" se refiere a células capaces de unirse a un antígeno y que median en una respuesta inmunitaria. Estas células incluyen, pero no se limitan a, células T (linfocitos T), células B (linfocitos B), monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (CTL), por ejemplo líneas de CTL, clones de CTL, y CTL de tumor, inflamatorios, u otros infiltrados.

Las "células T" o "linfocitos T" son un subconjunto de linfocitos que se originan en el timo y que tienen receptores heterodiméricos asociados con proteínas del complejo CD3 (p. ej., un receptor de células T reordenado, la proteína heterodimérica sobre las superficies de células T responsables de la especificidad antígeno/MHC de las células). Las respuestas de las células T pueden ser detectadas por medio de análisis por sus efectos sobre otras células (p. ej., eliminación de células diana, activación de macrófagos, activación de células B) o por las citoquinas que producen.

El término "célula T activada" según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula T que expresa antígenos indicativos de la activación de células T (es decir, marcadores de activación de células T). Los ejemplos de los marcadores de activación de células T incluyen, pero no se limitan a, CD25, CD26, CD30, CD38, CD69, CD70, CD71, ICOS, OX-40 y el 4-1BB. La expresión de los marcadores de activación se puede medir mediante mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, análisis de transferencia Western, análisis de transferencia Northern, RT-PCR, análisis de inmunofluorescencia, y análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

El término "células T en reposo", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una célula T que no expresa marcadores de activación de células T. Las células T en reposo incluyen, pero no se limitan a, células T que son CD25⁻, CD69⁻, ICOS⁻, SLAMF⁻ y 4-1BB⁻. La expresión de estos marcadores se puede medir mediante mecanismos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, análisis de transferencia Western, análisis de transferencia Northern, RT-PCR, análisis de inmunofluorescencia, y análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

"CD4" es una proteína de la superficie celular importante para el reconocimiento por el receptor de células T de péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC de clase II sobre la superficie de una APC. Tras la activación, las células T CD4 no sometidas a tratamiento previo se diferencian en uno de al menos dos tipos de células, las células Th1 y las células Th2, caracterizándose cada tipo por las citoquinas que produce. Las "células Th1" están principalmente involucradas en la activación de macrófagos con respecto a la inmunidad celular y la respuesta inflamatoria, mientras que las "células Th2" o "células T auxiliares" están principalmente involucradas en la estimulación de las células B para producir anticuerpos (inmunidad humoral). CD4 es el receptor para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Las moléculas efectoras para las células Th1 incluyen, pero no se limitan a, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , ligando CD40, ligando Fas, IL-3, TNF- β , e IL-2. Las moléculas efectoras para las células Th2 incluyen, pero no se limitan a, IL-4, IL-5, ligando CD40, IL-3, GS-CSF, IL-10, TGF- β , y eotaxina. La activación de la respuesta de citoquinas de tipo Th1 puede suprimir la respuesta de citoquinas de tipo Th2.

"CD8" es una proteína de la superficie celular importante para el reconocimiento por el receptor de células T de péptidos antigénicos unidos a moléculas del MHC de clase I. Las células T CD8 normalmente se convierten en "células T citotóxicas" o "células T asesinas" y activan los macrófagos. Las moléculas efectoras incluyen, pero no se limitan a, perforina, granzimas, ligando Fas, IFN- γ , TNF- α , y TNF- β .

Los términos "unión específica" o "que se une específicamente", según se utilizan en la presente memoria, en referencia a la interacción de un anticuerpo y una proteína o péptido, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en la proteína; en otras palabras, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a las proteínas en general. Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una proteína que comprende el epítipo A (o libre, A no marcado) en una reacción que comprende "A" marcado y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo. "Unión específica" en general, se refiere a cualquier molécula

relacionada con la inmunidad que se une a su ligando, tal como por ejemplo la unión de un receptor de células T expresado por un linfocito T, a una molécula del MHC y un péptido sobre una célula presentadora de antígenos.

"Actividad", "activación" o "aumento" es la capacidad de las células del sistema inmunitario para responder y mostrar, a un nivel medible, una función inmunitaria. La medición del grado de activación se refiere a una evaluación cuantitativa de la capacidad de las células inmunitarias para expresar una actividad mejorada cuando se estimula aún más como resultado de una activación previa. La mejora de la capacidad puede ser resultado de los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de activación que permiten que las células inmunitarias sean estimuladas para la actividad en respuesta a dosis bajas de estimulantes.

La actividad de las células inmunitarias que se puede medir incluye, pero no se limita a (1), la proliferación celular mediante la medición de la replicación celular o del ADN; (2) la producción de citoquinas mejorada, incluyendo las mediciones específicas de citoquinas, tales como IFN- γ , GM-CSF, o TNF- α ; (3) la eliminación o lisis de la diana mediada por células; (4) la diferenciación celular; (5) la producción de inmunoglobulina; (6) los cambios fenotípicos; (7) la producción de factores quimiotácticos o quimiotaxis, es decir, la capacidad para responder a una quimiotactina con la quimiotaxis; (8) la inmunosupresión, por la inhibición de la actividad de algún otro tipo de células inmunitarias; y, (9) la apoptosis, que se refiere a la fragmentación de las células inmunitarias activadas en determinadas circunstancias, como una indicación de la activación anormal.

Un "coadyuvante" es cualquier sustancia capaz de potenciar la respuesta inmunitaria a un antígeno con el que se mezcla. Dependiendo de la especie anfitriona, se pueden utilizar varios coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales coadyuvantes incluyen, pero no se limitan a, coadyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, KLH y dinitrofenol, así como BCG (bacilos de Calmette Guerin) y *Corynebacterium parvum*, que se utilizan a menudo en los seres humanos, y los ligandos de CCR6 y otros receptores de quimioquinas.

Una "quimioquina" es una pequeña citoquina implicada en la migración y activación de células, incluyendo fagocitos y linfocitos, y que desempeña un papel en las respuestas inflamatorias. Se han definido tres clases de quimioquinas por la disposición de los residuos de cisteína (C) conservados de las proteínas maduras: las quimioquinas CXC o α que tienen un residuo de aminoácido que separa los dos primeros residuos de cisteína conservados; las quimioquinas CC o β en las que los dos primeros residuos de cisteína conservados están adyacentes; las quimioquinas C o γ que carecen de dos (primero y tercero) de los cuatro residuos de cisteína conservados. Dentro de la subfamilia CXC, las quimioquinas se pueden dividir en dos grupos. Un grupo de quimioquinas CXC tiene el motivo característico con la secuencia de tres aminoácidos ELR (ácido glutámico-leucina-arginina) inmediatamente anterior al primera residuo de cisteína cerca del extremo amino. Un segundo grupo de quimioquinas CXC carece de dicho dominio ELR. Las quimioquinas CXC con el dominio ELR (incluyendo IL-8, GRO α / β / γ , KC de ratón, MIP-2 de ratón, ENA-78, GCP-2, PBP/CTAPIII/ β -TG/NAP-2) actúan principalmente sobre neutrófilos como quimioatrayentes y activadores, induciendo la desgranulación de neutrófilos con liberación de mieloperoxidasa y otras enzimas. Las quimioquinas CXC sin el dominio ELR (p. ej., IP-10/ratón CRG, Mig, PBSF/SDF-1, PF4), las quimioquinas CC (p. ej., MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1/2/3/4/JE de ratón/MARC de ratón, eotaxina, I-309/TCA3, HCC-1, C10), y las quimioquinas C (p. ej., linfotactina), son quimioatrayentes y activadoras de monocitos, células dendríticas, linfocitos T, células asesinas naturales, linfocitos B, basófilos y eosinófilos.

Una "citoquina" es una proteína producida por una célula que afecta al comportamiento de otras células a través de un "receptor de citoquinas" sobre la superficie de las células a las que afectan las citoquinas. Las citoquinas fabricadas por los linfocitos se denominan a veces "linfoquinas". Los ejemplos de citoquinas incluyen interleuquinas, interferones y similares.

Por "inmunológicamente eficaz" se entiende una cantidad del péptido o fragmento del mismo que es eficaz para activar una respuesta inmunitaria para prevenir o tratar trastornos del crecimiento de células proliferativas, tales como el cáncer. Obviamente, dichas cantidades pueden variar entre las especies y los sujetos en función de muchos factores. Por ejemplo, generalmente se requieren dosis más altas para una respuesta inmunitaria eficaz en un ser humano en comparación con un ratón.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" abarca cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa que contienen las secuencias enumeradas en la presente memoria. Un polipéptido que comprende un epítipo de una proteína que contiene una secuencia como se describe en la presente memoria puede consistir enteramente en el epítipo, o puede contener secuencias adicionales. Las secuencias adicionales pueden derivar de la proteína nativa o pueden ser heterólogas, y tales secuencias pueden (pero no necesariamente) poseer propiedades inmunogénicas o antigénicas.

- Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos que se componen de al menos un dominio de unión, donde se forma un dominio de unión a anticuerpo a partir del plegamiento de dominios variables de una molécula de anticuerpo para formar espacios de unión tridimensionales con una forma de la superficie interna y una distribución de la carga interna complementaria a las características de un determinante antigénico de un antígeno, que permite una reacción inmunológica con el antígeno. Los anticuerpos incluyen proteínas recombinantes que comprenden los dominios de unión, así como los fragmentos, incluyendo los fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂ y F(ab')₂. El término "anticuerpo", según se utiliza en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinante. También incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos de cadena sencilla. La porción "Fc" de un anticuerpo se refiere a aquella porción de una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de la región constante de la cadena pesada, CH₁, CH₂ y CH₃, pero no incluye la región variable de la cadena pesada.
- Un "epítopo", según se utiliza en la presente memoria, es una porción de un polipéptido que es reconocida (es decir, se une específicamente) a una célula B y/o receptor de antígeno de la superficie de células T. Los epítopos se pueden identificar generalmente utilizando técnicas bien conocidas, tales como las que resume Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 243-247 (Raven Press, 1993) y las referencias citadas en la misma. Tales técnicas incluyen el escrutinio de polipéptidos derivados del polipéptido nativo para determinar la capacidad de reaccionar con antisueros específicos de antígeno y/o líneas o clones de células T. Un epítopo de un polipéptido es una porción que reacciona con tales antisueros y/o células T a un nivel que es similar a la reactividad del polipéptido de longitud completa (p. ej., en un ELISA o un análisis de reactividad de células T). Tales escrutinios se pueden llevar a cabo generalmente utilizando métodos bien conocidos por los expertos normales en la técnica, tales como los descritos por Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Los epítopos de células B y de células T también pueden predecirse por medio de análisis por ordenador. Los polipéptidos que comprenden un epítopo de un polipéptido que se expresa preferentemente en un tejido tumoral (con o sin una secuencia de aminoácidos adicional) están dentro del alcance de la presente invención.
- Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido agonista" se refiere a los epítopos del polipéptido que activan una respuesta inmunitaria más fuerte que un polipéptido nativo. Los ejemplos de las diferencias en las propiedades entre un polipéptido agonista versus un polipéptido nativo incluyen, pero no se limitan a a) se unen a moléculas de HLA a concentraciones de péptidos inferiores, (b) demuestran una mayor avidéz por las moléculas de HLA en los análisis de disociación, (c) cuando se utilizan con células presentadoras de antígenos inducen la producción de más IFN- γ por las células T derivadas con el uso del péptido nativo. El incremento o aumento de respuesta inmunitaria se mide como se ha descrito anteriormente.
- Según se utiliza en la presente memoria, "polipéptido nativo" se refiere a un polipéptido tal como se encuentra en su entorno natural. Por ejemplo, un antígeno tumoral MUC-1 nativo es expresado por una célula tumoral en un sujeto.
- En una realización preferida, los polipéptidos agonistas generan respuestas inmunitarias más fuertes, en comparación con el polipéptido nativo. Por ejemplo, en comparación con el péptido nativo P-92, los polipéptidos agonistas (a) se unen a HLA-A2 en concentraciones de péptido más bajas, (b) demuestran una avidéz más alta por HLA-A2 en los análisis de disociación, (c) cuando se utilizan con células presentadoras de antígeno inducen la producción de más IFN- γ por las células T derivadas con el uso del péptido nativo, y (d) fueron capaces de generar de manera más eficaz líneas de células T humanas específicas de MUC-1 a partir de voluntarios normales y sujetos con cáncer de páncreas. Lo más importante, las líneas de células T generadas utilizando el epítopo agonista fueron más eficaces que las generadas con el epítopo nativo, en la lisis de dianas pulsadas con el epítopo nativo y en la lisis de células tumorales humanas HLA-A2 que expresan MUC-1.
- En esta descripción, los sujetos que padecen o son susceptibles a, tumores, enfermedades infecciosas y similares son tratados con células presentadoras de antígenos autólogas, tales como por ejemplo las células dendríticas (DC), que han sido transducidas con un vector viral que codifica cualquiera de los polipéptidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos, expresando opcionalmente moléculas co-estimuladoras. Por ejemplo, se utilizaron DC autólogas infectadas con rF-MUC-1/TRICOM como APC. rF-MUC-1/TRICOM es un vector de avipoxvirus de replicación defectuosa que contiene los transgenes para MUC-1 y para una tríada de moléculas co-estimuladoras humanas (B7-1, ICAM-1 y LFA-3, denominada TRICOM). Se demostró que rF-MUC-1/TRICOM infectaba eficazmente las DC humanas e hiper-expresaban cada una de las moléculas co-estimuladoras, así como MUC-1, sobre la superficie de las DC (Tabla 2).
- La descripción proporciona un método para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno débilmente inmunogénico que comprende administrar a un sujeto un polipéptido agonista, identificado por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, variantes o fragmentos de los mismos, con una alta avidéz por HLA fusionado al inmunógeno

débil.

5 La descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un antígeno polipeptídico agonista derivado de un antígeno tumoral, tal como, por ejemplo, MUC-1, en donde el polipéptido agonista estimula una respuesta inmunitaria más fuerte en comparación con un polipéptido nativo. Otros ejemplos de antígenos tumorales incluyen, pero no se limitan a HER2/neu, antígeno carcinoembrionario (CEA), p53.

10 La descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico correspondiente a cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos. Los SEQ ID NO: 1 a 19 se identifican por

SEQ ID NO (péptido)	Secuencia peptídica	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO (n.t.)
1	ATWGQDVTSV	GCC/ACC/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	20
2	ALWGQDVTSV	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	21
3	ALLVLCVLV	GCC/CTG/CTG/GTC/CTG/GTC/TGC/GTC/CTG/GTC	22
4	TISDVSVSDV	ACC/ATC/TCG/GAT/GTC/TCG/GTC/TCG/GAT/GTC	23
5	ALAIVYLIAL	GCC/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG/ATC/GCC/CTG	24
6	VLVALAIVYL	GTC/CTG/GTC/GCG/CTG/GCC/ATC/GTC/TAC/CTG	25
7	YLIALAVCQC	TAC/CTG/ATC/GCC/CTG/GCC/GTC/TGC/CAATGC	26
8	WGQDVTSVPV	TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC/CCA/GTC	27
9	REGTINVHDV	AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC/CAC/GAT/GTC	28
10	GTQSPFFLLL	GGC/ACC/CAG/TCT/CCT/TTC/TTC/CTG/CTG/CTG	29
11	LAFREGTINV	CTG/GCC/TTC/AGA/GAA/GGT/ACC/ATC/AAC/GTC	30
12	TLASHSTKTD	ACT/CTG/GCC/TCG/CAC/TCG/ACC/AAG/ACC/GAT	31
13	LQRDISEMFL	CTG/CAA/AGA/GAT/ATC/TCG/GAA/ATG/TTC/CTG	32
14	AIWGQDVTSV	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	33
15	ALWGQDVTSL	GCC/CTG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	34
16	AMWGQDVTSV	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/GTC	35
17	AMWGQDVTSL	GCC/ATG/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	36
18	AIWGQDVTSL	GCC/ACT/TGG/GGA/CAG/GAT/GTC/ACC/TCG/CTG	37
19	ALWGQDVTSV		

15 La descripción proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que expresa uno cualquiera de los aminoácidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos. El vector codifica preferiblemente moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias codificantes, tales como por ejemplo, B7-1, ICAM-1 y LFA-331.

20 La descripción proporciona la transducción de células dendríticas con un vector que comprende cualquiera de las moléculas identificadas por los SEQ ID NO: 1 a 19, los fragmentos o variantes de los mismos, y opcionalmente, las moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias, tales como por ejemplo, B7-1, ICAM-1 y LFA-3.35. Estos vectores recombinantes proporcionan un efecto antitumoral específico para los sujetos que han sido diagnosticados con tumores MUC-1⁺. Sin embargo, este antígeno no es más que un ejemplo ilustrativo y no se pretende que deba interpretarse como limitante de ninguna manera. Los ejemplos de otros antígenos que son útiles para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyen, pero no se limitan a las formas expresadas en exceso o mutadas de antígenos. Por ejemplo, los tumores *Her2/neu*⁺ tales como los tumores de mama, renales, de próstata, y otros tumores HER2, el antígeno carcinoembrionario (CEA) para los cánceres gastrointestinales; K-ras para los cánceres de pulmón, gastrointestinales y de la vejiga; p53 que afecta a una amplia variedad de crecimiento neoplásico; SARDT3 en los cánceres de cabeza y cuello.

En otra descripción, se transducen *in vivo* células dendríticas de un sujeto, que padece o es susceptible de, cáncer,

con vectores recombinantes que expresan epítomos de polipéptidos agonistas. Las células dendríticas se pueden aislar de un sujeto, cultivar *ex vivo* con un vector, y luego volver a infundir las células dendríticas cultivadas en el sujeto. El cultivo de las células dendríticas se describe con detalle en los ejemplos que siguen. Alternativamente, el vector se puede administrar a un sujeto en necesidad de semejante tratamiento.

5 En una descripción, las células dendríticas transducidas presentan antígenos, por ejemplo, fragmentos peptídicos agonistas del antígeno MUC-1 sobre su superficie. Los linfocitos, específicos para los antígenos presentados, se activan, proliferan y reconocen las células tumorales que expresan el antígeno MUC-1. Los linfocitos incluyen, células B, células T auxiliares y células T citotóxicas. El reconocimiento, de cualquier célula que expresa epítomos antigénicos por las células inmunitarias, da como resultado la destrucción de una célula tumoral.

15 La descripción proporciona un vector de ácido nucleico que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos como los identificados por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos, conectados operablemente a un promotor inducible.

En otra realización preferida, el vector de ácido nucleico es un vector viral, plásmido y similares. Preferiblemente, el vector de ácido nucleico comprende un promotor inducible que es específico del tejido, y opcionalmente, moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias.

20 En otra descripción, el vector que comprende una secuencia de ácido nucleico codifica cualquiera de los polipéptidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19.

En otra descripción, el vector codifica uno cualquiera de los polipéptidos identificados por uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19 que tienen una identidad de secuencia con cualquiera uno de los SEC ID NO: 1 a 19 de al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente 25%, incluso más preferiblemente aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 99,9%.

30 La descripción proporciona una célula anfitriona que expresa los productos polipeptídicos del vector identificado por uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19 que tiene una identidad de secuencia con uno cualquiera una de los SEQ ID NO: 1 a 19 de al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente 25%, incluso más preferiblemente aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 99,9%. Preferiblemente, la célula anfitriona es una célula presentadora de antígeno, tal como por ejemplo, un monocito/macrófago, célula dendrítica o similares.

35 De acuerdo con la invención, las células dendríticas transducidas presentan el antígeno a las células del sistema inmunitario y activan el sistema inmunitario para que reconozcan epítomos antigénicos tumorales, tales como por ejemplo una célula tumoral que expresa el antígeno MUC-1.

40 En una realización preferida, el vector es un vector de avipoxvirus que comprende moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos agonistas y moléculas co-estimuladoras, como se describe con detalle en los ejemplos que siguen. También se pueden utilizar otros vectores. Los vectores preferidos incluyen vectores virales, proteínas de fusión y productos conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney. Se prefieren los vectores virales de ADN. Los vectores virales pueden ser elegidos para introducir los genes en las células de elección. Tales vectores incluyen vectores de poxvirus tales como vectores de ortopoxvirus o avipoxvirus, vectores del virus del herpes tales como el vector del virus herpes simplex I (VHS) (Geller et al., 1995, J. Neurochem, 64:487; Lim et al., 1995, en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, ed., Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra; Geller et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 1149), otros vectores de adenovirus (LeGal LaSalle et al., 1993, Science 259: 988; Davidson et al., 1993, Nat. Genet. 3: 219; Yang et al., 1995, J. Virol. 69: 2004) y vectores de virus adeno-asociados (Kaplitt et al., 1994, Nat. Genet. 8: 148; Kotin, et al. WO 98/11244 (3/19/1998) y Chiorini, et al., WO 99/61601 (12/2/1999)).

50 Los vectores de Poxvirus introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores de Avipoxvirus dan como resultado solamente una única expresión a corto plazo del ácido nucleico. Se prefieren los vectores de adenovirus, los vectores de virus adeno-asociados y los vectores de virus herpes simplex para la introducción del ácido nucleico en células neurales. El vector de adenovirus da como resultado una expresión más a corto plazo (alrededor de 2 meses) que el virus adeno-asociado (alrededor de 4 meses), que a su vez es más corto que el de los vectores de HSV. Los vectores se pueden introducir por técnicas convencionales, p. ej., infección, transfección, transducción o transformación. Los ejemplos de los modos de transferencia de genes incluyen, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio de ADN desnudo, DEAE dextrano, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección de células y vectores virales.

60 El vector se puede emplear para dirigirlo esencialmente a cualquier célula diana deseada. Por ejemplo, la inyección estereotáxica se puede utilizar para dirigir los vectores (p. ej., adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Otros

métodos que se pueden utilizar incluyen catéteres, inyecciones intravenosas, parenterales, intraperitoneales, y subcutáneas, y las rutas de administración orales u otras conocidas.

5 Otro método preferido es la inmunización con ADN. La inmunización con ADN emplea la inyección subcutánea de un vector de ADN plasmídico (ADNp) que codifica un marcador tumoral. La secuencia del ADNp es absorbida por las células presentadoras de antígenos (APC), preferiblemente por las células dendríticas. Una vez en el interior de la célula, el ADN que codifica la proteína se transcribe y se traduce y se presenta a los linfocitos.

10 Los constructos genéticos comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de ácido nucleico de elección y preferiblemente incluyen una secuencia de tráfico intracelular conectada operablemente a elementos reguladores necesarios para la expresión génica.

15 Cuando son absorbidos por una célula, los constructos genéticos pueden permanecer presente en la célula como una molécula extracromosómica funcional y/o integrarse en el ADN cromosómico de la célula. El ADN se puede introducir en las células en las que permanece como material genético separado en forma de un plásmido o plásmidos. Alternativamente, el ADN lineal que se puede integrar en el cromosoma se puede introducir en la célula. Al introducir ADN en la célula, se pueden añadir reactivos que promuevan la integración del ADN en los cromosomas. También se pueden incluir en la molécula de ADN secuencias de ADN que son útiles para promover la integración. Alternativamente, el ARN puede ser administrado a la célula. También se contempla proporcionar el constructo genético como un minicromosoma lineal que incluye un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Los constructos génicos pueden seguir formando parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en las células. Los constructos génicos pueden ser parte de los genomas de las vacunas virales recombinantes en las que el material genético, se integra en el cromosoma de la célula o permanece extracromosómico.

25 Los constructos genéticos incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de inicio, un codón de parada, y una señal de poliadenilación. Además, pueden ser necesarios potenciadores para la expresión génica de la secuencia de elección, por ejemplo, los polipéptidos agonistas identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19, variantes o fragmentos de los mismos. Es necesario que estos elementos se conecten operablemente a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores sean operables en el sujeto al que se administran.

35 Los codones de inicio y los codones de parada se consideran generalmente parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína diana inmunogénica. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el sujeto al que se administre la construcción génica. Los codones de inicio y parada deben estar en marco con la secuencia codificante.

Los promotores y las señales de poliadenilación utilizados deben ser funcionales dentro de las células del sujeto.

40 Los ejemplos de promotores útiles para practicar la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero no se limitan a los promotores de virus de simios 40 (SV40), de virus de tumor mamario de ratón (MMTV), de virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor la larga repetición terminal del VIH (LTR), virus de Moloney, ALV, citomegalovirus (CMV) tales como el promotor temprano inmediato de CMV, virus de Epstein Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y metalotioneína humana.

50 Los ejemplos de las señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, pero no están limitados a señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de LTR.

55 Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del ADN, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN. Tales elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador se puede seleccionar del grupo que incluye pero no se limita a: actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.

60 Los constructos genéticos pueden estar provistos del origen de replicación de mamífero con el fin de mantener el constructo extracromosómicamente y producir múltiples copias del constructo en la célula. Por ejemplo, los plásmidos pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, Calif.) contienen el origen de replicación del virus de Epstein Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1 que produce replicación episomal de alto número de copias sin integración.

Con el fin de maximizar la producción de proteínas, se pueden seleccionar secuencias reguladoras que sean muy

adecuadas para la expresión de genes en las células a las que se administra el constructo. Por otra parte, se pueden seleccionar los codones que se transcriben más eficazmente en la célula. Un experto en la técnica puede producir constructos de ADN que sean funcionales en las células.

5 El método de la presente descripción comprende las etapas de administrar moléculas de ácido nucleico a los tejidos del sujeto. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar por vía intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, o tópica o por medio de lavado del tejido mucosal seleccionado del grupo que consiste en vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual.

10 La molécula de ácido nucleico puede ser suministrada a las células conjuntamente con la administración de un agente facilitador. Los agentes facilitadores también se denominan potenciadores de la función del polinucleótido o agentes facilitadores de vacunas genéticas. Los agentes facilitadores se describen, por ejemplo, en la Solicitud Internacional Núm. PCT/US94/00899 presentada el 26 de Enero de 1994 y la solicitud Internacional Núm. PCT/US95/04071 presentada el 30 de Marzo de 1995. Los agentes facilitadores que se administran conjuntamente con moléculas de ácido nucleico se pueden administrar en forma de una mezcla con la molécula de ácido nucleico o se pueden administrar por separado simultáneamente, antes o después de la administración de las moléculas de ácido nucleico.

20 En algunas realizaciones preferidas, los constructos genéticos de la invención se formulan con o se administran junto con un facilitador seleccionado del grupo que consiste, por ejemplo, en ésteres de ácido benzoico, anilidas, amidinas, uretanos y las sales clorhidrato de los mismos tales como las de la familia de los anestésicos locales. El agente facilitador se administra antes, simultáneamente o después del constructo genético. El agente facilitador y el constructo genético se pueden formular en la misma composición.

25 En algunas realizaciones de la descripción, el sujeto se somete primero a la inyección del facilitador antes de la administración del constructo genético. Esto es, por ejemplo, hasta aproximadamente una semana a diez días antes de la administración del constructo genético, al sujeto se le inyecta primero el facilitador. En algunas realizaciones, al sujeto se le inyecta el facilitador de aproximadamente 1 a 5 días; en algunas realizaciones 24 horas antes o después de la administración del constructo genético. Alternativamente, si se utiliza, el facilitador se administra simultáneamente, minutos antes o después de la administración del constructo genético. De acuerdo con ello, el facilitador y el constructo genético pueden combinarse para formar una sola composición farmacéutica.

35 En algunas realizaciones, los constructos genéticos se administran libres de agentes facilitadores, es decir en formulaciones libres de agentes facilitadores utilizando protocolos de administración en los que los constructos genéticos no se administran conjuntamente con la administración de agentes facilitadores.

40 Las moléculas de ácido nucleico que se suministran a las células de acuerdo con la invención pueden servir como moldes genéticas para las proteínas que funcionan como agentes de inmunización profilácticos y/o terapéuticos. En realizaciones preferidas, las moléculas de ácido nucleico comprenden las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la región codificante en las células del animal.

45 En realizaciones adicionales de la presente invención, los polipéptidos agonistas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para la inmunoterapia de tumores positivos para MUC-1. En estas realizaciones, los compuestos (que pueden ser polipéptidos, anticuerpos o moléculas de ácido nucleico) se incorporan preferiblemente a composiciones farmacéuticas o vacunas. Las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de tales compuestos y un portador fisiológicamente aceptable. Las vacunas pueden comprender uno o más polipéptidos y un potenciador de la respuesta inmunitaria, tal como un coadyuvante o un liposoma (al que se incorpora el compuesto). Las composiciones farmacéuticas y vacunas pueden contener adicionalmente un sistema de suministro, tal como microesferas biodegradables que se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 50 4.897.268 y 5.075.109. Las composiciones farmacéuticas y vacunas dentro del alcance de la presente descripción también pueden contener otros compuestos, incluyendo uno o más polipéptidos separados.

55 Si bien se puede emplear cualquier portador adecuado conocido por los expertos normales en la técnica en las composiciones farmacéuticas de esta descripción, el tipo de portador variará dependiendo del modo de administración. Para la administración parenteral, tal como la inyección subcutánea, el portador comprende preferiblemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los portadores anteriores o un portador sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Las microesferas biodegradables (p. ej., polilactato-poliglicolato) también se pueden emplear como portadores para las 60 composiciones farmacéuticas de esta descripción.

Se puede emplear cualquiera de una variedad de coadyuvantes en las vacunas de esta descripción para potenciar

de manera no específica la respuesta inmunitaria. La mayoría de los coadyuvantes contienen una sustancia diseñada para proteger el antígeno del catabolismo rápido, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, y un estimulador de las respuestas inmunitarias, tal como lípido A, proteínas derivadas de *Bordetella pertussis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Los coadyuvantes adecuados están disponibles comercialmente, por ejemplo, como coadyuvante incompleto y coadyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), Coadyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ), alumbre, microesferas biodegradables, monofosforil lípido A y Quil A. Las citoquinas, tales como GM-CSF o interleuquina-2, -7, o -12, también se pueden utilizar como coadyuvantes.

La descripción proporciona un método para tratar a un sujeto que padece o es susceptible a un tumor MUC-1 que comprende la administración a un sujeto de uno cualquiera de los péptidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos.

De acuerdo con la descripción, se genera una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1, por la administración de un polipéptido agonista a una dosis terapéuticamente eficaz suficiente para generar una respuesta inmunitaria celular, en donde los polipéptidos agonistas son uno cualquiera de los polipéptidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19, fragmentos o variantes de los mismos, y opcionalmente moléculas co-estimuladoras de células inmunitarias. Preferiblemente, los polipéptidos identificados por uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19 que tiene una identidad de secuencia con uno cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19 de al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente 25%, incluso más preferiblemente aproximadamente 40 %, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 99,9%.

Los péptidos se administran a un sujeto que padece o es susceptible a diversos tipos de cáncer. El diagnóstico clínico definitivo de un cáncer en particular garantiza la administración de los péptidos, incluyendo las primeras fases de la enfermedad. Las aplicaciones profilácticas están justificadas en los casos en los que los sujetos con antecedentes familiares de la enfermedad y que se pronostica que están en riesgo por medio de indicadores de pronóstico confiables podrían ser tratados profilácticamente para interceptar el cáncer antes de su aparición, tales como los cánceres positivos para MUC-1; o se pueden administrar después de una operación.

Las vacunas de péptidos se pueden administrar en muchas formulaciones posibles, en medios farmacológicamente aceptables. En el caso de un péptido corto, el péptido se puede conjugar con un portador, tal como KLH, con el fin de aumentar su inmunogenicidad. La vacuna se puede administrar junto con un coadyuvante, varios de los cuales son conocidos para los expertos en la técnica. Después de la inmunización inicial con la vacuna, se puede suministrar una dosis de refuerzo. Las vacunas se administran por métodos convencionales, en dosis que son suficientes para provocar una respuesta inmunológica, que puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica.

La eficacia del péptido en el contexto de la prevención se juzga basándose en los siguientes criterios: la frecuencia de células T reactivas al péptido determinada por dilución limitante, la respuesta de proliferación de líneas de células T y clones reactivos al péptido, los perfiles de citoquinas de las líneas de células T y clones para el péptido deseado establecido a partir de los sujetos. La eficacia se establece por la disminución en la frecuencia de células reactivas, una reducción en la incorporación de timidina con el péptido alterado en comparación con la nativa, y una reducción en TNF e IFN- α . Las mediciones clínicas incluyen la tasa de recaída a intervalos de uno y dos años, en una curva de Kaplan-Meier, un retraso en la reducción sostenida de la progresión de la fase del cáncer en el número y tamaño de los tumores incluyendo un cambio en el área y el volumen de las imágenes T2 en la MRI, y el número y volumen de lesiones determinados por imágenes mejoradas con gadolinio.

Los péptidos, variantes y fragmentos de los mismos, de la presente invención se pueden administrar ya sea solos, o en forma de una composición farmacéutica. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender uno o más de los péptidos, combinados con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares, carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, coadyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio) y conservantes. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más ingredientes activos adicionales, tales como, por ejemplo, citoquinas como el β -interferón.

Las composiciones de la presente descripción se pueden formular para la forma de administración indicada, incluyendo por ejemplo, para la administración oral, nasal, venosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. Dentro de otras realizaciones de la descripción, las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar como parte de un implante de liberación sostenida. En otras realizaciones más, las composiciones de la presente descripción se pueden formular en forma de un producto liofilizado, utilizando excipientes apropiados que proporcionen estabilidad como producto liofilizado, y después de la rehidratación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad que se vaya a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración serán determinadas por factores tales como el estado del sujeto, y el tipo y gravedad de la enfermedad del sujeto. Dentro de realizaciones particularmente preferidas de la descripción, los péptidos, variantes, o fragmentos de los mismos, o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar a una dosificación que varía de aproximadamente 5 a 50 mg/kg, aunque las dosis apropiadas pueden ser determinadas por pruebas clínicas. Las dosis de análogo de péptido serán de aproximadamente 5-50 mg/kg, pero se determinan con mayor precisión después de las pruebas. Los sujetos pueden ser controlados para determinar la eficacia terapéutica por medio de MRI, y signos de exacerbación clínica, como se ha descrito anteriormente.

Se puede utilizar MRI para medir lesiones activas utilizando la formación mejorada de imágenes por gadolinio-DTPA (McDonald et al. Ann. Neurol. 36:14, 1994) o la localización y alcance de las lesiones utilizando técnicas ponderadas en T₂. Brevemente, se obtienen MRI de referencia. Se utilizan el mismo plano de imagen y posición del sujeto para cada estudio posterior. Las secuencias de posicionamiento y formación de imágenes se eligen para maximizar la detección de lesiones y facilitar el seguimiento de la lesión. Se utilizan las mismas secuencias de posicionamiento y de formación de imágenes en estudios posteriores. La presencia, localización y alcance de las lesiones de MS son determinados por radiólogos. Las áreas de las lesiones se describen y se suman trozo a trozo para el área total de la lesión. Se pueden realizar tres análisis: evidencia de lesiones nuevas, velocidad de aparición de lesiones activas, porcentaje de cambio en el área de la lesión (Paty et al., Neurology 43:665, 1993). Se establece la mejora debida a la terapia cuando hay una mejora estadísticamente significativa en un sujeto en comparación con la referencia o en un grupo tratado frente a un grupo con placebo.

En otro aspecto de la descripción, se puede administrar cualquier polipéptido antigénico tumoral a un sujeto diagnosticado que padece o es susceptible de padecer diversos tipos de cáncer. Los polipéptidos correspondientes a los antígenos tumorales identificados se pueden utilizar para estimular las células del sistema inmunitario para reconocer y lisar las células tumorales que expresan los antígenos tumorales, tales como por ejemplo, CEA, p53, KRAS, y similares.

Si bien se han aplicado varios procedimientos que implican el uso de anticuerpos en el tratamiento de tumores, se han registrado pocos, si los hubiera, intentos con éxito utilizando células T citotóxicas. Teóricamente, las células T citotóxicas serían los medios preferidos de tratamiento de tumores. Sin embargo, no hay procedimientos disponibles para activar específicamente las células T citotóxicas. En contraste con los anticuerpos, los receptores de células T sobre la superficie de las células CD8 no pueden reconocer los antígenos foráneos directamente. El antígeno debe ser presentado primero al receptor de células T, tal como una célula dendrítica.

La presentación del antígeno a las células T CD8 se logra por medio de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del tipo de la Clase I. El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se refiere a un gran locus genético que codifica una extensa familia de glicoproteínas que juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria. Los genes del MHC, que también se conocen como complejo HLA (antígeno leucocitario humano), están ubicados en el cromosoma 6 en los seres humanos. Las moléculas codificadas por los genes del MHC están presentes sobre las superficies celulares y son en gran parte responsables del reconocimiento de los trasplantes de tejidos como "no propios". De este modo, las moléculas del MHC unidas a membrana están íntimamente involucradas en el reconocimiento de antígenos por las células T.

Los productos del MHC se agrupan en tres clases principales, denominadas I, II, y III. Las células T que sirven principalmente como células auxiliares expresan CD4 e interactúan principalmente con moléculas de Clase II, mientras que las células que expresan CD8, que en su mayoría representan células efectoras citotóxicas, interactúan con moléculas de Clase I.

Las moléculas de Clase I son glicoproteínas de membrana con la capacidad de unirse a péptidos derivados principalmente de la degradación intracelular de proteínas endógenas. Los complejos de moléculas del MHC con péptidos derivados de proteínas foráneas virales, bacterianas y otras comprenden el ligando que desencadena la capacidad de respuesta al antígeno de las células T. En contraste, los complejos de moléculas del MHC con péptidos derivados de productos celulares normales juegan un papel "al enseñar" a las células T a tolerar los péptidos propios, en el timo. Las moléculas de Clase I no presentan antígenos enteros, intactos; más bien, presentan fragmentos peptídicos de los mismos, "cargados" en su "surco de unión al péptido".

Como reconocerán los expertos en la técnica, el término células "compatibles con el anfitrión" o "autólogas" representa células que son del misma o similar haplotipo que el del sujeto o "anfitrión" a la que se administran las células.

La presentación de las moléculas del MHC de Clase I unidas solo al péptido ha sido en general ineficaz en la

5 activación de células CD8. En la naturaleza, las células CD8 son activadas por las células presentadoras de antígeno, tales como, por ejemplo, las células dendríticas, que presentan no sólo una molécula de Clase I del MHC unida al péptido, sino también una molécula co-estimuladora. Tales moléculas co-estimuladoras incluyen B7 que ahora se reconoce que son dos subgrupos designados B7.1 y B7.2, ICAM-1 y LFA-3. También se ha encontrado que las moléculas de adherencia celular tales como las integrinas ayudan en este proceso.

10 Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que se encuentran en todos los tejidos y órganos, incluyendo la sangre. Específicamente, las células dendríticas presentan antígenos para los linfocitos T, es decir, procesan y presentan antígenos, y estimulan las respuestas de las células T no expuestas anteriormente a antígenos y de memoria. Además de su papel en la presentación de antígenos, las células dendríticas se comunican directamente con los tejidos no linfáticos y sondan el tejido no linfático en busca de una señal de lesión (p. ej., isquemia, infección o inflamación) o crecimiento tumoral. Una vez señalizado, las células dendríticas inician la respuesta inmunitaria mediante la liberación de IL-1 que activa los linfocitos y monocitos. Cuando la célula T CD8 interactúa con una célula presentadora de antígeno, tal como una célula dendrítica, que tiene el péptido unido por una molécula del MHC de Clase I y co-estimuladora, se activa la proliferación de la célula T CD8 y llega a ser una célula T efectora. Véase, en general, Janeway y Travers, Immunobiology, publicado por Current Biology Limited, Londres (1994).

20 Por consiguiente, lo que se necesita y lo que la presente invención proporciona, es un medio para activar las células T de manera que proliferen, se vuelvan citotóxicas para las células que expresan el antígeno deseado, tal como por ejemplo MUC-1, y mantengan las células de memoria específicas para el antígeno administrado. Por lo tanto, el sistema inmunitario está cebado contra varios epítomos tumorales de manera que si surgen tumores espontáneos, existe un grupo de células inmunitarias cebadas que se activan para reconocer y eliminar las células tumorales. Preferiblemente, los epítomos presentados al sistema inmunitario comprenden epítomos agonistas como se describe en la presente memoria. Los polipéptidos agonistas de la descripción comprenden preferiblemente una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente 60% a la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 19, los fragmentos o variantes de los mismos, más preferiblemente, el polipéptido agonista comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente 80% a la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 19. Más preferiblemente, el polipéptido agonista comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos aproximadamente 90%, 95%, o 99,9% a la amino secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 19.

35 Se puede encontrar una revisión de la biología de las células T de memoria en Dutton et al. (1998) Ann. Rev Immunol 16:201-23. Las células de memoria expresan un patrón diferente de marcadores de superficie celular, y responden de varias maneras que son funcionalmente diferentes de las de las células no expuestas a antígeno previamente. Las células de memoria humanas son CD45RA⁻, CD45RO⁺. En contraste con las células no expuestas a antígenos previamente, las células de memoria secretan una amplia gama de citoquinas de células T.

40 Las quimioquinas y citoquinas también juegan un papel importante en el desarrollo de una respuesta inmunitaria. El papel de las quimioquinas en el tráfico de leucocitos es revisado por Baggiolini (1998) Nature 392: 565-8, en donde se sugiere que las respuestas de migración en el tráfico complicado de linfocitos de diferentes tipos y grados de activación estarán mediadas por quimioquinas. El uso de pequeñas moléculas para bloquear las quimioquinas es revisado por Baggiolini y Moser (1997) J. Exp. Med. 186:1189-1191.

45 El papel de las diversas quimioquinas específicas en el anidamiento de linfocitos se ha descrito previamente. Por ejemplo, Campbell et al. (1998) Science, mostraron que SDF-1 (también llamado PBSF), 6-C-quina (también llamada Exodus-2), y MIP-3beta (también llamado ELC o Exodus-3) inducían la adherencia de la mayoría de los linfocitos circulantes, incluyendo la mayoría de las células T CD4⁺; y MIP-3Alpha (también llamado LARC o Exodus-1) desencadenaba la adherencia de las células T CD4⁺ de memoria, pero no de las no expuestas a antígeno previamente. Tangemann et al. (1998) J. Immunol. 161:6330-7 describen el papel de la quimioquina de tejido linfoide secundario (SLC), una quimioquina asociada con vénulas endoteliales altas (HEV), en el anidamiento de los linfocitos en los órganos linfoides secundarios. Campbell et al. (1998) J. Cell Biol 141(4):1053-9 describen el receptor para SLC como CCR7, y que su ligando, SLC, puede desencadenar una rápida detención dependiente de integrina del rodamiento de linfocitos bajo cizallamiento fisiológico.

55 Las células B maduras se pueden medir en inmunoanálisis, por ejemplo, por los antígenos de la superficie celular, incluyendo CD19 y CD20 con anticuerpos monoclonales marcados pudiéndose utilizar fluorocromos o enzimas para estos antígenos. Las células B que se han diferenciado en células plasmáticas se pueden enumerar por medio de tinción para determinar las inmunoglobulinas intracelulares mediante inmunofluorescencia directa en frotis fijos de células cultivadas.

60 Se encuentran disponibles varias maneras diferentes, para evaluar la madurez y la diferenciación celular. Por

ejemplo, uno de tales métodos es mediante la medición de fenotipos de células. Los fenotipos de las células inmunitarias y los cambios fenotípicos se pueden evaluar por citometría de flujo después de la tinción de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales que se unirán a proteínas de membrana características de diversos tipos de células inmunitarias.

5 Un segundo medio para evaluar la diferenciación de células es mediante la medición de la función celular. Esto se puede realizar bioquímicamente, mediante la medición de la expresión de enzimas, ARNm, genes, proteínas, u otros metabolitos dentro de la célula, o secretados por la célula. También se pueden utilizar bioanálisis para medir la diferenciación de células funcionales o medir la producción de anticuerpos específicos dirigidos a los tumores de un
10 sujeto, líneas de células tumorales o células de tumores frescos.

Las células inmunitarias expresan una variedad de moléculas de superficie celular que se pueden detectar con anticuerpos monoclonales o antiseros policlonales. Las células inmunitarias que han experimentado diferenciación o activación también se pueden enumerar por medio de tinción para detectar la presencia de proteínas de la
15 superficie celular características por inmunofluorescencia directa en frotis fijos de células cultivadas.

Los análisis citotóxicos de células T *in vitro* son bien conocidos para los expertos en la técnica. Un método preferido consiste en medir la citotoxicidad en un análisis de liberación de cromato de sodio⁵¹ (⁵¹Cr) de 5 horas. En particular, se prefiere un análisis de liberación de Cr⁵¹ de 20 hr. Las células tumorales, también denominadas en la presente memoria "células diana" se cultivan en placas de microtitulación de fondo plano y se incuban a 37°C durante la
20 noche. Las dianas se lavan y se marcan al día siguiente con ⁵¹Cr a 37°C. El ⁵¹Cr es absorbido por las células diana, por endocitosis o por pinocitosis, y se retiene en el citoplasma. Los pocillos que contienen células tumorales se lavan, y a continuación las ATC armadas o no armadas, referidas como "células efectoras" se cultivan en placa a diferentes razones E:T y se incuban durante la noche a 37°C. La citolisis es una medida del ⁵¹Cr liberado de las
25 células diana al sobrenadante debido a la destrucción de las células diana por las células efectoras. Las placas de microtitulación se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos y se retira una alícuota de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 100 µl y se mide el nivel de radiactividad al día siguiente por medio de un contador gamma y se calcula el porcentaje de lisis específica.

30 El porcentaje de lisis específica se mide mediante el uso de la fórmula:

$$\frac{(\text{Cr}^{51} \text{ liberado de las células diana}) - (\text{Cr}^{51} \text{ espontáneo liberado de las células diana})}{$$

$$(\text{Cr}^{51} \text{ máximo liberado de las células diana}) - (\text{Cr}^{51} \text{ espontáneo liberado de las células diana}) \times 100$$

35 El ⁵¹Cr espontáneo liberado de las células diana se mide con las células tumorales a las que no se han añadido las células efectoras. El ⁵¹Cr máximo liberado de las células diana se obtiene mediante la adición, por ejemplo, de HCl 1 M y representa la cantidad total de ⁵¹Cr presente en el citoplasma de la célula diana.

40 La liberación espontánea de ⁵¹Cr de las células diana se mide con las células tumorales a las que no se han añadido células efectoras. El máximo ⁵¹Cr liberado de las células diana se obtiene mediante la adición de, por ejemplo, HCl 1 M y se representa la cantidad total de ⁵¹Cr presente en el citoplasma de la célula diana.

Otros medios de análisis de la actividad de los linfocitos T es mediante la reacción mixta de linfocitos descrita en los ejemplos que siguen. También se pueden utilizar otros análisis de citotoxicidad, tales como el marcaje de células diana con timidina tritiada (³H-TdR). La ³H-TdR es absorbida por las células diana en el núcleo de la célula. La liberación de ³H-TdR es una medida de la muerte celular por la fragmentación del ADN. El análisis se llevó a cabo como antes, excepto que el período de incubación es al menos aproximadamente 48 horas y se miden de 50 µl a aproximadamente 100 µl del sobrenadante mediante un contador beta en presencia de al menos aproximadamente
50 1 ml de fluido de centelleo. El cálculo del porcentaje de lisis específica se realiza utilizando la fórmula anterior.

En una realización preferida, el polipéptido se expresa al menos a un nivel superior en un sujeto con cáncer en comparación con los niveles de expresión en los sujetos normales, preferiblemente el polipéptido se expresa de al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 10 veces más en un sujeto con cáncer en comparación con la expresión en un sujeto normal. Preferiblemente, el cáncer es un cáncer MUC-1⁺ y la muestra del sujeto se obtiene de un sujeto mamífero, incluyendo un primate, tal como un sujeto humano.

La descripción proporciona un método para tratar un sujeto que padece o es susceptible a un tumor MUC-1 que comprende el aislamiento de células dendríticas a partir de un sujeto afectado de cáncer; y, el tratamiento de las células dendríticas con uno o más de los polipéptidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19; fragmentos y variantes de los mismos. Preferiblemente, las células dendríticas tratadas se administran al sujeto.

En otra descripción más, las células dendríticas autólogas se pueden aislar de un sujeto, transducir con los vectores

descritos en detalle en la presente memoria, cultivar, y re-infundir al sujeto.

Una población "aislada" o "purificada" de las células está sustancialmente libre de células y materiales con los que está asociado en la naturaleza. Por APC sustancialmente libres o sustancialmente purificadas se quiere significar que al menos 50% de la población son APC, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, e incluso más preferiblemente al menos 90% está libre de células que no son APC con las que están asociadas en la naturaleza.

Las células dendríticas de las diferentes fases de maduración se pueden aislar basándose en los marcadores de expresión de la superficie celular. Por ejemplo, las células dendríticas maduras son menos capaces de captar nuevas proteínas para su presentación, pero son mucho mejores en la estimulación de las células T en reposo para crecer y diferenciarse. Así, las células dendríticas maduras pueden tener importancia. Las células dendríticas maduras se pueden identificar por su cambio de morfología; por su falta de adherencia; y por la presencia de diversos marcadores. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores de superficie celular tales como B7.2, CD40, CD11c⁺, y MHC de Clase II. Alternativamente, la maduración se puede identificar mediante la observación o medición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Las células dendríticas pueden ser recogidas y analizadas utilizando técnicas y dispositivos típicos de citofluorografía y clasificación de células, tales como un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos específicos para antígenos de la superficie celular de las diferentes etapas de maduración de las células dendríticas están disponibles comercialmente.

La cantidad de células dendríticas administrada al sujeto también variará dependiendo del estado del sujeto y se debe determinar mediante la consideración de todos los factores apropiados por el médico. Preferiblemente, sin embargo, se utilizan de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{12} , más preferiblemente de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{11} , y aún más preferiblemente, de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10} células dendríticas para los seres humanos adultos. Estas cantidades variarán dependiendo de la edad, el peso, el tamaño, el estado, el sexo del sujeto, el tipo de tumor que se deba tratar, la vía de administración, si el tratamiento es regional o sistémico, y otros factores. Los expertos en la técnica deben ser fácilmente capaces de obtener las dosis y programas de administración adaptados a las circunstancias y necesidades del sujeto específico.

Los métodos de reintroducción de componentes celulares son conocidos en la técnica e incluyen procedimientos tales como los ilustrados en la Patente de Estados Unidos Núm. 4.844.893 de Honsik, et al. y la Patente de Estados Unidos Núm. 4.690.915 de Rosenberg. Por ejemplo, es apropiada la administración de células CD8 activadas vía infusión intravenosa. Cualquier toxicidad, de la infusión de células de donantes, observada en una mujer embarazada, dará lugar a la cesación inmediata de cualquier infusión ulterior. La toxicidad se mide de acuerdo con la escala del Instituto Nacional del Cáncer (NCI).

Clasificación de toxicidad - Escala de toxicidad común del NCI.

* Si se producen toxicidades de Grado I-II, el sujeto puede continuar con el programa de infusión.

* Si se produce toxicidad de Grado III, el "fármaco" se mantiene hasta que la toxicidad se reduce al Grado I o II, a continuación, se reanuda la infusión. Si se produce toxicidad de Grado III o IV después de la reanudación, se detienen las infusiones de "fármacos".

* Si se produce toxicidad de Grado IV, se registra que el sujeto tiene toxicidad de Grado IV y la siguiente infusión se reduce a la dosis previa. Si la dosis previa provoca toxicidad de Grado IV, se detiene el "fármaco".

* Si se produce toxicidad de Grado IV en 1 de 3 sujetos a un nivel de dosis específico, se introducen 3 sujetos adicionales en ese nivel de dosis celular para un total de 6 sujetos a ese nivel de dosis. Si 2 de 6 sujetos a un nivel de dosis celular desarrollan toxicidad de Grado IV, esta dosis se define como dosis máxima tolerada (MTD). A los siguientes 3 sujetos se les proporciona 66% (dos tercios) del nivel de dosis celular previo. A los efectos de la evaluación del aumento de dosis, cada sujeto al mismo nivel de dosis debe haber recibido por lo menos 4 de 6 infusiones.

Se pueden generar grandes cantidades de células dendríticas presentadoras de antígeno *ex vivo* como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.497.876. Tras la recolección de progenitores hematopoyéticos y las células madre CD34⁺ de un sujeto, se puede usar citoquinas tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el ligando flt-3 (flt3-L) para expandir las células *in vitro* y para conducir su diferenciación a células del linaje de células dendríticas. Las citoquinas también se pueden utilizar para aumentar el número de células CD34⁺ en circulación antes de la recolección. Las células dendríticas resultantes se exponen a un antígeno contra el que se desea provocar una respuesta inmunitaria, y se permite que se procese el antígeno (este

procedimiento se denomina a veces en la técnica "pulsado con antígeno"). Las células dendríticas pulsadas con antígeno (o que expresan el antígeno) se activan con una proteína de unión a CD40, y se administran posteriormente al sujeto.

5 Las células dendríticas comprenden una población heterogénea de células con morfología distintiva y una amplia distribución tisular. El sistema de células dendríticas y su papel en la inmunidad es revisada por Steinman, R. M., Annu. Rdo. Immunol., 9: 271-296 (1991), que se incorpora a la presente memoria como referencia. La superficie celular de las células dendríticas es inusual, con proyecciones de tipo velo características, y se caracteriza por tener los marcadores de superficie celular CD1a⁺, CD4⁺, CD86⁺, o HLA-DR⁺. Las células dendríticas tienen una alta capacidad para sensibilizar células T restringidas por el MHC y son muy eficaces en la presentación de antígenos a las células T *in situ*, tanto auto-antígenos durante el desarrollo y la tolerancia de las células T y antígenos foráneos durante la inmunidad.

15 Debido a su eficacia en la presentación de antígenos, las células dendríticas autólogas preferentemente se utilizan *ex vivo* como coadyuvantes aloantigénicos (véase, por ejemplo, Romani, et al., J. Exp. Med., 180:83 (1994)). El uso de células dendríticas como agentes inmunoestimuladores ha sido limitado debido a la baja frecuencia de células dendríticas en la sangre periférica, la accesibilidad limitada de los órganos linfoides y el estado de diferenciación terminal de las células dendríticas. Las células dendríticas se originan a partir de progenitores de médula ósea o de sangre periférica y células mononucleares de sangre periférica CD34⁺, y la proliferación y maduración de las células dendríticas se pueden mejorar por las citoquinas sargramostim GM-CSF, Leukine™ (Immunex Corporation, Seattle, Wash.), TNF- α , ligando c-kit (también conocido como factor de células madre (SCF), factor de Steel (SF), o factor de crecimiento de mastocitos (MGF)) e interleuquina-4. Recientemente, se ha encontrado que flt3-L estimula la generación de grandes cantidades de células dendríticas funcionalmente maduras, tanto *in vivo* como *in vitro*.

25 Cultivo *ex vivo* de células dendríticas

Un procedimiento para la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.199.942, incorporada a la presente memoria como referencia. Otros métodos adecuados son conocidos en la técnica. Brevemente, el cultivo y expansión *ex vivo* comprende: (1) recoger células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ de un sujeto a partir de la recolección de explantes de médula ósea o sangre periférica; y (2) expandir tales células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.199.942, se pueden utilizar otros factores tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y el ligando c-kit,.

35 Las células madre o progenitoras que tienen el marcador CD34 constituyen sólo aproximadamente 1% a 3% de las células mononucleares de la médula ósea. La cantidad de células madre o progenitoras CD34⁺ en la sangre periférica es aproximadamente 10 a 100 veces menor que en la médula ósea. Se pueden utilizar citoquinas tales como flt3-L para aumentar o movilizar el número de células dendríticas *en vivo*. El aumento de la cantidad de células dendríticas de un sujeto puede facilitar la presentación de antígenos a las células T para el antígeno o los antígenos que ya existen en del sujeto, tales como un antígeno tumoral, o un antígeno bacteriano o viral. Alternativamente, las citoquinas se pueden administrar antes de, simultáneamente a o posteriormente a la administración de un antígeno a un sujeto con fines de inmunización.

45 células de sangre periférica se recogen utilizando procedimientos de aféresis conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bishop et al., Blood, vol. 83, Núm. 2, págs. 610-616 (1994). Brevemente, las células progenitoras de sangre periférica (PBPC) y las células madre de sangre periférica (PBSC) se recogieron utilizando dispositivos convencionales, por ejemplo, un dispositivo de aféresis Haemonetics Modelo V50 (Haemonetics, Braintree, Mass.). Se realizan típicamente recolecciones de cuatro horas no más de cinco veces a la semana hasta que se recogen aproximadamente 6,5x10 células mononucleares (MNC)/kg. Las células se suspenden en un medio convencional y a continuación se centrifugan para eliminar los glóbulos rojos y los neutrófilos. Las células localizadas en la interfase entre las dos fases (la capa leucocitaria) se retiran y se resuspenden en HBSS. Las células suspendidas son predominantemente mononucleares y una parte sustancial de la mezcla celular son células madre tempranas.

55 Se conoce una variedad de técnicas de selección de células para la identificación y la separación de células madre o progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ a partir de una población de células. Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales (u otras proteínas de unión a células específicas) para unirse a una proteína proteína marcadora o el antígeno de superficie encontrado sobre las células madre o progenitoras. Varios de estos marcadores o antígenos de superficie celular para las células madre hematopoyéticas (es decir, flt-3, CD34, My-10, y Thy-1) son conocidos en la técnica, puesto que son proteínas de unión específica.

60 En un método, los anticuerpos o proteínas de unión se fijan a una superficie, por ejemplo, esferas de vidrio o matraz, esferas magnéticas, o una resina de cromatografía adecuada, y se ponen en contacto con la población de células.

Las células madre se unen a la matriz de esferas. Alternativamente, las proteínas de unión se pueden incubar con la mezcla de células y la combinación resultante se puede poner en contacto con una superficie que tiene una afinidad por el complejo de anticuerpo-célula. células no deseadas y la materia celular se retiran proporcionando una población relativamente pura de células madre. Las proteínas de unión celulares específicas también se pueden marcar con un marcador fluorescente, p. ej., cromóforo o fluoróforo, y las células marcadas se pueden separar por clasificación. Preferiblemente, el aislamiento se realiza mediante una columna de inmunofinidad.

Las columnas de inmunofinidad pueden adoptar cualquier forma, pero normalmente comprenden un reactor de lecho relleno. El lecho de relleno en estos biorreactores se elabora preferiblemente a partir de un material poroso que tiene un revestimiento sustancialmente uniforme de un sustrato. El material poroso, que proporciona una alta razón de área superficial a volumen, permite que la mezcla de células fluya sobre una gran área de contacto, a la vez que no obstaculiza el flujo de células fuera del lecho. El sustrato debe, ya sea por sus propias propiedades, o por la adición de un radical químico, presentar alta afinidad para un radical encontrado sobre la proteína de unión a células. Los sustratos típicos incluyen avidina y estreptavidina, si bien se pueden utilizar otros sustratos convencionales.

En un método útil, los anticuerpos monoclonales que reconocen un antígeno de superficie celular en las células que deben ser separadas son típicamente modificados adicionalmente para presentar un radical de biotina. La afinidad de la biotina por la avidina fija de ese modo de forma extraíble el anticuerpo monoclonal a la superficie de un lecho de relleno (véase Berenson, et al., J. Immunol. Meth., 91:11, 1986). El lecho de relleno se lava para eliminar el material no unido, y las células diana se liberan utilizando métodos convencionales. Las columnas de inmunofinidad del tipo antes descrito que utilizan anticuerpos monoclonales anti-CD34 biotinilados fijado a un lecho de relleno recubierto de avidina se describen, por ejemplo, en el documento WO 93/08268.

Un medio alternativo de selección de las células madre quiescentes es inducir la muerte celular en los tipos celulares, de linaje más comprometido, en división utilizando un antimetabolito tal como 5-fluorouracilo (5-FU) o un agente alquilante, tal como 4-hidroxíciclofosfamida (4-HC). Las células no quiescentes son estimuladas para que proliferen y se diferencien mediante la adición de factores de crecimiento que tienen poco o ningún efecto sobre las células madre, haciendo que las células que no son células madre proliferen y se diferencien y haciéndolas más vulnerables a los efectos citotóxicos de 5-FU o 4-HC. Véase Berardi et al., Science, 267:104 (1995), que se incorpora a la presente memoria como referencia.

Las células madre aisladas pueden ser congeladas en un congelador de velocidad controlada (p. ej., Cryo-Med, Mt. Clemens, Mich.), a continuación se almacenan en la fase de vapor de nitrógeno líquido utilizando dimetilsulfóxido como crioprotector. Se puede utilizar una variedad de medios de crecimiento y cultivo para el crecimiento y cultivo de células dendríticas (frescas o congeladas), incluyendo medios empobrecidos en suero o basados en suero. Los medios de crecimiento útiles incluyen RPMI, TC 199, medio de Dulbecco modificado por Iscove (Iscove, et al., F. J. Exp. Med., 147: 923 (1978)), DMEM, de Fischer, medio alfa, NCTC, F-10, L-15 de Leibovitz, MEM y de McCoy. Los nutrientes concretos presentes en los medios incluyen albúmina sérica, transferrina, lípidos, colesterol, un agente reductor tal como 2-mercaptoetanol o monotioglicerol, piruvato, butirato y un glucocorticoide tal como 2-hemisuccinato de hidrocortisona. Más concretamente, los medios convencionales incluyen una fuente de energía, vitaminas u otros compuestos orgánicos de soporte celular, un tampón tal como HEPES o Tris, que actúa para estabilizar el pH de los medios, y diversas sales inorgánicas. Una variedad de medios de cultivo celular libres de suero se describe en el documento WO 95/00632, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Las células CD34⁺ recogidas se cultivan con las citoquinas adecuadas, por ejemplo, como se describe en la presente memoria. A continuación se permite que las células CD34⁺ se diferencien y se asignen a células del linaje dendrítico. Estas células se purifican adicionalmente mediante citometría de flujo o medios similares, utilizando marcadores característicos de las células dendríticas, tales como CD1a, HLA DR, CD80 y/o CD86. Las células dendríticas cultivadas se exponen a un antígeno, por ejemplo, una molécula de HLA de clase I alogénica, permitida para procesar el antígeno, y después se cultivaron con una cantidad de una proteína de unión a CD40 para activar la célula dendrítica. Alternativamente, las células dendríticas son transfectadas con un gen que codifica una molécula de clase I de HLA alogénica o receptores inmunológicos relacionados, y a continuación se cultivan con una cantidad de una proteína de unión a CD40 para activar las células dendríticas presentadoras de antígeno.

Las células dendríticas que portan antígeno activadas son administradas a continuación a un sujeto con el fin de estimular una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Las células dendríticas se pueden administrar antes de, simultáneamente a, o después de, la administración del antígeno. Alternativamente, las células T se pueden recoger del sujeto y exponer a las células dendríticas que portan antígeno, activadas *in vitro* para estimular las células T específicas de antígeno, que se administran al sujeto.

Citoquinas útiles

Varias citoquinas serán de utilidad en el cultivo *ex vivo* de células dendríticas. Flt3-L se refiere a un género de polipéptidos que se describen en el documento EP 0627487 A2 y en WO 94/28391, ambos incorporados a este documento como referencia. Un ADNc de flt3-L humano se depositó en la Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, Md., EE.UU. (ATCC) el 6 de agosto de 1993, y se le asignó el número de acceso ATCC 69382. La IL-3 se refiere a un género de polipéptidos de interleuquina 3 como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.108.910, Incorporada a la presente memoria como referencia. Una secuencia de ADN que codifica la proteína IL-3 humana adecuada para su uso en la invención está disponible al público de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) bajo el número de acceso ATCC 67747. El ligando c-kit también se conoce como Factor de Crecimiento de Mastocitos (MGF), Factor Steel o Factor de Células Madre (SCF), y se describe en el documento EP 423.980, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Otras citoquinas útiles incluyen interleuquina-4 (IL-4; Mosley et al., Cell 59:335 (1989), Idzerda et al., J. Exp. Med. 171:861 (1990) y Galizzi et al., Intl. Immunol. 2:669 (1990), cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; descrito en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.108.910 y 5.229.496 cada uno de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia). El GM-CSF disponible comercialmente (sargramostim, Leukine™) es obtenible de Immunex Corp., Seattle, Wash.). Por otra parte, las proteínas de fusión GM-CSF/IL-3 (es decir, una fusión C-terminal a N-terminal de GM-CSF e IL-3) también será útil en el cultivo *ex vivo* de la células dendríticas. Tales proteínas de fusión se conocen y se describen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.199.942, 5.108.910 y 5.073.627, Cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria como referencia. Una proteína de fusión preferida es PIXY321 como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.199.942.

Las citoquinas útiles actúan uniéndose a un receptor presente en la superficie de una célula dendrítica y transduciendo una señal. Por otra parte, se pueden preparar proteínas de unión adicionales como se describe en la presente memoria para las proteínas de unión a CD40, que se unen a receptores de citoquinas apropiados y transducen una señal a una célula dendrítica. Por ejemplo, el documento WO 95/27062 describe anticuerpos agonísticos para Flt-3, el receptor de Flt-3L, a partir del cual se pueden preparar varias proteínas de unión a Flt-3. Las citoquinas útiles adicionales incluyen análogos biológicamente activos de las citoquinas que son útiles para el cultivo de células dendríticas. Los análogos de citoquinas útiles tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la de la citoquina nativa, y son biológicamente activos capaces de unirse a su receptor específico y de transducir una señal biológica. Tales análogos se pueden preparar y someter a ensayo por medio de métodos que son conocidos en la técnica.

Un método alternativo para la preparación de células dendríticas que presentan antígenos es para transfectar las células dendríticas con un gen que codifica un antígeno o un polipéptido específico derivado de la misma. Una vez que las células dendríticas expresan el antígeno en el contexto del MHC, las células dendríticas se activan con una proteína de unión a CD40, y se administran posteriormente al sujeto para proporcionar una respuesta inmunitaria más fuerte y mejorada al antígeno.

Las células dendríticas presentadoras de antígeno activadas también se pueden usar como un coadyuvante de vacuna y se pueden administrar antes de, simultáneamente a o posteriormente a la administración del antígeno. Además, las células dendríticas se pueden administrar al sujeto antes de, simultáneamente a o posteriormente a la administración de citoquinas que modulan una respuesta inmunitaria, por ejemplo una proteína de unión a CD40 (es decir, CD40L soluble), o una molécula de CD83 soluble. Las citoquinas útiles adicionales incluyen, pero no se limitan a, interleuquinas (IL) 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 12 y 15, factores estimulantes de colonias (CSF), tales como GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o proteínas de fusión GM-CSF/IL-3, u otras citoquinas tales como TNF- α o ligando c-kit. Por otra parte, los derivados biológicamente activos de estas citoquinas; y también serán útiles sus combinaciones.

CD40 es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF)/factor de crecimiento nervioso (NGF), que se define por la presencia de motivos ricos en cisteína en la región extracelular (Smith et al., Science 248:1019, 1990; Mallett y Barclay, Immunology Today 12: 220; 1991). Esta familia incluye el antígeno linfocitario CD27, CD30 (un antígeno encontrado en el linfoma de Hodgkin y células de Reed-Stemberg), dos receptores para TNF, una proteína murina referida como 4-1BB, antígeno OX40 de rata, receptor de NGF, y antígeno Fas. El antígeno CD40 humano (CD40) es un péptido de 277 aminoácidos que tiene un peso molecular de 30.600 (Stamenkovic et al., EMBO J. 8:1403, 1989). Se cree que CD40L es importante en la regulación de la retroalimentación de una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, una célula presentadora de antígeno CD40⁺ presentará el antígeno a una célula T, que a continuación se activará y expresará CD40L. A su vez, CD40L, activará adicionalmente la célula presentadora de antígeno, aumentando de su eficacia en la presentación de antígenos, y regulando al alza la expresión del MHC de Clase I y de Clase II, moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, así como diversas citoquinas (Caux et al., J. Exp. Med. 180:1263, 1994).

Las células dendríticas purificadas se pulsaron a continuación con (se expusieron al) antígeno, para permitir que

- 5 tomen el antígeno de una manera adecuada para su presentación a otras células del sistema inmunológico. Los antígenos se procesan y se presentan clásicamente a través de dos vías. Los péptidos derivados de proteínas en el compartimento citosólico se presentan en el contexto de moléculas de MHC de Clase I, mientras que los péptidos derivados de proteínas que se encuentran en la vía endocítica se presentan en el contexto del MHC de Clase II. Sin embargo, los expertos en la técnica reconocerán que hay excepciones; por ejemplo, la respuesta de las células T específicas de tumor CD8⁺, que reconocen antígenos tumorales exógenos expresados en el MHC de Clase I. Una revisión del procesamiento de antígenos y la presentación de péptidos dependientes del MHC se encuentra en Germain, R. N., Cell 76:287 (1994).
- 10 Se conocen numerosos procedimientos de pulsación de células dendríticas con antígeno; los expertos en la técnica contemplan el desarrollo de métodos adecuados para un antígeno seleccionado como experimentación de rutina. En general, se añade el antígeno a las células dendríticas cultivadas en condiciones que promueven la viabilidad de las células, y después se deja tiempo suficiente para que las células absorban y procesen el antígeno, y expresen péptidos antigénicos en la superficie celular en asociación con el MHC de Clase I o Clase II, un período de aproximadamente 24 horas (de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 horas, preferiblemente 24 horas). Las células dendríticas también pueden estar expuestas a antígeno mediante la transfección con ADN que codifica el antígeno. El ADN se expresa, y el antígeno se procesa supuestamente a través de la vía citosólica/Clase I.
- 15 La presente descripción proporciona métodos de utilización de composiciones terapéuticas que comprenden, células dendríticas pulsadas con antígeno activados. También se contempla el uso de tales células junto con receptores solubles de citoquinas o citoquinas, u otras moléculas inmunorreguladoras. Las composiciones se administran para estimular una respuesta inmunitaria alogénica, y se pueden administrar por inyección de bolo, infusión continua, liberación sostenida a partir de implantes, u otra técnica adecuada. Típicamente, las células serán administrados en forma de una composición que comprende las células dendríticas activadas, pulsadas con antígeno junto con portadores, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Tales portadores serán no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son ejemplos de diluyentes apropiados.
- 20 Para su uso en la estimulación de un determinado tipo de respuesta inmunitaria, también se contempla la administración de otras citoquinas además de, las células dendríticas pulsadas con antígeno activadas. Varias citoquinas útiles (o factores reguladores peptídicos) son comentadas por Schrader, J. W. (Mol Immunol 28:295; 1991). Tales factores incluyen (solos o combinados) interleuquinas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 12 y 15; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos; una proteína de fusión que comprende interleuquina-3 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; interferón- γ , TNF, TGG- β , ligando flt-3 y derivados biológicamente activos de los mismos. Una citoquina particularmente preferida es el ligando CD40 (CD40L). Otras citoquinas también serán útiles, como se describe en la presente memoria. El ADN que codifica tales citoquinas también será útil en los métodos de la invención, por ejemplo, mediante la transfección de las células dendríticas para expresar las citoquinas. La administración de estas moléculas inmunomoduladoras incluye la administración simultánea, separada o secuencial con las células de la presente invención.
- 30 La descripción proporciona un polipéptido identificado por uno cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 19 que tiene una identidad de secuencia con una cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19 de al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente, 25%, incluso más preferiblemente de aproximadamente 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 99,9%. Las células dendríticas pueden ser pulsadas con cualquiera de estos polipéptidos durante el cultivo *ex vivo*.
- 35 En un aspecto de la invención, el polipéptido comprende el SEQ ID NO: 19. Preferiblemente, el polipéptido se une a moléculas de HLA con una alta avidéz y tiene una constante de asociación (K_a) superior para HLA que un polipéptido nativo y/o una constante de disociación (K_d) inferior para HLA de un polipéptido nativo.
- 40 En otro aspecto de la descripción, el polipéptido deriva de un antígeno tumoral de mucina, preferiblemente, el polipéptido deriva de un número no variable de la región de repeticiones en tándem de MUC-1. En otro aspecto de la invención, la presentación de antígeno, por las células presentadoras de antígeno de los polipéptidos induce una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria celular. Por ejemplo, la respuesta inmunitaria celular es una respuesta citotóxica de las células T, una respuesta de células T auxiliares, o una respuesta inmunitaria de células B.
- 45 En otra descripción, las variantes de la molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos identificados por el SEQ ID NO: 1 a 19 se pueden utilizar para transducir las células inmunitarias para la detección y lisis de, por ejemplo, cánceres positivos para MUC-1. Un "alelo" o "variante" es una forma alternativa de un gen. Son de particular utilidad en la descripción las variantes de los genes que codifican marcadores de células tumorales potenciales MUC-1⁺ cualesquiera identificados por medio de los métodos de esta descripción. Las variantes pueden ser el resultado de al menos una mutación en la secuencia de ácido nucleico y pueden dar como resultado ARNm
- 60

alterados o polipéptidos cuya estructura o función pueden ser alterados o no. Cualquier gen natural o recombinante dado puede no tener ninguna, o tener una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede ocurrir solo o combinado con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Las composiciones y métodos de la presente descripción también abarcan variantes de los polipéptidos anteriores y secuencias de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos. Una "variante" de polipéptido según se utiliza en la presente memoria, es un polipéptido que difiere del polipéptido nativo en sustituciones y/o modificaciones, de manera que las propiedades antigénicas y/o inmunogénicas del polipéptido se mantienen. Tales variantes se pueden identificar generalmente modificando una de las secuencias de polipéptidos anteriores y evaluando la reactividad del polipéptido modificado con antisueros y/o células T como se ha descrito anteriormente. Las variantes de ácidos nucleicos pueden contener una o más sustituciones, deleciones, inserciones y/o modificaciones de tal manera que se conserven las propiedades antigénicas y/o inmunogénicas del polipéptido codificado. Una variante preferida de los polipéptidos descritos en la presente memoria es una variante que contiene sustituciones, deleciones, inserciones y/o modificaciones de nucleótidos en no más de 20% de las posiciones de los nucleótidos.

Preferiblemente, pero sin limitarse a, una variante contiene sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es una en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permaneciera sustancialmente sin cambios. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservativos: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Sin embargo, cualquier tipo de sustitución está dentro del alcance y las realizaciones de la descripción.

Las variantes pueden también (o alternativamente) ser modificadas mediante, por ejemplo, la deleción o adición de aminoácidos que tienen influencia mínima sobre las propiedades inmunogénicas o antigénicas, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido puede ser conjugado con una secuencia señal (o líder) en el extremo N-terminal de la proteína que co-traduccionalmente o post-traduccionalmente dirige la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede ser conjugado con un conector u otra secuencia por facilidad de síntesis, purificación o identificación del polipéptido (p. ej., poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de inmunoglobulina.

En general, las secuencias de nucleótidos que codifican todo o una porción de los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden preparar utilizando cualquiera de varias técnicas. Por ejemplo, las moléculas de ADNc que codifican tales polipéptidos se pueden clonar, basándose en la expresión específica del tumor MUC-1 de los ARNm correspondientes, utilizando PCR de visualización diferencial. Esta técnica compara los productos amplificados a partir de molde de ARN preparado a partir de tejido tumoral normal y positivo para MUC-1. El ADNc se puede preparar por transcripción inversa del ARN utilizando un cebador al azar, tal como, por ejemplo, cebador (dT)₁₂ AG. Después de la amplificación del ADNc utilizando un cebador al azar, se puede cortar una banda correspondiente a un producto amplificado específico para el ARN del tumor de un gel teñido con plata y subclonar en un vector adecuado, tal como el vector de adenovirus descrito en los ejemplos siguientes. Las secuencias de nucleótidos que codifican todo o una porción de los polipéptidos específicos de tumores MUC-1 descritos por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 6 y variantes de los mismos pueden ser amplificados a partir de ADNc preparado como se ha descrito anteriormente utilizando los cebadores al azar.

Alternativamente, un gen que codifica un polipéptido como se describe en la presente memoria (o una porción del mismo) puede ser amplificado a partir de ADN genómico humano, o a partir de ADNc de células tumorales, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

En una realización de la descripción la presencia de la una o más moléculas de ácido nucleico se correlaciona con una muestra de un sujeto normal. La muestra se obtiene preferiblemente de un mamífero sospechoso de tener un trastorno del crecimiento celular proliferativo, en particular, un cáncer MUC-1⁺.

El porcentaje de identidad y similitud entre dos secuencias (ácidos nucleicos o polipéptidos) se puede determinar utilizando un algoritmo matemático (véase, por ejemplo, Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed, Academic Press, Nueva York, 1993.; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

En otra realización preferida, los fragmentos de péptidos MUC-1 y derivados de la invención son de una longitud suficiente de tal manera que activan el sistema inmunitario dando como resultado la lisis de las células cancerosas, tales como, por ejemplo las células que expresan MUC-1. Las moléculas de ácido nucleico MUC-1, fragmentos y derivados que codifica cualquiera de los polipéptidos identificados por los SEQ ID NO: 1 a 19, por lo tanto comprenden preferiblemente al menos aproximadamente 90% de nucleótidos en comparación con la secuencia identificada por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, por lo general al menos aproximadamente 80% de nucleótidos en comparación con la secuencia identificada por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, más usualmente al menos aproximadamente 70% de nucleótidos en comparación con la secuencia identificada por cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 19, incluso más típicamente al menos aproximadamente 40% o 50% de nucleótidos.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con propósitos de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden no tomarse en consideración a efectos de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con propósitos de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80%, o 90% de la longitud de la secuencia de referencia. Los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, en ese caso las moléculas son idénticas en esa posición (según se utiliza en la presente memoria "identidad" de ácido nucleico es equivalente a "identidad de secuencia" de ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se deben introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete de soporte lógico GCG (disponible en línea a través de Genetics Computer Group), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70, o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un ejemplo preferido, no limitante de parámetros que se deben utilizar junto con el programa GAP incluye una matriz de puntuación Blosum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4, y una penalización de hueco por desplazamiento de marco de 5.

En otra realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Meyers y Miller (Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0 o versión 2.0U), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

El tratamiento de la enfermedad neoplásica o células neoplásicas, se refiere a una cantidad de los vectores y/o péptidos, descritos en toda la memoria descriptiva y en los Ejemplos que siguen, capaz de invocar uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en cierta medida, del crecimiento del tumor, incluyendo, (i) reducción de la velocidad y (ii) detención completa del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) mantenimiento del tamaño del tumor; (4) reducción del tamaño del tumor; (5) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de la infiltración de células tumorales a órganos periféricos; (6) inhibición, incluyendo (i) reducción, (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de la metástasis; (7) mejora de la respuesta inmunitaria anti-tumoral, que puede dar como resultado (i) mantenimiento del tamaño del tumor, (ii) reducción del tamaño del tumor, (iii) ralentización del crecimiento del tumor, (iv) reducción, ralentización o prevención de la invasión o (v) reducción, ralentización o prevención de metástasis; y/o (8) alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con el trastorno.

Así, en un aspecto de la descripción, se puede utilizar cualquier variante, fragmento, mutante para transducir las células inmunitarias, tales como por ejemplo células dendríticas, para el tratamiento de un sujeto que sufre, o, de forma profiláctica a un sujeto susceptible al cáncer. Como se comentó anteriormente, un uso preferido de secuencias de ácido nucleico identificadas en la presente invención, es para la generación de los tratamientos que lisan por ejemplo, células cancerosas MUC-1. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser expresadas por un vector que contiene un segmento de ADN que codifica los alelos, variantes, mutaciones o fragmentos de los genes de tipo salvaje. Las mutaciones y alelos de las moléculas de ácidos nucleicos también se utilizan preferiblemente en la construcción de un vector para su uso en el tratamiento. El vector que comprende la secuencia de ácido nucleico deseada para conferir resistencia a, por ejemplo, cáncer positivo para MUC-1, preferiblemente tiene al menos tal secuencia de ácido nucleico. Alternativamente, el vector puede estar compuesto por más de una secuencia de ácido nucleico, o combinaciones de variantes alélicas. El vector también puede estar compuesto de cassettes de diferentes variantes alélicas o moléculas de ácido nucleico de tipo natural.

De acuerdo con la presente invención puede emplearse biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (en la presente memoria "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

La introducción de los genes, fragmentos o alelos de los mismos, en un sujeto puede incluir el uso de vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por coadyuvante, pistola de genes, catéteres, etc. Los vectores incluyen productos conjugados químicos como se describe en el documento WO 93/04701, que tiene un radical de direccionamiento (p. ej., un ligando para un receptor de superficie celular), y un radical de unión a ácido nucleico (p. ej., polilisina), vector viral (p. ej., un ADN o un vector viral de ARN), proteínas de fusión como las descritas en el documento PCT/US95/02140 (documento WO 95/22618) que son proteínas de fusión que contienen un radical diana (p. ej. un anticuerpo específico para una célula diana) y un radical de unión a ácidos nucleicos (p. ej., una protamina), plásmidos, fagos, etc. Los vectores pueden ser cromosómico, no cromosómico o sintéticos.

En otra realización preferida, las células son células aisladas y purificadas a partir de una muestra, sujeto o sujeto donante y se utilizan en análisis funcionales para determinar las propiedades de las células. Dependiendo de la población celular aislada y purificada, se pueden llevar a cabo análisis funcionales apropiados conocidos en la técnica. Por ejemplo, si la población de células son células T específicas para un antígeno deseado como un antígeno tumoral, se pueden llevar a cabo análisis de células T citotóxicas, análisis de proliferación de células T, perfiles de citoquinas, determinación de antígenos de superficie para determinar células T maduras o células T de memoria, etc.

El aislamiento de células útiles en la presente invención es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto y se pueden aislar por centrifugación en gradiente de densidad, por ejemplo, con Ficoll/Hypaque. Se pueden empobrecer o enriquecer poblaciones de células específicas utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden aislar monocitos/macrófagos mediante adherencia sobre plástico. Se pueden empobrecer o enriquecer células T o células B, por ejemplo, mediante selección positiva y/o negativa utilizando anticuerpos frente a marcadores de superficie de células T o células B, por ejemplo mediante la incubación de las células con un anticuerpo monoclonal (mAb) primario específico, seguido de aislamiento de las células que se unen al mAb utilizando esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo secundario que se une al mAb primario. Las células madre hematopoyéticas derivadas de sangre periférica o de médula ósea pueden ser aisladas por medio de técnicas similares utilizando mAb específicos de células madre (por ejemplo, mAbs anti-CD34). También se pueden aislar poblaciones de células específicas mediante clasificación celular activada por fluorescencia de acuerdo con métodos convencionales. Los anticuerpos monoclonales para marcadores superficiales específicos de células son conocidos en la técnica y muchos están disponibles comercialmente.

Si se desea, puede retirarse una gran proporción de células diferenciadas terminalmente utilizando inicialmente una separación "relativamente rudimentaria". Por ejemplo, se pueden utilizar inicialmente separaciones con esferas magnéticas para eliminar un gran número de células de linaje comprometido. Deseablemente, se puede retirar al menos aproximadamente 80%, usualmente al menos 70% de las células hematopoyéticas totales.

Los procedimientos para la separación pueden incluir, pero no se limitan a, separación magnética, utilizando esferas magnéticas recubiertas de anticuerpo, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o usados en junto con un anticuerpo monoclonal, incluyendo, pero no limitado a, complemento y citotoxinas, y "inmunoprecipitación" con anticuerpo unido a una matriz sólida, p. ej., placa, elutriación o cualquier otra técnica conveniente.

Los procedimientos para la detección pueden incluir, métodos de escrutinio de moléculas para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1. Los métodos pueden incluir:

- alterar un ácido nucleico que codifica una porción del número no variable de repeticiones en tándem de MUC-1;
- expresar el ácido nucleico modificado para producir una molécula;
- poner en contacto una célula dendrítica con la molécula; y
- poner en contacto una célula T con la célula dendrítica,

en donde una modulación de la producción de IFN- γ de la célula T indica que la molécula puede generar una respuesta inmunitaria.

5 Las técnicas que proporcionan una separación exacta incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo, que puede tener diferentes grados de sofisticación, p. ej., una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de bajo ángulo y obtuso, canales de impedancia, etc.

10 El péptido de acuerdo con la invención puede ser codificado por las secuencias correspondientes que aparecen en la presente memoria, pero también puede ser codificado por codones degenerados, incluyendo:

Aminoácido	Código
A	GCT, GCC, GCA, GCG
R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
N	AAT, AAC
D	GAT, GAC
C	TGT, TGC
G	GGT, GGC, GGA, GGG
Q	CAA, CAG
E	GAA, GAG
H	CAT, CAC
I	ATC, ATT, ATA
L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG
K	AAA, AAG
M	ATG
F	TTT, TTC
P	CCT, CCC, CCA, CCG
S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
T	ACT, ACC, ACA, ACG
W	TGG
Y	TAT, TAC
V	GTT, GTC, GTA, GTG

La invención se ha descrito en detalle con referencia a realizaciones preferidas de la misma.

15 Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos
Cultivos celulares.

5 La línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 (positivo para HLA-A2 y positivo para MUC-1), y SK-Mel-24 (positivo para HLA-A2, negativo para MUC-1) se adquirieron de la Colección de Cultivos Tipo Americana (Manassas, VA). Los cultivos estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio completo [medio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) con un suplemento de suero fetal bovino al 10%, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen Life Technologies, Inc.)]. La línea celular C1R es una línea celular de leucemia plasmática humana que no expresa antígenos HLA-A o B endógenos. Las células C1R-A2 son células C1R que expresan un clon genómico transfectado de HLA-A2.1. Estas células se obtuvieron del Dr. William E. Biddison (Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, NIH, Bethesda, MD). El mutante por delección de transporte (T2) de la línea celular 174CEM-T2 fue proporcionado por el Dr. Peter Cresswell (Escuela de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT). Las células C1R-A2 y las células T2 estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio RPMI 1640 completo y en medio completo de Dulbecco modificado por Iscove (Invitrogen Life Technologies), respectivamente.

Péptidos.

20 La secuencia de aminoácidos de MUC-1 se exploró en busca de coincidencias con motivos consenso para péptidos de unión a HLA-A2. Se utilizó el algoritmo de la computadora de Bioinformatics and Molecule Analysis Section of NIH (BIMAS) que fue desarrollado por Parker KC et al., (J. Immunol., 152: 163-175, 1994), que clasifica los posibles péptidos de unión al MHC de acuerdo con la disociación en la mitad de tiempo predictiva de los complejos de péptido/MHC. Los alelos HLA-A2 se eligieron puesto que son los alelos de Clase I expresados más comúnmente. 25 Los péptidos decaméricos del número no variable de la secuencia de repetición en tándem se sintetizaron si se ajustaban al respectivo motivo consenso. Un panel de péptidos MUC-1 decaméricos (Tabla 1) y análogos con sustitución de un solo aminoácido en las posiciones P1 a P10 del péptido P-92 MUC-1 (véase la Figura 1) fue preparado por American Peptide Company (Sunnyvale, CA) con una pureza >90%. Además, un péptido CEA CAP1-6D (28) puro en >96% fue preparado por American Peptide Company (Sunnyvale, CA).

30 Análisis por citometría de flujo

(i) Análisis por citometría de flujo de un solo color.

35 El método para el análisis por citometría de flujo de un solo color se ha descrito previamente (Gaudagni F. et al. Cancer Res.:50: 6248-6255, 1990). Brevemente, las células se lavaron tres veces con DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} frío y a continuación se tiñeron durante 1 hora a 4°C utilizando 1 µg de mAb contra HLA-A2 (A2, 28, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA), CD3, CD4, CD8, y CD56 (BD Biosciences, San Jose, CA). Se utilizó plasmocitoma-104E por aceite mineral (Cappel/Organon Teknika Corp., West Chester, PA) como control de isotipo. A continuación, las células se lavaron tres veces y se incubaron con una dilución 1:100 de inmunoglobulina de cabra anti-ratón (IgG) marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Las células se analizaron inmediatamente utilizando un FACScan Becton Dickinson equipado con un láser azul con una excitación de 15 nW a 488 nm. Los datos se obtuvieron a partir de 10.000 células vivas, se almacenaron y se utilizaron para generar los resultados.

45 (ii) Análisis por citometría de flujo de dos colores.

50 El procedimiento para el análisis por citometría de flujo de dos colores fue similar al del análisis de un solo color con las siguientes excepciones. Para el análisis de las células dendríticas se utilizaron Anti-MHC de Clase II FITC/anti-CD11c PE, anti-MHC de Clase II FITC/anti-CD80 PE, anti-CD58 FITC/anti-CD54 PE, anti-MHC de Clase I FITC/anti-MHC de Clase II PE, y anti-IgG1 FITC/anti-IgG2a PE (controles de isotipo); >96% de las células dendríticas fueron positivas para CD11c y MHC de Clase II.

55 Los anticuerpos utilizados para el análisis de líneas de células T fueron anti-CD56 FITC/anti-CD8 PE, anti-CD4 FITC/anti-CD8 PE y anti-CD45RO-FITC/anti-CD49d PE; >98% de las células T-1191-P92 y T-1191-P-93L fueron positivas para CD8. Los anticuerpos contra CD4, CD8, CD28, CD45RO, CD56, CD49d, CD54, CD80, CD86, CD58 y CD11c se adquirieron de BD Biosciences. Los anticuerpos contra MHC de Clase I y MHC de Clase II se adquirieron de Serotec, Oxford, Reino Unido. La tinción se realizó simultáneamente durante 1 h, después de lo cual las células se lavaron tres veces, se resuspendieron como antes, y se analizaron inmediatamente utilizando un FACScan Becton Dickinson equipado con un láser azul con una excitación de 15 mW a 488 nm con el uso del programa CELLQuest.

60

Los resultados se expresaron en % de células positivas e intensidad media de fluorescencia (IMF). La IMF se utilizó para expresar los niveles de fluorescencia determinados midiendo el promedio para todas las células en el gráfico de puntos de fluorescencia en ventanas de análisis. El valor de IMF se recogió en la escala logarítmica en el citómetro.

5 Péptido de unión a HLA-A2.

La unión de P-92 y análogos de P-92 a las moléculas de HLA-A2 se evaluó mediante la unión a las células T2A2 como se demuestra por citometría de flujo. En este análisis, el aumento de la estabilidad (acumulación) de las moléculas de HLA-A2 en la superficie de células T2 como consecuencia de la unión del péptido se mide por medio del aumento de la unión del anticuerpo dirigido contra la molécula fr HLA-A2. En pocas palabras, se incubaron 1 x 10⁶ células en medio completo de Dulbecco modificado por Iscove libre de suero con péptidos a una concentración de 50 µg/ml en placas de cultivo de 24 pocillos a 37°C en 5% de CO₂. La citometría de flujo para determinar la unión del péptido se llevó a cabo utilizando células T2 y análisis de un solo color. Después de lavar las células tres veces en DPBS, como se describió anteriormente, se incubaron durante 1 h con una dilución 1:100 de MAb específico de HLA-A2 (One Lambda, Inc.) por cada 10⁶ células. Se utilizó UPC-10 (Cappel/Organon Teknika) como control de isotipo. Las células se lavaron a continuación tres veces y se incubaron con una dilución 1:100 de anti-IgG de ratón marcado con FITC (BD Biosciences). El análisis se llevó a cabo con el FACScan, como se ha descrito anteriormente. Las células se mantuvieron en hielo durante toda la preparación y tinción de las células.

20 Cultivo de DC a partir de PBMC.

Se obtuvieron PBMC de donantes normales de HLA-A2 a partir de sangre heparinizada. Las PBMC se separaron utilizando gradiente de medio de separación de linfocitos (Organon Teknika, Durham, NC), como se ha descrito anteriormente (Boyum, A. Scand J. Clin. Lab. Invest. 97 (Suppl): 51 a 76, 1968). Las DC se prepararon utilizando una modificación del procedimiento descrito por Sallusto et al. (J. Exp. Med., 179: 1109-1118, 1994). Las PBMC (1,5 x 10⁸) se resuspendieron en medio AIM-V que contenía glutamina 2 mM, 50 µg/ml de estreptomycin y 10 µg/ml de gentamicina (Invitrogen Life Technologies, Inc.), y se permitió que se adhirieran a un matraz T-150 (Corning Costar Corp., Cambridge, MA). Después de 2 h a 37°C, las células no adherentes se eliminaron con un enjuague suave. Las células adherentes se cultivaron durante 6-7 días en medio AIM-V que contenía 100 ng/ml de GM-CSF humano recombinante (rhGM-CSF) y 20 ng/ml de IL-4 humana recombinante (rhIL-4). El medio de cultivo se repuso cada 3 días.

Virus recombinante e infección de las DC con el virus de la viruela aviar que contiene MUC-1 (rF-MUC-1/TRICOM).

35 El virus de la viruela aviar recombinante se construyó tal como describen Jenkins S., et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 7: 991-998, 1991. Se utilizó un producto aislado purificado en placa de la cepa de la vacuna POXVAC-TC del virus de la viruela aviar como virus parental para este virus recombinante. Las secuencias MUC-1, LFA-3, ICAM-1, y B7-1 se insertaron en la región J *Bam*HI, del genoma del virus de la viruela aviar. Además, se incluyó el gen *lacZ*, bajo el control del promotor C1 de la viruela aviar, para identificar y aislar los virus recombinantes utilizando un ensayo cromogénico para la β-galactosidasa. El gen MUC-1 que se insertó en el virus de la viruela aviar varía del gen nativo MUC-1. Se codifica una secuencia señal de 30 aminoácidos, seguida de los primeros 38 aminoácidos de la secuencia N-terminal madura de la proteína MUC-1, 10 copias idénticas de la secuencia repetida de 20 aminoácidos, y la porción C-terminal de la proteína. La secuencia repetida de 600 pb fue producida utilizando oligonucleótidos sintéticos solapantes que contenían codones con numerosas variaciones de la tercera base de cada secuencia de repetición sin cambiar los aminoácidos codificados. Esto se hizo para reducir al mínimo la duplicación de secuencias de nucleótidos, que son inestables en virus de la viruela, a la vez que se mantenían las secuencias de aminoácidos repetidas.

50 rF-MUC-1/TRICOM es un virus de la viruela aviar recombinante que contiene el gen de MUC-1 bajo el control del promotor 40K, el gen de LFA-3 humano bajo el control del promotor 30K de Vaccinia, el gen ICAM-1 humano bajo el control del promotor de I3 de vaccinia, y el gen B7-1 humano bajo el control del promotor temprano/tardío sintético (sE/L). Las células dendríticas (DC) (1 x 10⁶) se incubaron en 1 ml de medio Opti-MEM (Life Technologies, Inc.) a 37°C con rF-MUC-1/TRICOM o vector de avipoxvirus (FP-WT). Los experimentos de titulación demostraron que 4 x 10⁷ unidades formadoras de placa/ml, equivalentes a una MOI de 40:1 durante 2 h, fueron capaces de inducir la expresión del transgén de modo sistemático en aproximadamente el 75% de las DC infectadas. Las DC infectadas se suspendieron en 10 ml de medio completo RPMI-1640 de nueva aportación, tamplado que contenía 100 ng/ml de rhGM-CSF, 20 ng/ml de rhIL-4, y 20 ng/ml de TNF-α se cultivaron durante 24 h, y a continuación se utilizaron como APC.

60 Generación de líneas de células T.

La modificación del protocolo descrito por Tsang K.Y. et al., J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-990, 1995, se utilizó para

generar CTL específicos de MUC-1. Para generar las líneas de células T T-1191-P-93L y T-1191-P-92, se utilizaron como APC células dendríticas autólogas infectadas con rF-MUC-1/TRICOM. A continuación, se añadieron células no adherentes autólogas a las APC en un razón de efector a APC de 10:1. Los cultivos se incubaron a continuación durante 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Los cultivos se complementaron con IL-2 humana recombinante a una concentración de 20 unidades/ml durante 7 días; el medio que contenía IL-2 se repuso cada 3 días. La incubación de 3 días con el péptido y el suplemento de IL-2 de 7 días constituyó un ciclo de IVS. Los cultivos primarios se volvieron a estimular con DC autólogas infectadas con rF-MUC-1/TRICOM como se describió anteriormente el día 11 para empezar el siguiente ciclo de IVS. Las DC autólogas infectadas con RF-MUC 1/TRICOM se utilizaron como APC después de tres ciclos de IVS. Se utilizaron células B transformadas con EBV autólogas irradiadas (23.000 rads) como APC después del tercer ciclo de IVS. Para la reestimulación con células B transformadas con EBV, se utilizaron péptidos a una concentración de 50 mg/ml para pulsar las células B transformadas con EBV autólogas a una razón de efector a APC de 1:3 para la reestimulación. Los cultivos se incubaron a continuación durante 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Después de la eliminación del medio que contenía el péptido, los cultivos se complementaron con IL-2 humana recombinante a una concentración de 20 unidades/ml durante días. Se generaron líneas de células T de sujetos 18 y 23 (T-18-P-92, T-18-P-93L, T-23-P-92 y T-23-P-93L) mediante estimulación de PBMC con células dendríticas autólogas pulsadas con los péptidos P-92 o P-93L utilizando el mismo protocolo de estimulación que se ha descrito anteriormente. Los marcadores utilizados para el análisis e identificación de las DC fueron CD11c, MHC de Clase II, CD80, CD54, CD58 y CD83. También se utilizó CD3 como un marcador negativo.

20 Análisis citotóxico.

Las células diana (células C1R-A2 o tumorales) se marcaron con 50 µCi de oxiquinolina marcada con ¹¹¹indio (Medi-Physics Inc., Arlington, IL) durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron células diana (0,3 x 10⁴) en 100 µl de medio RPMI-1640 completo a cada uno de los 96 pocillos en placas de análisis de fondo plano (Corning Costar Corp.). Las células diana C1R-A2 marcadas se incubaron con péptidos a la concentración indicada durante 60 minutos a 37°C en 5% de CO₂ antes de añadir las células efectoras. No se utilizó péptido cuando se utilizaron líneas celulares de carcinoma como dianas. Las células efectoras se suspendieron en 100 µl de medio RPMI-1640 completo con un suplemento de suero AB humano agrupado al 10% y se añadieron a las células diana. Las placas se incubaron a continuación a 37°C en 5% de CO₂ durante 4 ó 16 h. Se recogió el sobrenadante para el recuento gamma mediante el uso de marcos cosechadores (Skatron, Inc., Sterling, VA). Las determinaciones se realizaron por triplicado, y se calcularon las desviaciones típicas. La lisis específica se calculó con el uso de la siguiente fórmula (todos los valores en cpm):

$$\% \text{ lisis} = \frac{\text{Liberación observada} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación total} - \text{Liberación espontánea}} \times 100$$

La liberación espontánea se determinó a partir de pocillos a los que se añadieron 100 µl de medio RPMI-1640 completo. La radiactividad liberable total se obtuvo después del tratamiento de dianas con Triton X-100 al 2,5%.

40 Detección de citoquinas.

Los sobrenadantes de las células T expuestas durante 24 h a las células B transformadas con EBV autólogas pulsadas con péptido, en medio libre de IL-2 a diversas concentraciones de péptidos, se escrutaron para determinar la secreción de IFN-γ utilizando un kit de ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN). Los resultados se expresaron en pg/ml. También se utilizó un sistema CBA (BD PharMingen, San Diego, CA) para determinar la secreción de varias citoquinas por células T específicas. El sistema de CBA utiliza la detección de fluorescencia por citometría de flujo para medir analitos solubles en un inmunoanálisis basado en partículas. El Kit CBA para citoquinas Th1/Th2 humanas de BD se utilizó para medir los niveles de proteínas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α en una sola muestra. Las perlas de captura de citoquinas se mezclaron con anticuerpos de detección conjugados con PE y después se incubaron con los patrones de citoquinas recombinantes o muestras de ensayo para formar complejos sándwich. Los resultados de la muestra se generaron en formato gráfico y tabular, utilizando soporte lógico de análisis BD PharMingen CBA. Los resultados se expresan en pg/ml.

55 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de las diferencias entre las medias se realizó mediante una prueba de la t pareada de dos colas (soporte lógico estadístico Stat View, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

60 Clasificación de Toxicidad - Escala de toxicidad común del NCI.

* Si se producen toxicidades de Grado I-II, el sujeto puede continuar con el programa de infusión.

* Si se produce toxicidad de Grado III, el "fármaco" se mantiene hasta que la toxicidad se reduce al Grado I o II, a continuación, se reanuda la infusión. Si se produce toxicidad de Grado III o IV después de la reanudación, se detienen las infusiones de "fármacos".

5 * Si se produce toxicidad de Grado IV, se registra que el sujeto tiene toxicidad de Grado IV y la siguiente infusión se reduce a la dosis previa. Si la dosis previa provoca toxicidad de Grado IV, se detiene el "farmaco".

10 * Si se produce toxicidad de Grado IV en 1 de 3 sujetos a un nivel de dosis específico, se introducen 3 sujetos adicionales en ese nivel de dosis celular para un total de 6 sujetos a ese nivel de dosis. Si 2 de 6 sujetos a un nivel de dosis celular desarrollan toxicidad de Grado IV, esta dosis se define como la MTD. A los siguientes 3 sujetos se les proporciona 66% (dos tercios) del nivel de dosis celular previo. A los efectos de la evaluación del aumento de dosis, cada sujeto al mismo nivel de dosis debe haber recibido por lo menos 4 de 6 infusiones.

Ejemplo 2

15 Nuevos motivos de unión a MUC-1

20 La secuencia de aminoácidos primaria de MUC-1 humana se analizó para determinar los motivos consenso para los nuevos péptidos de unión a HLA-A2. Se identificaron doce péptidos decaaméricos, por lo tanto se sintetizaron y se estudiaron para determinar la unión a la molécula HLA-A2 en un análisis de unión en células T2. Las secuencias de aminoácidos y las posiciones de estos péptidos decaaméricos se muestran en la Tabla 1. El péptido CEA CAP1-6D y un péptido NCA se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. La unión pronosticada de los 12 péptidos también se proporciona en la Tabla 1. Se demostró que tres de estos péptidos (P-92, P-94 y P-1108) tenían el nivel de unión más alto en el análisis T2.

25

Tabla 1. Unión de péptidos MUC-1 humanos a moléculas HLA-A2

Péptido	Posición de aminoácido en MUC-1	Secuencia	Unión a HLA-A2 *	Unión a T2#
P-92	92-101	ATWGQDVTSV (SEQ ID NO: 1)	POS	740
P-94	94-103	WGQDVTSVPV (SEQ ID NO: 8)	NEG	591
P-1108	1108-1117	REGTINVHDV (SEQ ID NO: 9)	NEG	482
P-4	4-13	GTQSPFFLL (SEQ ID NO: 10)	NEG	467
P-1105	1105-1114	LAFREGTINV (SEQ ID NO: 11)	NEG	461
P-1004	1004-1013	TLASHSTKTD (SEQ ID NO: 12)	NEG	442
P-1069	1069-1078	LQRDISEMFL (SEQ ID NO: 13)	NEG	433
P-1162	1162-1171	ALLVLVCVLV (SEQ ID NO: 3)	POS	431
P-1135	1135-1144	TISDVSVSDV (SEQ ID NO: 4)	POS	422
P-1172	1172-1181	ALAIVYLIAL (SEQ ID NO: 5)	POS	372
P-1169	1169-1178	VLVALAIVYL (SEQ ID NO: 6)	POS	369
P-1177	1177-1186	YLIALAVCQC (SEQ ID NO: 7)	POS	338
CAP1-6D	NA	YLSGADLNL (SEQ ID NO: 38)	POS	975
NCA	NA	YRPGENLNL (SEQ ID NO: 39)	NEG	365

* Unión pronosticada sobre la base de motivos referidos (37); POS = positivo; NEG = negativo. # Los resultados se expresan en fluorescencia relativa. CAP1-6D es un péptido de antígeno carcinoembrionario de unión a HLA-A2 que se utilizó como control positivo. El péptido NCA se utilizó como control negativo. NA = no aplicable.

Ejemplo 3

30 Establecimiento de líneas de células T específicas de MUC-1

A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si se podrían establecer líneas de células T específicas

- 5 de MUC-1 a partir de PBMC de un donante aparentemente sano. Para lograr esto, se utilizaron DC autólogas infectadas con rF-MUC-1/TRICOM como APC. rF-MUC-1/TRICOM es un vector de avipoxvirus de replicación defectuosa que contiene los transgenes de MUC-1 y de una tríada de moléculas co-estimuladoras humanas (B7-1, ICAM-1 y LFA-3, designada TRICOM). Se demostró que rF-MUC-1/TRICOM infectaba eficazmente DC humanas e hiperepresaba cada una de las moléculas co-estimuladoras, así como MUC-1, en la superficie de DC (Tabla 2). Aproximadamente el 96% de las células fueron positivas CD11c y MHC de Clase II.

Tabla 2. El análisis fenotípico de DC infectadas con rF-MUC-1/TRICOM

Células dendríticas infectadas con	CD80	CD54	CD58	Clase I	MUC-I
No infectadas	4,8 (13,6)	59,5 (62,3)	68,1 (18,2)	99,7 (271,8)	5,0 (95,7)
FP/WT	7,4 (13,3)	79,3 (83,4)	74,0 (19,5)	99,5 (176,3)	3,1 (50,7)
rF-MUC-1/TRICOM	30,9 (35,7)	84,5 (133,9)	79,8 (27,4)	99,9 (189,3)	31,6 (213,1)

Análisis de citometría de flujo de la expresión de marcadores de superficie sobre las DC. Las DC utilizadas se cultivaron en medio AIM-V que contenía 100 ng/ml de rhGM-CSF y 20 ng/ml de rhIL-4 durante 7 días. Las DC utilizadas para la infección con FP/WT o rF-MUC-1/TRICOM se cultivaron como se describe en "Materiales y Métodos". Los resultados indican el porcentaje de células positivas; los números entre paréntesis representan la IMF.

- 10 La especificidad de las células T específicas de MUC-1 generadas (denominadas T-1191-MUC-1) se analizó después del ciclo 3 de IVS (véanse Materiales y Métodos) para determinar su capacidad para liberar IFN- γ después de la estimulación con células B autólogas pulsadas con cada uno de los péptidos MUC-1 que se enumeran en la Tabla 1. Los resultados mostrados en la Tabla 3 demuestran que cuando las células T-1191-MUC-1 se estimularon con células B autólogas pulsadas con péptidos P-92, P-1135, P-94, P-1004, P-1069 y P-4, las células T produjeron IFN- γ , mientras que el uso de las células B autólogas pulsadas con los otros péptidos no dio lugar a la producción de IFN- γ . Los resultados mostrados en las Tablas 1 y 3 demuestran que el péptido P-92 tenía el nivel más alto de unión a T2, así como la capacidad de activar T-1191-MUC-1 en las células para producir los más altos niveles de IFN- γ ; este péptido se eligió por lo tanto para un estudio adicional.
- 15
- 20 Tabla 3. Producción de IFN- γ por células T-1191-MUC-1 estimuladas con células B autólogas pulsadas con péptidos MUC-1

Péptido	Producción de IFN- γ	
	(pg/ml)	
	Con péptido	Sin péptido
P-92	380,8	<52,3
P-1135	347,2	<52,3
P-94	323,6	<52,3
P-1004	305,6	<52,3
P-1069	288,0	<52,3
P-4	260,0	<52,3
P-1105	<52,3	<52,3
P-1108	<52,3	<52,3
P-1162	<52,3	<52,3
P-1169	<52,3	<52,3
P-1172	<52,3	<52,3
P-1177	<52,3	<52,3

Se utilizaron células T-1191-MUC-1 como efectores en IVS-3. Las células T se estimularon con células B transformadas con EBV autólogas irradiadas pulsadas con diferentes péptidos MUC-1 a una concentración de 25 μ g/ml, y una relación de efector a APC de 1:3. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas y se escrutaron para determinar la secreción de IFN- γ .

Ejemplo 4

Análisis de péptidos

El análisis de los residuos de aminoácidos de anclaje a HLA-A2 primarios y secundarios en las posiciones 2 y 10 del péptido P-92 reveló que la modificación de los aminoácidos en estas posiciones podría mejorar la capacidad de unión del péptido a la molécula HLA-A2. Por lo tanto, se sintetizaron seis diferentes análogos de P-92, como se muestra en la Tabla 4, y se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de unión a células T2 junto con el péptido nativo P-92. El CEA CAP-7 (péptido de unión a HLA-A3), que se ha demostrado previamente que no se une a HLA-A2, se utilizó como control negativo. Como se muestra en la Tabla 4, cuatro de los seis péptidos análogos se unieron a HLA-A2 a niveles más altos que el péptido P-92. Los análogos P-93L y P-93i se unieron a HLA-A2 con mayor eficacia.

Tabla 4. Análogos peptídicos de MUC-1

Secuencia de aminoácidos	Denominación inicial	Unión a T2*
ATWGQDVTSV (SEQ ID NO: 1)	P-92 (nativo)	510
AIWGQDVTSV (SEQ ID NO: 14)	I-93	823
ALWGQDVTSV (SEQ ID NO: 2)	L-93	821
ALWGQDVTSL (SEQ ID NO: 15)	L-93/L-101	736
AMWGQDVTSV (SEQ ID NO: 16)	M-93	723
AMWGQDVTSL (SEQ ID NO: 17)	M-93/L-101	325
AIWGQDVTSL (SEQ ID NO: 18)	I-93/L-101	280

Secuencias de aminoácidos del péptido P-92 parental (posiciones de aminoácidos 92 a 101 de MUC-1) y péptidos análogos. Los aminoácidos se muestran mediante el código de una sola letra. Los aminoácidos de sustitución se indican en negrita y cursiva.

*Los resultados se expresan en valores de fluorescencia relativa. El péptido HLA-A3 (unión a T2 = 200) se utilizó como un control negativo y CAP1-6D (unión T2 = 875) se utilizó como control positivo.

A continuación se llevaron a cabo experimentos para comparar la capacidad de los péptidos P-93L y P-93i de obligar a HLA-A2 a diversas concentraciones de péptidos. Como se observa en la Figura 1, los péptidos P-93L y P-93i se unieron a HLA-A2 a niveles superiores que P-92 a las diversas concentraciones de péptidos. Los niveles de unión fueron similares para P-93L y P-93i a las diferentes concentraciones de péptido. Por consiguiente, estos datos indicaron que tanto P-93L y P-93i con la modificación en la posición 2 de anclaje primario (posición 93 de la molécula de MUC-1) fueron agonistas potenciales de péptido P-92.

Ejemplo 5

Estabilidad del complejo de péptido-MHC.

Se examinó la estabilidad del complejo de péptido-MHC para los péptidos P-92 (nativo), P-93L y P-93i. Los péptidos se incubaron con células T2 durante la noche, los péptidos no unidos se separaron mediante lavado y después se incubaron con brefeldin-A para bloquear el suministro de nuevas moléculas de Clase I a la superficie celular; en diversos puntos horarios las células se analizaron para determinar la presencia de complejos de péptido-HLA-A2. Como se muestra en la Figura 2, los complejos de P-93L-HLA-A2 y P-93i-HLA-A2 fueron más estables que los complejos de P-92-HLA-A2 durante el período de observación de 8 horas, con complejos P-93L-HLA-A2 ligeramente más estables que los complejos de P-93i-HLA-A2 en el mismo período de tiempo. De este modo, se demostró que la unión de péptidos a MHC y la estabilidad del complejo de péptido-MHC era mayor para los péptidos P-93L y P-93i que el péptido nativo P-92.

Se comparó a capacidad de los péptidos agonistas P-93L y P-93i a diversas concentraciones de péptido, para activar las células T-1191-MUC-1. Como se observa en la Figura 3, a cada concentración de péptido, los pulsos de APC con el péptido P-93L condujeron al mayor nivel de producción de IFN- γ por las células T-1191-MUC-1, en comparación con el péptido P-93i o el péptido P-92 nativo. El péptido agonista P-93L fue elegido por tanto para su posterior estudio. A continuación se analizó el perfil de citoquinas de las células T-1191-MUC-1 estimuladas con APC pulsadas con cualquiera de los péptidos P-92 o P-93L. Se utilizó un ensayo CBA para el análisis. Tabla 5 muestra los niveles de cada una de las seis citoquinas producidas por la línea de células T-1191-MUC-1 estimuladas con APC pulsadas sin péptido, péptido P-92 y péptido P-93L. Estos resultados demostraron una producción mayor de las citoquinas de tipo 1 IL-2 e IFN- γ por las células T estimuladas con el péptido P-93L que con el péptido P-92. Con cualquier péptido se observaron niveles bajos o indetectables de las citoquinas de tipo 2 IL-4 e IL-10. No se

pudo detectar TNF-a en los sobrenadantes en el punto horario de 24 h.

Tabla 5 Análisis de CBA para la producción de citoquinas por células T estimuladas con péptido MUC-1

Péptido	Citoquinas					
	IL-2	IL-4	IL-5	IL-10	TNF-α	IFN-γ
Ninguno	<20	<20	<20	<20	<20	<20
P-92	58,8	<20	<20	<20	<20	266
P-93L	366,9	<20	140.9	<20	<20	650

Se analizó la producción de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α, y IFN-γ. Se utilizaron patrones a concentraciones de cada citoquina a 0 pg/ml, 312 pg/ml y 5000 pg/ml para determinar las concentraciones de estas seis citoquinas en las muestras. Las células T-1191 MUC-1 en IVS-3 se usaron como efectores. Las células T se estimularon con células B transformadas con EBV autólogas irradiadas pulsadas sin péptido o con los péptidos P-92 o P-93L a una concentración de 25 µg/ml, y una razón de efector a APC de 1:3. Los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas se recogieron y se seleccionaron para determinar la secreción de citoquinas. Los resultados se expresan en pg/ml/10⁶ células/ml.

5 Para comparar adicionalmente la actividad biológica del péptido P-92 nativos y el péptido P-93L agonista, se establecieron dos líneas de células T adicionales. Esto se logró utilizando como APC DC autólogas infectadas con rF-MUC-1/TRICOM y PBMC autólogas como efectores de un donante aparentemente sano. Después de tres IVS, las líneas de células T se estimularon con células B autólogas pulsadas con el péptido P-92 o P-93L. Estas dos líneas celulares se denominan T-1191-P-92 y T-1191-P-93L, respectivamente. Se mostró que las dos líneas
 10 celulares eran células > 98% positivas para CD8, 99% positivas para CD49d, <2% positivas para CD56 y > 75% positivas para CD45RO. Las dos líneas de células T se analizaron a continuación para determinar su capacidad para lisar dianas pulsadas con péptido. Se mostró que T-1191-P-93L lisa las células C1R-A2 pulsadas con el péptido P-93L en mayor medida que las células pulsadas con el péptido P-92 (Figura 4, cuadrados). T-1191-P-92 también lisó células diana pulsadas con el péptido P-93L en un grado mayor que las pulsadas con el péptido P-92 (Figura 4, triángulos). Los datos de la Figura 4 también muestran que cuando las células diana se pulsan con el péptido nativo, la línea de células T establecida con el péptido P-93L agonista lisa células diana a niveles mayores que la línea de células T establecida con el péptido nativo. Esto se observó a dos razones E:T diferentes. Las células T-1191-P-93L y las células T-1191 P-92 y no lisan las células C1R-A2 cuando se pulsan con el péptido CEA CAP1-6D de control (Figura 4, círculos).

20 Ejemplo 6

Reconocimiento de células diana.

25 Los estudios se llevaron a cabo para determinar si estas dos líneas de células T podían lisar la línea celular MCF-7 de carcinoma de mama positiva para MUC-1 y positiva para HLA-A2. La línea celular de melanoma SK-Mel-24 negativa para MUC-1 positiva para HLA-A2 se utilizó como un control negativo. Como se muestra en la Tabla 5, las células MCF-7 fueron lisadas tanto por las células T-1191-P-92 como -P-93L T-1191. No se observó lisis frente a las células SK-Mel-24. Se mostró que las células T-1191-P-93L lisaban las células MCF-7 en un grado mayor en
 30 comparación con la línea celular T-1191-P-92. La adición de células C1R-A2 no marcadas pulsadas con el correspondiente péptido MUC-1, pero no con el péptido de control CEA CAP1-6D, disminuyó la actividad citotóxica de las dos líneas de células T, lo que demuestra la especificidad por MUC-1 de la lisis (Tabla 5). También se demostró que la actividad citotóxica de estas líneas de células T contra las células MCF-7 estaba restringida por HLA-A2, como se demuestra por la inhibición de la lisis con la adición de anticuerpo anti-HLA-A2, pero no con el anticuerpo de control UPC-10 (Tabla 6).

Tabla 6 Capacidad de las líneas de células T específicas de MUC-1 T-1191-P-92 y T-1191-P-93L para lisar una línea celular tumoral que expresan MUC-1 (MCF-7)

Diana	T-1191-P-92	T-1191-P-93L
MCF-7	16,5 (2,7)*	24,5 (4,5)*
MCF-7 + C1R-A2	15,6 (3,2)*	21,6 (2,9)*
MCF-7 + C1R-A2 + P-92	4,2 (2,2)	6,1 (1,9)
MCF-7 + C1R-A2 + P-93L	3,0 (1,5)	3,5(1,2)

Diana	T-1191-P-92	T-1191-P-93L
MCF-7 + C1R-A2 + CAP1-6D	17,1 (3,8)*	20,8 (3,9)*
SK-Mel-24	0,5 (1,1)	1,4(0,8)

Los resultados se expresan en % de lisis específica a E:T = 25:1. Los números entre paréntesis son la desviación típica. Las células MCF-7 (línea celular de carcinoma de mama humano) son positivas para MUC-1 y positivas para HLA-A2. Las células SK-Mel-24 (melanoma) son negativas para MUC-1 y positivas para HLA-A2. Las células T-1191-P-92 y T-1191-P-93L se utilizaron en IVS-5. La línea celular T-1191-P-92 se pasó sobre el péptido P-92 nativo, mientras que la línea celular T-1191-P-93 se pasó sobre el péptido P-93L agonista, de IVS 3 a IVS 5. Las células MCF-7 se marcaron con ¹¹¹In. Las células MCF-7 marcadas y las células C1R-A2 no marcadas se utilizaron a una razón de 1:10. Las células C1R-A2 se incubaron con o sin péptido P-92 (25 µg/ml), péptido P-93L (25 µg/ml) o péptido de control CAP1-6D (25 µg/ml).

* Lisis estadísticamente significativa (p <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células MCF-7 frente a células SK-Mel-24. También hay una significación estadística (p <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células MCF-7 + C1R-A2 frente a MCF-7 + C1R-A2 + péptido P-92 o MCF-7 + C1R-A2 frente a MCF-7 + C1R-A2 + P-93L.

5 También se mostró que la actividad citotóxica de estas líneas de células T contra las células MCF-7 estaba restringida por HLA-A2, como se demuestra por la inhibición de la lisis con la adición de anticuerpo anti-HLA-A2, pero no con el anticuerpo de control UPC -10 (Tabla 7).

10 Las líneas de células T T-1991-P-92 y T-1191-P-93L se obtuvieron de un sujeto aparentemente sano. A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si podrían establecerse líneas de células T adicionales a partir de dos sujetos con cáncer de páncreas (sujetos 23 y 18). Se generaron cuatro líneas de células T específicas de MUC-1 y se denominaron T-23-P-92, T-23-P-93L, T-18-P-92 y T-18-P-93L. Las líneas de células T, T-18-P-92 y T-18-P-93L se generaron a partir del sujeto 18 mediante la estimulación de PBMC con células dendríticas autólogas pulsadas con los péptidos P-92 y P-93L, respectivamente. Las líneas de células T T-23-P-92 y T-23-P-93L se generaron a partir del sujeto 23 mediante estimulación de PBMC con DC autólogas pulsadas con los péptidos P-92 y P-93L, respectivamente. Como se observa en la Tabla 8, las cuatro líneas de células T de los dos sujetos con cáncer de páncreas pueden ser estimuladas para producir IFN-γ cuando se estimulan con las DC pulsadas con el péptido P-92 o P-93L. No se observó producción de IFN-γ, sin embargo, cuando estas células T se estimularon de forma similar con el péptido CAP1-6D CEA. Para las cuatro líneas de células T, se observaron mayores niveles de producción de IFN-γ cuando se utilizó el péptido P-93L agonista en comparación con el péptido nativo P-92. También hay que señalar que las líneas de células T obtenidas utilizando el péptido agonista siempre mostraron mayores niveles de estimulación de las líneas de células T derivadas de péptido nativo, cuando se utilizó un péptido dado para la estimulación.

Tabla 8 Producción de IFN-γ por líneas de células T generadas a partir de dos sujetos con cáncer de páncreas, estimuladas con P-92, y el péptido P-93L agonista

Línea de células T	Péptido		
	P-92	P-93L	CAP1-6D
T-23-P-92	299,8	644,5	<26
T-23-P-93L	400,5	973,0	<26
T-18-P-92	168,0	366,6	<26
T-18-P-93L	378,2	524,1	<26

^aLos resultados se expresan como pg de IFN-γ producido. Las células de las cuatro líneas de células T específicas de MUC-1 establecidas a partir de dos sujetos con cáncer de páncreas (sujetos 23 y 18) se utilizaron como células efectoras en el IVS-4. Estas líneas de células T se establecieron por estimulación con DC autólogas pulsadas con P-92 (T-23-P-92 y P-18-P-92) o DC autólogas pulsadas con P-93L (T-23-P-93L y T-18-P-93L). Para la producción de IFN-γ, las líneas de células T se estimularon con DC alogénicas positivas para HLA-A irradiadas pulsadas con péptido P-92 o P-93L a una concentración de 25 µg/ml y una razón de efector a APC de 10:1. Los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas se recogieron y se escrutaron para determinar la secreción de IFN-γ.

25 Ejemplo 7

Citólisis de dianas mediante líneas celulares derivadas de sujetos con cáncer.

5 A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si las líneas de células T derivadas del sujeto 23 con cáncer podrían lisar las células de cáncer positivas para HLA-A2 positivas para MUC-1. La línea de células SK-Mel-24 (negativa para MUC-1 y positiva para HLA-A2) se utilizó como control negativo para la especificidad. Como se puede observar en la Tabla 9 y 10, la línea T-23-P-93L, la línea T-23-P-92, la línea T-18-P-93L y la línea T-18-P-92 mostraron lisis de células de carcinoma MCF-7 a dos razones E:T diferentes, pero no mostraron lisis de la línea celular de melanoma. En concordancia con los resultados mostrados anteriormente, la línea de células T (T-23-P-93L, T-18-P-93L) obtenida utilizando el péptido agonista demostró una mayor lisis de las células tumorales que la línea de células T (T-23-P-92, T-18-P-92) obtenida utilizando el péptido nativo. Esto se observó a dos razones E:T diferentes.

Tabla 9 Capacidad de las líneas de células T de un sujeto con cáncer de páncreas, generadas con el péptido agonista P-93L, para lisar células cancerosas que expresan MUC-1 nativo

Línea de células T	Diana	Razones E:T	
		25:1	12.5:1
T-23-P-93L	MCF-7	24,6 (1,0)*#	17,9 (0,2)*#
T-23-P-93L	SK-Mel-24	1,3 (1,1)	0,8 (0,6)
T-23-P-92	MCF-7	14,4 (0,6)*	10,1 (0,8)*
T-23-P-92	SK-Mel-24	0,5 (1,6)	0,4 (1,9)

* Significación estadística ($p < 0,01$, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células MCF-7 frente a las células SK-Mel-24 por las células T-23-P-93L y T-23-P-92.
 # Significación estadística ($p < 0,01$, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células MCF-7 por las células T-23-P-93L y T-23-P-92.
 Los resultados se expresan como % de lisis.

15 Tabla 10 Capacidad de las células T de un sujeto con cáncer de páncreas generado con péptido agonista P-93L para lisar células cancerosas que expresan MUC-1 nativo

Línea de células T	Diana	Razones E:T	
		25:1	12,5:1
T-18-P-93L	MCF-7	25 (0,8)*#	14,6 (0,5)*#
T-18-P-93L	SK-Mel-24	1,1 (0,9)	1,0 (0,8)
T-18-P-92	MCF-7	12,1 (0,3)*	8,4 (0,4)*
T-18-P-92	SK-Mel-24	0,9 (1,4)	1,0(1,2)

* Significación estadística ($p < 0,01$, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células MCF-7 frente a las células SK-Mel-24 por las células T-18-P-93L y T-18-P-92.
 # Significación estadística ($p < 0,01$, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células MCF-7 por las células T-18-P-93L y T-18-P-92.

Ejemplo 8

20 Materiales y métodos

Los dos vectores virales analizados son el virus vaccinia recombinante competente para la replicación (RV-), y el vector de avipoxvirus, de viruela aviar (rF-), que es de replicación no competente en células de mamífero. Cada vector codifica los transgenes para tres moléculas co-estimuladoras humanas (B7-1, ICAM-1, LFA-3, denominadas TRICOM); los transgenes CEA y MUC-1 también contienen epítomos agonistas. Los vectores se denominan rV-CEA/MUC/TRICOM y rF-CEA/MUC/TRICOM.

30 Se demuestra que cada uno de los vectores es capaz de expresar fielmente los cinco transgenes en las células dendríticas humanas (DC). Se muestra que las DC infectadas con cualquier vector activan las líneas de células T específicas de CEA y específicas de MUC-1 al mismo nivel que las DC infectadas con los vectores CEA-TRICOM o MUC-1-TRICOM. Por lo tanto, no se observó evidencia de la competencia antigénica entre CEA y MUC-1. También se muestra que las DC humanas infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM son capaces de

generar las líneas de células T específicas de MUC-1 y de CEA; a su vez se muestra que estas líneas de células T son capaces de lisar dianas pulsadas con péptidos MUC-1 o CEA, así como células tumorales humanas que expresan endógenamente MUC-1 y/o CEA.

5 Cultivos celulares

La línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 (positivo para HLA-A2, negativo para CEA y positivo para MUC-1), la línea celular de carcinoma colorrectal SW1463 (positivo para HLA-A2, positivo para CEA y positivo para MUC-1), y la línea celular de melanoma SKMel-24 (positivo para HLA-A2, negativa para CEA y negativo para MUC-1) fueron adquiridas de la Colección de Cultivos Tipo Americana (Manassas, VA). Los cultivos estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio completo [RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) con un suplemento de suero fetal bovino al 10%, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 pg/ml de estreptomycin (Invitrogen Life Technologies)]. La línea celular C1R es una línea celular de leucemia plasmática humana que no expresa antígenos HLA-A o B endógenos. Las células C1R-A2 son células C1R que expresan un clon genómico transfectado de HLA-A2.1. Estas células se obtuvieron del Dr. William E. Biddison (Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares, NIH, Bethesda, MD). El mutante por delección de transporte de la línea celular 174CEM-T2 (T2) fue proporcionado por el Dr. Peter Cresswell (Escuela de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT). Las células C1R-A2 y las células T2 estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio completo RPMI 1640 y medio completo de Dulbecco modificado por Iscove (Invitrogen Life Technologies), respectivamente. La línea celular V8T es una línea CD8+CTL dirigida contra el epítipo CAP-1 de CEA. La línea celular T-1191-P93L es una línea CTL específica de CD8 + MUC-1 generada a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante sano que fue estimulado *in vitro* utilizando un péptido MUC-1. Ambas líneas celulares V8T y T-1191-P93L se cultivaron como se ha descrito anteriormente.

25 Péptidos

Los péptidos de unión a HLA-A2 utilizados incluyeron: (a) el péptido agonista de CEA CAP1-6D (YLSGADLNL) (SEQ ID NO: 38), denominado péptido CEA, (b) el péptido agonista de MUC-1 P-93L (ALWGQDVTSV) (SEQ ID NO: 19), denominado péptido MUC-1, (c) el péptido PSA-3 del antígeno específico de próstata (PSA) (VISNDVCAQV) (SEQ ID NO: 40). Todos los péptidos tuvieron una pureza mayor de 96% y fueron fabricados por American Peptide Company, Inc. (Sunnyvale, CA).

Cultivo de DC a partir de PBMC

Se obtuvieron PBMC de donantes normales para HLA-A2 de sangre heparinizada. Las PBMC se separaron utilizando gradiente de medio de separación de linfocitos (Organon Teknika, Durham, NC), como se ha descrito previamente (51) (Boyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in 1 g gravity field, Scand J Clin Lab Invest 1968;97(Suppl):51-76). Las DC se prepararon utilizando una modificación del procedimiento descrito por Sallusto et al. Sallusto F, Lanzavecchia A., Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha., J Exp Med 1994; 179:1109-18. Las PBMC ($1,5 \times 10^8$) se resuspendieron en medio AIM-V que contenía glutamina 2 mM, 50 µg/ml de estreptomycin y 10 µg/ml de gentamicina (Invitrogen Life Technologies), y se dejó que se adhirieran a un matraz T-150 (Corning Costar Corp., Cambridge, MA). Al cabo de 2 horas a 37°C, las células no adherentes se eliminaron con un enjuague suave. Las células adherentes se cultivaron durante 6-7 días en medio AIM-V que contenía 100 ng/ml de GM-CSF recombinante humano (rhGM-CSF) y 20 ng/ml de IL-4 recombinante humana (rhIL-4). El medio de cultivo se repuso cada 3 días.

Virus recombinante e infección de DC con rV-CEA/MUC/TRICOM y rF-CEA/MUC/TRICOM

Tanto rV-CEA/MUC/TRICOM como rF-CEA/MUC/TRICOM codifican el gen CEA humano que contiene la modificación 6D, el gen MUC-1 humano que contiene la modificación 93L y los genes para las moléculas coestimuladoras humanas B7-1, ICAM-1 y LFA-3 (Figura 5) (Zaremba S, Barzaga E, Zhu M et al. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. Cancer Res 1997;57:4570-7, y Tsang KY, Palena C, Gully J, Arlen P, Schlom J. A human cytotoxic T-lymphocyte epitope and its agonist epitope from the non-variable number of tandem repeat sequence of MUC-1. Clin Cancer Res 2004;10:2139-49). Se generaron vectores recombinantes mediante recombinación homóloga como se describió anteriormente (Hodge JW, McLaughlin JP, JA Kantor, J. Schlom Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor responses. Vaccine 1997;16:759-68). Las DC (1×10^6) se incubaron en 1 ml de medio Opti-MEM (Invitrogen Life Technologies) a 37°C con rF-CEA/MUC/TRICOM, rV-CEA/MUC/TRICOM, vector de avipoxvirus de control (FP-WT) o vector vaccinia de control (V-WT). Los experimentos de titulación demostraron que la infección de las DC durante 2 horas con 4×10^7

unidades formadoras de placa (pfu)/ml de rF-CEA/MUC/TRICOM, igual a una multiplicidad de infección (MOI) de 40 pfu/célula fue capaz de inducir de manera sistemática la expresión del transgén en aproximadamente 60% de las DC infectadas. Experimentos de titulación similares demostraron que la infección de las DC durante 1 hora con $0,5 \times 10^7$ pfu/ml de rV-CEA/MUC/TRICOM, igual a una MOI de 5 pfu/célula, fue capaz de inducir de manera sistemática la expresión del transgén en aproximadamente 35% de las DC infectadas. Se utilizaron DC de diferentes donantes para las infecciones con rF-CEA/MUC/TRICOM y rV-CEA/MUC/TRICOM, oscilando la eficiencia de la infección de 50% a 65% para rF-CEA/MUC/TRICOM y de 30% a 59% para rV-CEA/MUC/TRICOM. Las DC infectadas se suspendieron en 10 ml de medio completo RPMI-1640 caliente, de nueva aportación, que contenía 100 ng/ml de rhGM-CSF y 20 ng/ml de rhIL-4, se cultivaron durante 24 horas, y se utilizaron posteriormente como APC.

10 Análisis por citometría de flujo

Se realizó el análisis por citometría de flujo de dos colores en líneas de células T mediante el uso de las siguientes combinaciones de anticuerpos: anti-CD56-FITC/anti-CD8-PE, anti-CD8-FITC/anti-CD45RA-FITC y anti-CD8-FITC/anti-CD27-PE. Los anticuerpos fueron todos adquiridos de BD Biosciences (San Jose, CA). La tinción se llevó a cabo de forma simultánea durante 1 hora a 4°C, las células se lavaron a continuación tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , se resuspendieron en el mismo tampón, y 11 se analizaron inmediatamente utilizando un FACScan y el programa CELLQuest (BD Biosciences). Los datos se obtuvieron a partir de 10.000 células vivas, se almacenaron y utilizaron para generar los resultados. El procedimiento para el análisis de las DC fue similar al descrito anteriormente. Se utilizaron las siguientes combinaciones de anticuerpos: anti-MHC de Clase II-FITC/anti-CD80-PE, anti-CD58-FITC/anti-CD54-PE, anti-MHC de Clase I-FITC/anti-MHC de Clase II-PE, y anti-IgG1-FITC/anti-IgG2a-PE (controles de isotipo). Los anticuerpos para MHC de Clase I y II se adquirieron de Serotec (Oxford, Reino Unido); otros anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences. También se utilizaron el anticuerpo monoclonal anti-CEA COL-1 y anticuerpos anti-MUC-1 (DF3 y DF3-P) (Muraro R, Wunderlich D, Thor A, et al. Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinoma versus normal adult tissues. *Cancer Res* 1985;45:5769-80). MOPC-104E (IgM) (Cappel/Organon Teknika Corp., West Chester, PA) se utilizó como control negativo.

Después de la tinción, las células se lavaron tres veces y posteriormente se incubaron con una dilución 1:100 de cabra marcado con FITC anti-inmunoglobulina de ratón (IgG) (Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). El análisis se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Los resultados se expresaron en porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia (IMF) significan. Se recogió el valor de IMF en escala logarítmica, y se utilizó para expresar los niveles de fluorescencia determina midiendo el promedio para todas las células en el gráfico de puntos de fluorescencia.

35 Análisis de inmunotransferencia

Las DC no infectadas, las DC infectadas con MOI de 40 de los vectores rF-CEA/MUC/TRICOM, rF-CEA(6D)-TRICOM o RF-MUC-1-TRICOM, y las DC infectadas con MOI de 5 del vector rV-CEA/MUC/TRICOM se lisaron mediante el uso de reactivo de extracción de proteína de mamífero MPER (Pierce, Rockford, IL). La concentración de proteína de los productos lisados se determinó mediante el uso de un Kit de análisis de proteínas MicroBCA (Pierce), y se transfirieron fracciones de 20 µg de proteína por muestra a una membrana de PVDF 12 utilizando un aparato Bio-Dot Microfiltration (BioRad Laboratories, Hercules, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con PBS que contenía 5% de BSA (Biosource International, Camarillo, CA). A continuación, las membranas se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,25% de Tween-20, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con una solución a 1 µg/ml de anticuerpos COL-1, DF-3 o DF3-P. Las membranas se lavaron a continuación tres veces como antes, y se incubaron con una dilución 1:3000 de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Kirkegaard & Perry Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la inmunodetección de las proteínas CEA y MUC-1, se utilizó SuperSignal West Pico Substrate Chemiluminiscent (Pierce).

Generación de líneas de células T

Se utilizó la modificación del protocolo descrito por Tsang et al. para generar CTL específicos de CEA y/o MUC-1 (Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, et al. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:982-90). Para generar las líneas de células T T-RV y T-RF, se utilizaron como APC DC autólogas infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o RF-CEA/MUC/TRICOM, respectivamente. Se añadieron células no adherentes autólogas a APC con una razón de efector a APC de 10:1; los cultivos se incubaron durante 3 días a 37°C, en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO_2 . Los cultivos se complementaron con IL-2 humana recombinante a una concentración de 20 unidades/ml durante 7 días; el medio que contenía IL-2 se repuso cada 3 días. La incubación de 3 días con el péptido y de 7 días con el suplemento de IL-2 constituye un ciclo de

estimulación in vitro (IVS). T-rV y T-rF se volvieron a estimular con DC autólogas infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM, respectivamente, como se ha descrito anteriormente, en el día 11 para empezar el siguiente ciclo de IVS. Las DC autólogas infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM y RF-CEA/MUC/TRICOM se utilizaron como APC durante tres ciclos de IVS. Para la generación de líneas de células T-RF(CEA) y T-RF(MUC), las células T se estimularon con células dendríticas autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM durante una IVS, y a continuación se volvieron a estimular con DC autólogas no infectadas pulsadas con péptido CAP1-6D o P-93L, respectivamente, durante dos IVS más. Después del tercer ciclo de IVS, se utilizaron como APC células B transformadas con EBV autólogas irradiadas (23.000 rads). Las células B transformadas con EBV se pulsaron con 25 µg/ml de péptido, y se utilizaron para la reestimulación a una razón de efector a APC de 1:3.

Los cultivos se incubaron a continuación durante 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Después de la eliminación del medio que contenía péptido, los cultivos se complementaron con IL-2 humana recombinante a una concentración de 20 unidades/ml durante 7 días. Las líneas de células T de los pacientes 55, 49 y 41 se generaron por medio de estimulación de PBMC con DC autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM, utilizando el mismo protocolo de estimulación descrito anteriormente. El paciente de 55 experimentó inicialmente un procedimiento de Whipple para el cáncer pancreático localizado seguido de radioterapia coadyuvante al lecho pancreático. El paciente tuvo recurrencia local y recibió quimioterapia con 5-FU/Leucovorina seguido de un estudio con vacuna experimental utilizando tanto vaccinia-CEA como ALVAC-CEA antes de inscribirse en este ensayo clínico. El paciente 41 fue diagnosticado de carcinoma colorrectal con metástasis en el hígado. Antes de inscribirse en el estudio, este paciente progresó en tres diferentes regímenes de quimioterapia, incluyendo 5FU/Leucovorina/CPT-11, 5FU/Leucovorina/Oxaliplatino, y Xeloda. El paciente 49 tenía cáncer colorrectal con metástasis en el hígado y el pulmón. El paciente progresó siguiendo cuatro ciclos de quimioterapia con CPT-11/5FU/Leucovorina antes de inscribirse en el estudio.

Análisis citotóxico

Las células diana (células C1R-A2 o tumorales) se marcaron con 50 µCi de oxiquinolina marcada con ¹¹¹Indio (Medi-Physics Inc., Arlington, IL) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron células diana (0,3 x 10⁴) en 100 µl de medio completo RPMI-1640 a cada uno de los 96 pocillos en placas de análisis de fondo plano (Corning Costar Corp.). Las células diana C1R-A2 marcadas se incubaron con péptidos a la concentración indicada durante 60 minutos a 37°C en 5% de CO₂ antes de añadir las células efectoras. No se utilizó péptido cuando se utilizaron líneas celulares de carcinoma como dianas. Las células efectoras se suspendieron en 100 µl de medio completo RPMI-1640 con un suplemento de 10% de suero AB humano agrupado y se añadieron a las células diana. Las placas se incubaron a continuación a 37°C en 5% de CO₂ durante 6 o 16 horas. Se recogió el sobrenadante para el recuento gamma mediante el uso de marcos cosechadores (Skatron, Inc., Sterling, VA). Las determinaciones se realizaron por triplicado, y se calcularon las desviaciones típicas. La lisis específica se calculó con el uso de la siguiente fórmula (todos los valores en cpm):

$$\% \text{ lisis} = \frac{\text{Liberación observada} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación total} - \text{Liberación espontánea}} \times 100$$

La liberación espontánea se determinó a partir de los pocillos a los que se añadieron 100 µl de medio completo RPMI-1640. La radiactividad liberable total se obtuvo después del tratamiento de las dianas con Triton X-100 al 2,5%.

Detección de citoquinas

Los sobrenadantes de las células T expuestas durante 24 horas a las células B transformadas con EBV autólogas pulsadas con péptido en medio libre de IL-2, a varias concentraciones de péptidos, se escrutaron para determinar la secreción de IFN-α utilizando un kit de ELISA (Biosource International). Los resultados se expresaron en pg/ml.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de las diferencias entre las medias se realizó mediante una prueba de la t pareada de dos colas (soporte lógico estadístico Stat View, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Se llevaron a cabo en primer lugar estudios para determinar si la infección de las DC humanas con rV-CEA/MUC/TRICOM daría lugar a la expresión de cada uno de los cinco transgenes. Los estudios iniciales utilizaron una MOI de 5 y 10 para rV-CEA/MUC/TRICOM; ambas MOI proporcionan resultados comparables y por lo tanto se utilizó una MOI de 5 en experimentos posteriores. Como se observa en la Figura 6, las DC humanas no infectadas no expresan CEA (tal como se detecta mediante el anticuerpo monoclonal COL-1); la expresión de CD80, CD54, y CD58, MHC de Clase I y MHC de Clase II por las DC es similar a la referida previamente en varios estudios (Tsang KY, Zhu MZ, Even J., et al., The infection of human dendritic cells with recombinant avipox vectors expressing a

costimulatory molecule transgene (CD80) to enhance the activation of antigen-specific cytotoxic T cells. *Cancer Res* 2001;61:7568-76; y Zhu MZ, Terasawa H, Gulley J, et al. Enhanced activation of human T cells via avipox vector-mediated hyperexpression of a triad of costimulatory molecules in human dendritic cells. *Cancer Res* 2001;61:3725-34). La infección con V-WT tenía un efecto pequeño, si lo hubiera, o nulo sobre cualquiera de estos ocho marcadores de superficie (Figura 6). Se muestra que la infección con rV-CEA/MUC/TRICOM, sin embargo, aumenta sustancialmente el nivel de expresión de CEA, MUC-1, CD80, CD54 y CD58, y no afecta sensiblemente el nivel de expresión del MHC de Clase I y Clase II. En consonancia con los resultados publicados anteriormente, la infección de las DC del mismo donante con rV-CEA (6D)-TRICOM mejoró el nivel de CEA, CD80, CD54, CD58 y a niveles similares a los observados con rV-CEA/MUC/TRICOM, pero no alteró la expresión de MUC-1 o MHC de Clase I o Clase II. Además, la infección de las DC con rV-MUC-1 mezclado con rV-TRICOM (el constructo rV-MUC-1-TRICOM no estaba disponible) mostró niveles de expresión mejorada de MUC-1 y de las tres moléculas co-estimuladoras similares a los observados con rV-CEA/MUC/TRICOM, pero no tuvo efecto sobre el nivel de expresión de MHC de Clase I y Clase II, ni sobre la falta de expresión de CEA (datos no mostrados). Se detectaron niveles bajos de MUC-1 en las DC no infectadas y e infectadas con vectores de control. Esto está de acuerdo con lo referido por Wykes et al., que mostró que MUC-1 se expresa en las DC humanas y las DC derivadas de monocitos cuando se cultivan in vitro (Wykes M, MacDonald KP, Tran M, et al. MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2002;72:692-701.)

Se llevaron a cabo estudios paralelos para determinar si la infección de las DC humanas con rF-CEA/MUC/TRICOM daría lugar a la expresión de cada uno de los cinco transgenes. Los estudios iniciales utilizaron una MOI de 20 y 40 para rF-CEA/MUC/TRICOM; una MOI de 40 mostró una mayor expresión de transgenes y de este modo se utilizó en experimentos posteriores. Como se observa en la Figura 7, la infección con FP-WT tenía un efecto pequeño, si lo hubiera, o nulo sobre cualquiera de los ocho marcadores de superficie analizados. Se mostró, sin embargo, que la infección con rF-CEA/MUC/TRICOM aumentaba sustancialmente el nivel de expresión de CEA, MUC-1, CD80, CD54 y CD58, pero no afectaba al nivel de expresión de MHC de Clase I y Clase II. La infección de las DC del mismo donante con rF-CEA(6D)-TRICOM mejoró el nivel de CEA, CD80, CD54, y CD58 a niveles similares a los observados con rF-CEA/MUC/TRICOM, pero no alteró la expresión de MUC-1 o MHC de Clase I o Clase II. Además, la infección de las DC con rF-MUC-1-TRICOM mostró niveles similares de expresión mejorada de MUC-1 y de las tres moléculas co-estimuladoras como se observa con rF-CEA/MUC/TRICOM, pero no tuvo efecto sobre el nivel de expresión del MHC de Clase I y Clase II ni sobre la falta de expresión de CEA (datos no mostrados). La expresión de CEA y MUC-1 en las DC infectadas con los vectores rF-CEA/MUC/TRICOM, rF-CEA(6D)-TRICOM, rF-MUC-1-TRICOM o las DC no infectadas se analizó mediante análisis de inmunotransferencia. Como se muestra en la Figura 8, se detectó CEA en las DC infectadas con rF-CEA(6D)-TRICOM, rF-CEA/MUC/TRICOM y rV-CEA/MUC/TRICOM, pero no en las DC no infectadas o las DC infectadas con rF-MUC-1-TRICOM. Como se describió anteriormente, las DC expresan un bajo nivel de MUC-1, pero se observó claramente un gran aumento de MUC-1 de expresión en las DC infectadas con rF-MUC-1-TRICOM, rV-CEA/MUC/TRICOM, y RF-CEA/MUC/TRICOM, pero no en las DC infectadas con rF-CEA(6D)-TRICOM (Figura 8).

Los autores de la presente invención han demostrado la capacidad de las DC pulsadas con el péptido agonista de CEA CAP-1(6D) y péptido agonista de MUC-1 P-93L para activar las células T humanas. Se llevaron a cabo estudios para determinar si la infección de las DC humanas con el vector rF-CEA/MUC/TRICOM podría estimular la producción de IFN- γ por las células T específicas de CEA y específicas de MUC-1. Estos resultados también se compararon con la capacidad de las DC humanas infectadas con rF-CEA(6D)-TRICOM o rF-MUC-1-TRICOM para activar estas células T. Como se observa en la Tabla 11, las DC no infectadas o las DC infectadas con FP-WT no dieron lugar a ninguna producción de IFN- γ por la línea de células T específica de CEA (V8T), o la línea de células T específica de MUC-1 (T-1191-P93L). Las DC pulsadas con el péptido CEA indujeron la producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específicas de CEA, mientras que las DC pulsadas con el péptido MUC-1 indujeron la producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específica de MUC-1. Del mismo modo, las DC infectadas con rF-CEA(6D)-TRICOM indujeron la producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específica de CEA, mientras que las DC infectadas con rF-MUC-1-TRICOM indujeron la producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específica de MUC-1. La infección de las DC con rF-CEA/MUC/TRICOM, sin embargo, indujo la producción de IFN- γ tanto en la línea de células T específica de CEA y la línea de células T específica de MUC-1, y a niveles comparables a los observados cuando se utilizan los vectores que contienen sólo el transgén de un único antígeno tumoral. Estos estudios pueden demostrar la falta de competencia antigénica entre CEA y MUC-1 en el vector rF-CEA/MUC/TRICOM en la capacidad para activar las células T.

Se llevaron a cabo a continuación estudios para determinar si la infección de las DC humanas con el vector rV-CEA/MUC/TRICOM podría estimular la producción de IFN- γ 19 por las células T específicas de CEA y específicas MUC-1. Estos resultados también se compararon con la capacidad de las DC humanas infectadas con rV-CEA(6D)-TRICOM, o rV-MUC-1 más rV-TRICOM, para activar esas células T. Como se observa en la Tabla 12, las DC no infectadas o las DC infectadas con V-WT no dieron lugar a ninguna producción de IFN- γ en la línea de células T específica de CEA o la línea de células T específica de MUC-1. Las DC pulsadas con el péptido CEA indujeron la

producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específica de CEA, mientras que las DC pulsadas con el péptido MUC-1 indujeron la producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específica de MUC-1. Del mismo modo, las DC infectadas con rV-CEA(6D)-TRICOM indujeron la producción de IFN- γ sólo por la línea de células T específica de CEA, mientras que las DC infectadas con los vectores de MUC-1 indujeron la producción de IFN- γ sólo en la línea de células T específica de MUC-1. La infección de las DC con rV-CEA/MUC/TRICOM, sin embargo, indujo la producción de IFN- γ tanto en la línea de células T específica de CEA como en la línea de células T específica de MUC-1 y a niveles comparables a los observados cuando se utilizan los vectores que contienen sólo el transgén de un único antígeno tumoral. Estos estudios pueden demostrar la falta de competencia antigénica entre CEA y MUC-1 en la capacidad de activar las células T que emplean el vector rF-CEA/MUC/TRICOM. A continuación se realizaron estudios para determinar si las células T humanas podrían establecerse a partir de PBMC utilizando células dendríticas autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM y/o rV-CEA/MUC/TRICOM como APC.

Después de tres IVS, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se analizaron las células T resultantes para determinar su capacidad para ser activadas por DC pulsadas con péptidos o infectadas con el vector. Como se observa en la Tabla 13, ninguna de las líneas de células T establecidas utilizando como APC DC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM pudo ser activada para producir IFN- γ , cuando fueron estimuladas por 20 DC no infectadas, o DC infectadas con FP-WT. Estos resultados son compatibles con las observaciones anteriores en el sistema murino de que no hay reactividad cruzada en términos de epítomos de células T entre virus vaccinia y de la viruela aviar (Hodge JW, Poole DJ, Aarts WM, et al. Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. Cancer Res 2003;63:7942-9); esto también es compatible con estudios en ratones y seres humanos anteriores (datos no publicados), que mostraron que es difícil generar células T de mamífero dirigidas contra epítomos de la viruela aviar. Por otro lado, las líneas de células T generadas con APC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM se activan ambas para producir IFN- γ cuando se utilizan como APC DC pulsadas con los péptidos CEA o MUC-1 (Tabla 13). Estos resultados pueden indicar que las DC infectadas con cualquier vector generarán las células T de PBMC que se dirigen contra los antígenos de CEA y de MUC-1.

Las células T generadas por las DC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM producen IFN- γ cuando se exponen a DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM. En experimentos adicionales, se generaron células T empleando inicialmente como APC DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM, y a continuación se pasaron con APC pulsadas con péptido CEA durante dos IVS. Como se observa de la Tabla 13, estas células T perdieron su capacidad de ser activadas por DC pulsadas con el péptido MUC-1, pero conservaban su capacidad de ser activadas para producir IFN- γ por DC pulsadas con el péptido CEA. Por el contrario, cuando las células T generadas utilizando inicialmente DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM se pasaron a continuación en presencia de DC pulsadas con péptido MUC-1, éstas perdieron su capacidad para ser activada por las DC pulsadas con el péptido CEA, pero mantuvieron su capacidad de ser activadas por el péptido MUC-1.

A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si las líneas de células T, establecidas utilizando como APC DC infectadas con el vector rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM, podrían lisar células diana humanas. Como se observa en la Tabla 14, ambas líneas de células T fueron incapaces de lisar células C1R-A2, pero pudieron lisar células C1R-A2 pulsadas con el péptido CEA o con el péptido MUC-1. Ninguna línea de células T pudo lisar células C1R-A2 pulsadas con el péptido PSA de control. Por otro lado, la línea de células T establecida utilizando DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM, y a continuación pasada utilizando como APC, DC pulsadas con péptido CEA, fue capaz de lisar células diana pulsadas con el péptido CEA pero no células diana pulsadas con péptidos MUC-1 o PSA. Por el contrario, la línea de células T establecida utilizando DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM, y a continuación pasada utilizando como APC, DC pulsadas con péptido MUC-1, fue capaz de lisar células diana pulsadas con el péptido MUC-1, pero no células diana pulsadas con péptidos CEA o PSA.

A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si las líneas de células T generadas utilizando DC infectadas con vectores rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM tenían la capacidad de lisar células tumorales humanas que expresan CEA nativo o MUC-1 nativo. Se evaluaron tres líneas celulares diana HLA-A2+: la línea de carcinoma de mama humano MCF-7, que es positiva para MUC-1 y negativa para CEA; la línea celular de carcinoma colon humano SW1463, que es positiva tanto para CEA como para MUC-1; y la línea de melanoma humano SK-Mel-24, que es negativa para la expresión tanto de MUC-1 como de CEA. Los autores de la presente invención no pudieron identificar una línea celular HLA-A2+ que fuera negativa para MUC-1 y positiva para CEA. Como se observa en la Tabla 14, las líneas de células T generadas utilizando las DC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM fueron ambas capaces de lisar las líneas de carcinoma de mama y de colon, pero no fueron capaces de lisar la línea de melanoma.

Por otro lado, la línea de células T generada utilizando DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM y a continuación se re-estimularon con DC pulsadas con el péptido CEA durante dos IVS fue capaz de lisar la línea de carcinoma de colon positiva para CEA/negativa para MUC-1, pero fue incapaz de lisar la línea del cáncer de mama positiva de

CEA/negativa para MUC-1 y la línea de melanoma negativa para CEA/negativa para MUC-1. La línea de células T generada utilizando DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM y a continuación re-estimulada con DC pulsadas con el péptido MUC-1 durante dos IVS fue capaz de lisar las líneas celulares de tanto de colon como de mama, pero no la línea de melanoma. En conjunto, estos datos pueden demostrar que ambos vectores vaccinia y de avipoxvirus recombinantes pueden ser construidos para expresar cada uno fielmente cinco transgenes humanos, y que no se observa competencia antigénica en la capacidad de estos vectores para activar las células T humanas dirigidas contra dos antígenos asociados a tumores humanos .

Se generaron líneas de células T T-rV, T-rF, T-rF(CEA) y T-rF(MUC) a partir de un individuo aparentemente sano. Se demostró que las cuatro líneas celulares eran > 97% positivas para CD8, <2% positivas para CD56, > 75% positivas para CD45RA, y > 81% positivas para CD27. A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si las líneas de células T específicas podrían ser obtenidas de un paciente con cáncer de páncreas (paciente 55). Se generó una línea de células T utilizando como APC DC infectadas rF-CEA/MUC/TRICOM, y se denominó T-55. Como se determinó por análisis de citometría de flujo, la línea celular T-55 era 99,9% positiva para CD8, <2% positiva para CD56, 73,6% positiva para CD45RA y 87% positiva para CD27. Como se observa en la Tabla 15, se mostró que esta línea de células T producía IFN-γ cuando era estimulada con DC autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM y DC pulsadas con el péptido CEA o con el péptido MUC-1, pero no con el péptido PSA-3.

A continuación, se llevaron a cabo estudios para determinar si esta línea de células T podía lisar líneas celulares de cáncer positivas para CEA y/o MUC-1 y positivas para HLA-A2. La línea celular de melanoma SK-Mel-24 (negativa para MUC-1, negativa para CEA y positiva para HLA-A2) se utilizó como control negativo. Como se observa en la Tabla 16, la línea celular T-55 mostró lisis de las células C1R-A2 pulsadas con péptido CEA y péptido MUC-1, pero no con péptido PSA-3. Además, la línea celular T-55 lisó células MCF-7 y células SW1463 a diferentes razones E:T, pero no mostró lisis de la línea celular de melanoma. Dos líneas de células T adicionales se establecieron a partir de pacientes de carcinoma de colon. Estas líneas de células T fueron denominadas T-41 y T-49. La línea de células T-41 fue 98,8% positiva para CD8, <1% positiva para CD56, 33,6% positiva para CD45RA y 96,8% positiva para CD27. La línea de células T-49 fue 98,9% positiva para CD8, <1% positiva para CD56, 29,8% positiva para CD45RA y 95,3% positiva para CD27. Como se observa en la Tabla 15, se mostró que dos líneas celulares T-41 y T-49 producían IFN-γ cuando eran estimuladas con células dendríticas autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM y pulsadas con DC, con el péptido CEA o con el péptido MUC-1, pero no con el péptido de PSA-3. Como se observa en la Tabla 17, las dos líneas celulares T-41 y T-49 mostraron lisis de las células MCF-7 y SW1463 a varias razones E:T, pero no mostraron lisis de la línea celular SK-Mel-24.

Dos de las principales preocupaciones en el desarrollo y uso de vacunas para el tratamiento del cáncer son: (a) la escasa inmunogenicidad de los antígenos asociados a tumores y (b) la heterogeneidad antigénica de los tumores. Los vectores descritos aquí fueron desarrollados para hacer frente a estos dos problemas. Estos vectores son los primeros en los que se insertan cinco transgenes completos en un vector de avipoxvirus y, por lo que se refiere al conocimiento de los autores de la presente invención, cualquier vector de incompetente para la replicación. También se ha desarrollado un constructo de cinco transgenes paralelo de virus vaccinia recombinante. Para ambos vectores, cada transgén fue guiado por su propio promotor. Estudios previos en ambos modelos preclínicos y ensayos clínicos han demostrado que regímenes diversificados de vacunación principal y de refuerzo utilizando dos vacunas diferentes son superiores al uso continuado de una vacuna. Es por esta razón que se desarrollaron vectores tanto vaccinia recombinante como de la viruela aviar recombinante.

Como se ha demostrado en las Tablas 12-17, la infección de las DC con el vector rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM dio como resultado la activación de células T tan eficazmente como el uso de DC como APC que fueron infectadas con cualquier vector CEA-TRICOM o MUC-1-TRICOM. Por otra parte, las células T generadas utilizando las DC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM o RF-CEA/MUC/TRICOM fueron capaces de lisar células diana que expresaban CEA o MUC-1.

Tabla 11

Producción de IFN-γ por líneas de células T específicas de CEA y específicas de MUC-1 estimuladas con rF-CEA/MUC/TRICOM		
Tratamiento de células dendríticas	IFN-γ (pg/ml)	
	CTL específicos de CEA	CTL específicos de MUC-1
No infectadas	<15	<15
FP-WT	<15	<15
No infectadas + péptido CEA	772	<15

Producción de IFN- γ por líneas de células T específicas de CEA y específicas de MUC-1 estimuladas con rF-CEA/MUC/TRICOM		
	IFN- γ (pg/ml)	
Tratamiento de células dendríticas	CTL específicos de CEA	CTL específicos de MUC-1
No infectadas + péptido MUC-1	<15	458
FP-WT + péptido CEA	689	<15
FP-WT + péptido MUC-1	<15	404
rF-CEA(6D)-TRICOM	475	<15
rF-MUC-1-TRICOM	<15	298
rF-CEA/MUC/TRICOM	455	278

5 Las células T específicas de CEA (V8T) y las células T específicas de MUC-1 (T-1191-P93L) fueron estimuladas con DC no infectadas autólogas solas o pulsadas con el péptido CEA (CAP1-6D) o con el péptido MUC-1 (P-93L); DC infectadas con el vector de control FP-WT solas o pulsadas con los péptidos CEA o MUC-1; DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM, rF-CEA(6D)-TRICOM o RF-MUC-1/TRICOM. Los péptidos se utilizaron a una concentración de 25 μ g/ml. La razón de efector a APC era de 10:1. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas y se escrutaron para determinar para la producción de IFN- γ .

Tabla 12

Producción de IFN- γ por líneas de células T específicas de CEA y específicas de MUC-1 estimuladas con rV-CEA/MUC/TRICOM		
	IFN- γ (pg/ml)	
Tratamiento de células dendríticas	CTL específicos de CEA	CTL específicos de MUC-1
No infectadas	<15	<15
V-WT	<15	<15
No infectadas + péptido CEA	820	<15
No infectadas + péptido MUC-1	<15	550
V-WT + péptido CEA	720	<15
V-WT + MUC-1 péptido	<15	358
rV-CEA(6D)-TRICOM	384	<15
rV-MUC-1 + rV-TRICOM	<15	213
rV-CEA/MUC/TRICOM	285	256

10 Las células T específicas de CEA (V8T) y las células T específicas de MUC-1 (T-1191-P93L) fueron estimuladas con DC no infectadas autólogas solas o pulsadas con el péptido CEA (CAP1-6D) o con el péptido MUC-1 (P-93L); DC infectadas con el vector de control V-WT solas o pulsadas con los péptidos CEA o MUC-1; DC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM, rV-CEA(6D)-TRICOM o rV-MUC-1 más rV-TRICOM. Los péptidos se utilizaron a una concentración de 25 μ g/ml. La razón de efector a APC era de 10:1. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas y se escrutaron para determinar para la producción de IFN- γ .

Tabla 13

Producción de IFN-gamma por células T específicos de CEA y MUC-1 establecidos mediante el uso de vectores rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM					
	Células dendríticas utilizadas como APC				
Línea de células T	No infectada	FP-WT	rF-CEA/MUC/TRICOM	No infectada + péptido CEA	No infectada + péptido MUC-1
T-RV	<15,6	<15,6	>1,000	976,3	514,0

Producción de IFN-gamma por células T específicos de CEA y MUC-1 establecidos mediante el uso de vectores rV-CEA/MUC/TRICOM o rF-CEA/MUC/TRICOM

Células dendríticas utilizadas como APC					
Línea de células T	No infectada	FP-WT	rF-CEA/MUC/TRICOM	No infectada + péptido CEA	No infectada + péptido MUC-1
T-RF	<15,6	<15,6	>1,000	550,0	446,0
T-RF(CEA)	<15,6	<15,6	403,9	729,2	<15,6
T-RF(MUC)	<5,6	<15,6	381,4	<15,6	626,8

Se generaron líneas de células T humanas T-RV, T-RF, T-RF (CEA) y T-RF (MUC) como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Estas líneas de células T se estimularon con DC autólogas infectadas solas o pulsadas con el péptido CEA o MUC-1, DC infectadas con el vector de control FP-WT, y DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM. Los péptidos se utilizaron a una concentración de 25 µg/ml; la razón de efector a APC era de 10:1. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro horas y se escrutaron para determinar para la producción de IFN-γ.

Tabla 14

Capacidad de las líneas de células T establecidas mediante el uso como APC de DC infectadas con rV-CEA/MUC/TRICOM y rF-CEA/MUC/TRICOM, para la lisis de las células tumorales humanas

Línea de células T	células C1R-A2 pulsadas con				MCF-7	SW1463	SK-Mel-24
	Sin péptido	Péptido CEA	Péptido MUC-1	Péptido PSA			
T-RV	-2,1 (1,26)	57,9 (4,5) ^a	50,0 (1,3) ^a	0,6 (2,4)	34,4 (0,1) ^b	27,8 (0,5) ^b	1,6 (1,1)
T-RF	3,58 (3,9)	62,0 (4,6) ^a	59,7 (0,8) ^a	3,8 (0,2)	31,0 (2,4) ^b	25,6 (1,2) ^b	2,7 (2,0)
T-RF(CEA)	4,3 (1,6)	62,8 (1,9) ^a	-1,9 (1,0)	2,7 (1,0)	4,2 (3,2)	32,3 (2,1) ^b	0,6 (3,5)
T-RF(MUC)	-1,6 (3,2)	-3,6 (5,5)	46,4 (3,3) ^a	1,4 (4,5)	38,2 (1,3) ^b	25,2 (1,3) ^b	0,1 (1,1)

Los resultados se expresan en % de lisis (DT). Las líneas de células T humanas T-RV, T-RF, T-RF(CEA) y T-RF(MUC) se establecieron como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se realizó un análisis de liberación de ¹¹¹In de 6 horas en células CLR-A2 y se realizó un análisis de liberación de ¹¹¹In de 16 horas en células MCF-7, SW1463 y SK-Mel-24. El péptido CEA (CAP1-6D), el péptido MUC-1 (P-93L), y el péptido PSA (PSA-3) se utilizaron a una concentración de 25 µg/ml. MCF-7 (línea celular de carcinoma de mama humano: HLA-A2+, positiva para MUC-1 y negativa para CEA); SW1463 (línea celular de carcinoma de colon: HLA-A2+, positiva para MUC-1 y positiva para CEA); SK-Mel-24 (línea celular de melanoma humano: HLA-A2+, negativa para MUC-1, negativa para CEA). La razón de efector a diana fue de 25:1.

^a Significación estadística (P <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células CIR-A2.

^b Significación estadística (P <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de células SK-Mel-24.

Tabla 15

El establecimiento de líneas de células T de pacientes con cáncer utilizando DC autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM demuestra reactividad con ambos epítomos de CEA y MUC-1

Células dendríticas utilizadas como APC						
Línea de células T	No infectada	FP-WT	rF-CEA/MUC1/TRICOM	No infectada + péptido CEA	No infectada + péptido MUC-1	No infectada + péptido PSA
T-55	<15,6	<15,6	>1.000	> 1.000	985,8	<15,6
T-49	<15,6	<15,6	> 1.000	974,2	819,0	<15,6
T-41	<15,6	<15,6	846,4	933,4	745,0	<15,6

Se establecieron T-55, T-49 y T-41 mediante la estimulación de células T aisladas de un paciente de cáncer de páncreas (Núm. 55) y pacientes de carcinoma de colon (Núm. 49 y Núm. 41) con células dendríticas autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM (MOI de 40), durante tres IVS. La razón de efector a APC era de 10:1. Los péptidos se utilizaron a una concentración de 25 µg/ml. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo de veinticuatro

El establecimiento de líneas de células T de pacientes con cáncer utilizando DC autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM demuestra reactividad con ambos epítomos de CEA y MUC-1

Células dendríticas utilizadas como APC						
Línea de células T	No infectada	FP-WT	rF-CEA/MUC1/TRICOM	No infectada + péptido CEA	No infectada + péptido MUC-1	No infectada + péptido PSA
horas y se escrutaron para determinar para la producción de IFN- γ . Los resultados se expresan en pg/ml de IFN- γ .						

Tabla 16

Capacidad de una línea de células T (T-55) establecida a partir de un paciente de páncreas utilizando como APC DC infectadas con rF-CEA/MUC/DC-TRICOM, para la lisis de células tumorales humanas

Efector: Diana	Sin péptido	Células C1R-A2 pulsadas con			MCF-7	SW1463	SK-Mel-24
		Péptido CEA ^a	Péptido MUC-1	Péptido PSA			
50:1	0 (0,6)	52,4 (3,3) ^a	53,3 (0,4) ^a	0(0,1)	23,8 (1,2) ^b	24,1 (1,2) ^b	0,5 (0,2)
25:1	0 (0,9)	30,3 (1,3) ^a	34,4 (0,8) ^a	0,6 (0,5)	20,4 (1,1) ^b	17,6 (0,3) ^b	0,4 (0,3)
12.5:1	0 (0,2)	16,4 (1,8) ^a	26,2 (5,0) ^a	0 (0,2)	13,8 (1,2) ^b	15,2 (0,4) ^b	0 (0,3)

Se realizó un análisis de liberación de ¹¹¹In de 6 horas en células C1R-A2 y se realizó un análisis de liberación de ¹¹¹In de 16 horas en células MCF-7, SW1463 y SK-Mel-24. Los resultados se expresan en % de lisis (DT). El péptido CEA (CAP1-6D), el péptido MUC-1 (P-93L), y el péptido PSA (PSA-3) se utilizaron todos a una concentración de 25 μ g/ml. MCF-7 (línea celular de carcinoma de mama humano: HLA-A2+, positivo para MUC-1 y negativo para CEA); SW1463 (línea celular de carcinoma de colon: HLA-A2+, positivo para MUC-1 y positivo para CEA); SK-Mel-24 (línea celular de melanoma humano: HLA-A2+, negativo para MUC-1, negativo para CEA).

T-55 se estableció mediante la estimulación de las células T aisladas de un paciente de páncreas (Núm. 55) con células dendríticas autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM (MOI de 40) durante tres IVS.

^a Significación estadística (P <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de las células C1R-A2.

^b La significación estadística (p <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de células SK-Mel-24 células.

Tabla 17

Capacidad de las líneas de células T (T-49 y T-41) establecidas a partir de pacientes de carcinoma de colon utilizando como APC DC infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM, para la lisis de las células tumorales humanas

Líneas de células T		MCF-7	SW1463	SK-Mel-24
T-49	40:1	20,6 (0,9) ^a	42,9 (1,9) ^a	0,8 (0,1)
	20:1	12,0 (1,6) ^a	30,2 (0,3) ^a	0,2 (0,2)
	10:1	6,7 (1,0)	21,9 (2,1) ^a	1,9 (0,8)
T-41	40:1	24,4 (1,6) ^a	33,4 (1,3) ^a	0,9 (0,3)
	20:1	20,5 (1,2) ^a	26,1 (1,1) ^a	1,2 (0,5)
	10:1	11,0 (2,0) ^a	20,1 (0,1) ^a	2,0 (0,2)

Las líneas de células T-41 y T-49 se establecieron mediante la estimulación de células T aisladas de pacientes con carcinoma de colon (Núm. 49 y Núm. 41) con DC autólogas infectadas con rF-CEA/MUC/TRICOM (MOI de 40), durante tres IVS. Se realizó un análisis de liberación de ¹¹¹In de 16 horas en células MCF-7, SW1463 y SK-Mel-24. Los resultados se expresan en % de lisis (DT). MCF-7 (línea celular de carcinoma de mama humano: HLA-A2+, positiva para MUC-1 y negativa para CEA); SW1463 (línea celular de carcinoma de colon: HLA-A2+, positiva para MUC-1 y positiva para CEA); SK-Mel-24 (línea celular de melanoma humano: HLA-A2+, negativa para MUC-1, negativa para CEA).

^a Significación estadística (P <0,01, prueba de la t de dos colas) al comparar la lisis de células SK-Mel-24.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado de hasta 12 aminoácidos de longitud y que comprende la secuencia de aminoácidos del SED ID NO: 1, 14, 15, 16, o 19.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, en donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 20, 21, 33, 34, y 35.
4. Un vector de ácido nucleico que comprende una o más moléculas de ácido nucleico de la reivindicación 2 o 3, conectado operativamente a un promotor inducible.
- 15 5. Una célula anfitriona que comprende el vector de la reivindicación 4.
6. El uso de la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2 o 3 para la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1.
- 20 7. El uso del vector de ácido nucleico de la reivindicación 4 para la fabricación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1.
8. El uso de la reivindicación 6 o 7, en donde la respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1 es una respuesta inmunitaria generada contra un tumor MUC-1.
- 25 9. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria a un antígeno tumoral MUC-1.
- 30 10. El uso de uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a un tumor MUC-1.
- 35 11. Uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible a un tumor MUC-1.
12. El uso de células dendríticas de un sujeto afectado de cáncer, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor MUC-1, en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto afectado de cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 antes de ser administradas al sujeto.
- 40 13. Las células dendríticas de un sujeto afectado de cáncer para su uso en el tratamiento de un tumor MUC-1, en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto afectado de cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 antes de ser administradas al sujeto.
- 45 14. El uso de uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 fusionados a un inmunógeno débil para la fabricación de un medicamento para la generación de una respuesta inmunitaria al inmunógeno débil.
15. El uso de la reivindicación 14 en donde el inmunógeno débil es un antígeno de diferenciación, o un antígeno tumoral.
- 50 16. El uso de la reivindicación 14, en donde los uno o más polipéptidos comprenden la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 19.
17. El uso de la reivindicación 16, en donde el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 19 se fusiona a un antígeno carcinoembrionario, un antígeno viral, o un auto-antígeno.
- 55 18. Uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 fusionados a un inmunógeno débil para su uso en la generación de una respuesta inmunitaria al inmunógeno débil.
- 60 19. El uso de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor MUC-1, en donde las PBMC se activan poniendo las PBMC en contacto con células dendríticas, y en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto afectado de cáncer y se tratan con uno o más de los

polipéptidos de la reivindicación 1 antes de que las PBMC activadas sean administradas al sujeto.

20. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto afectado de cáncer para su uso en el tratamiento de un tumor MUC-1,
- 5 en donde las PBMC se activan poniendo en contacto las PBMC con células dendríticas, y en donde las células dendríticas se aíslan de un sujeto afectado de cáncer y se tratan con uno o más de los polipéptidos de la reivindicación 1 antes de que las PBMC activada sean administradas al sujeto.

Figura 1B

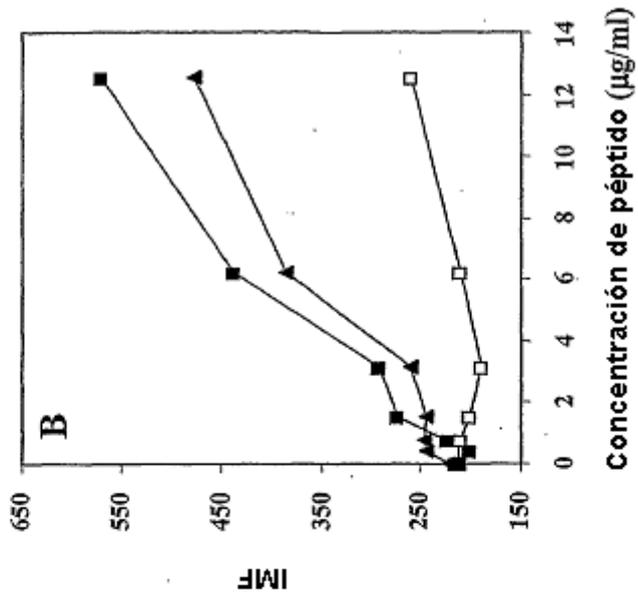


Figura 1A

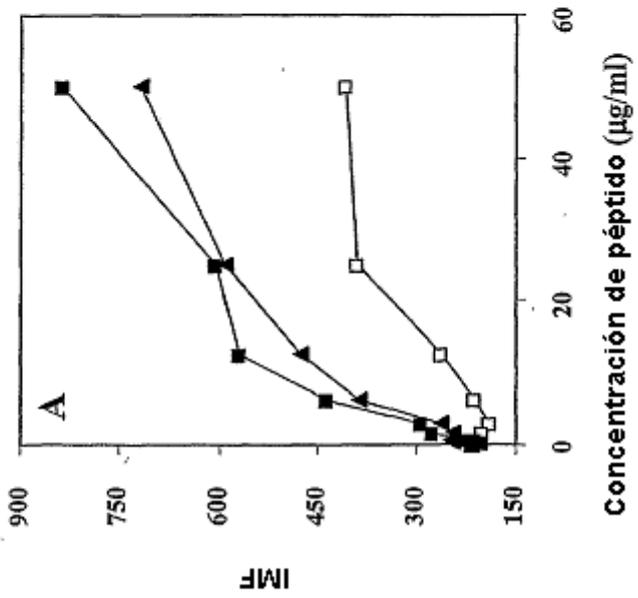


Figura 2.

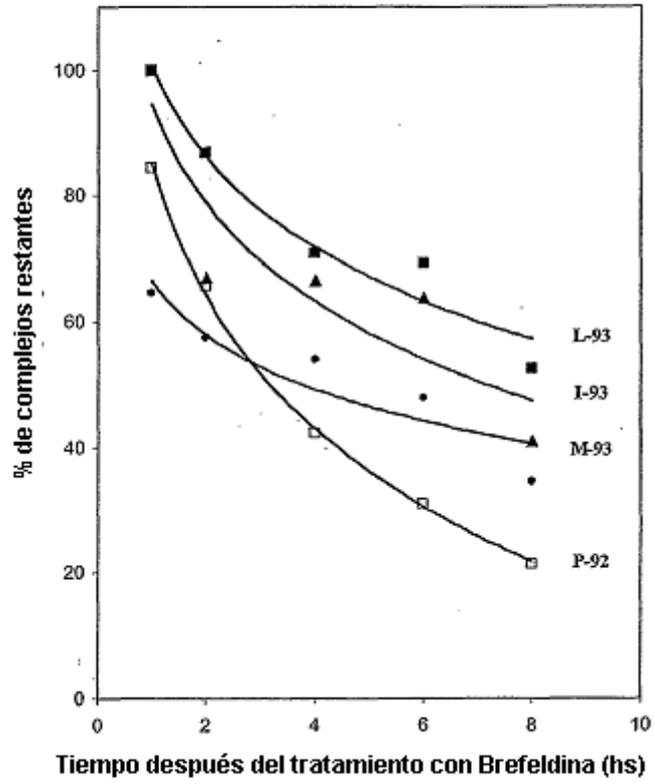


Figura 3

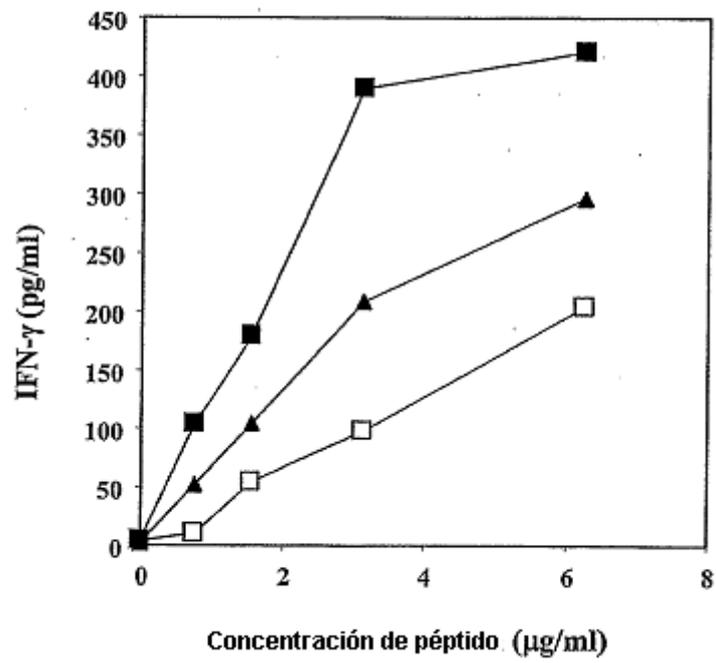
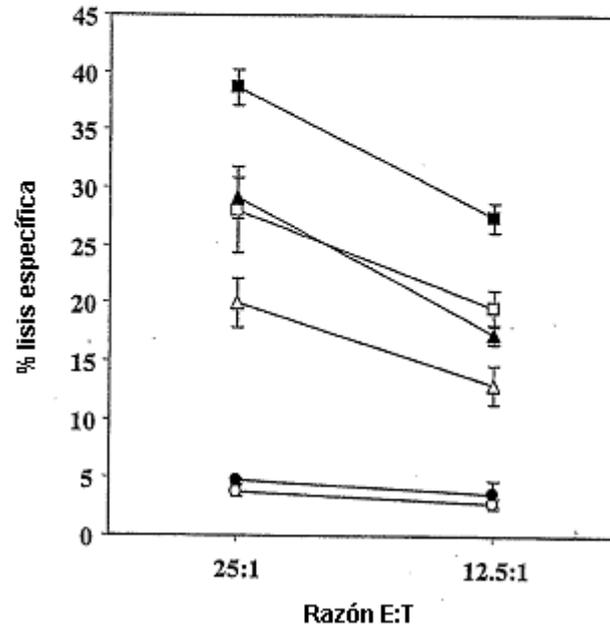


Figura 4



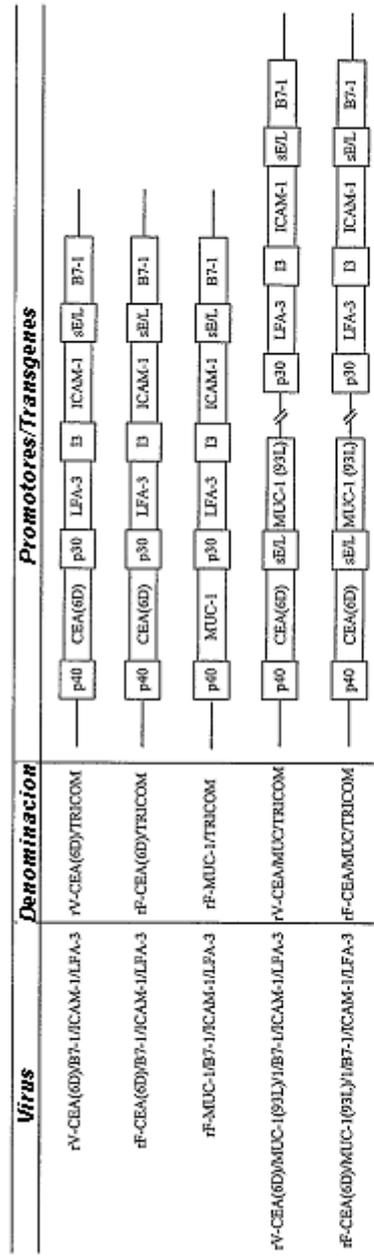


Figura 5

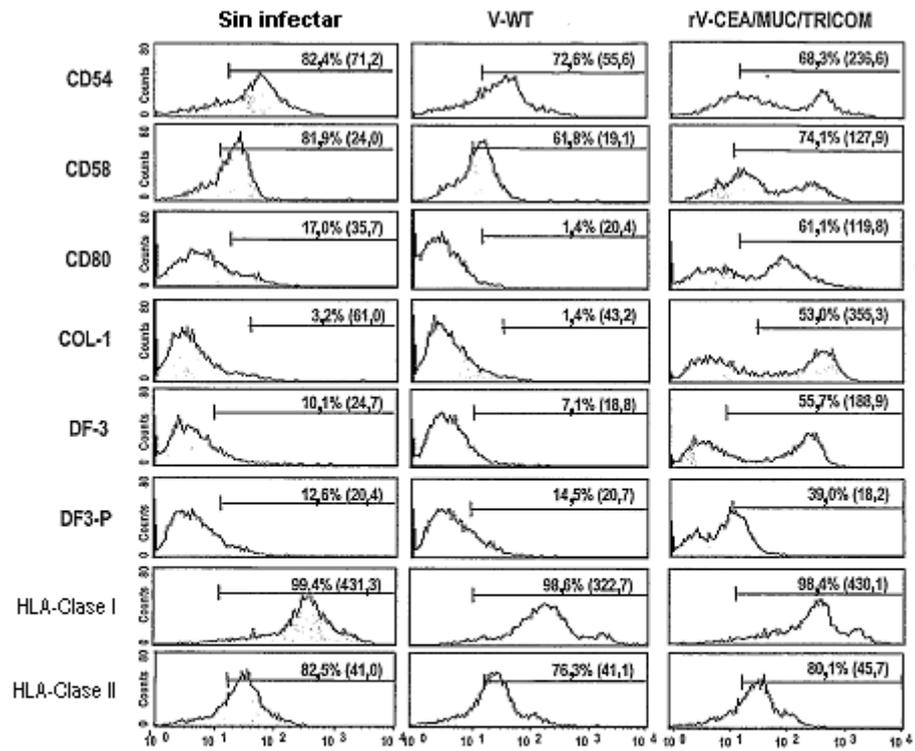


Figura 6

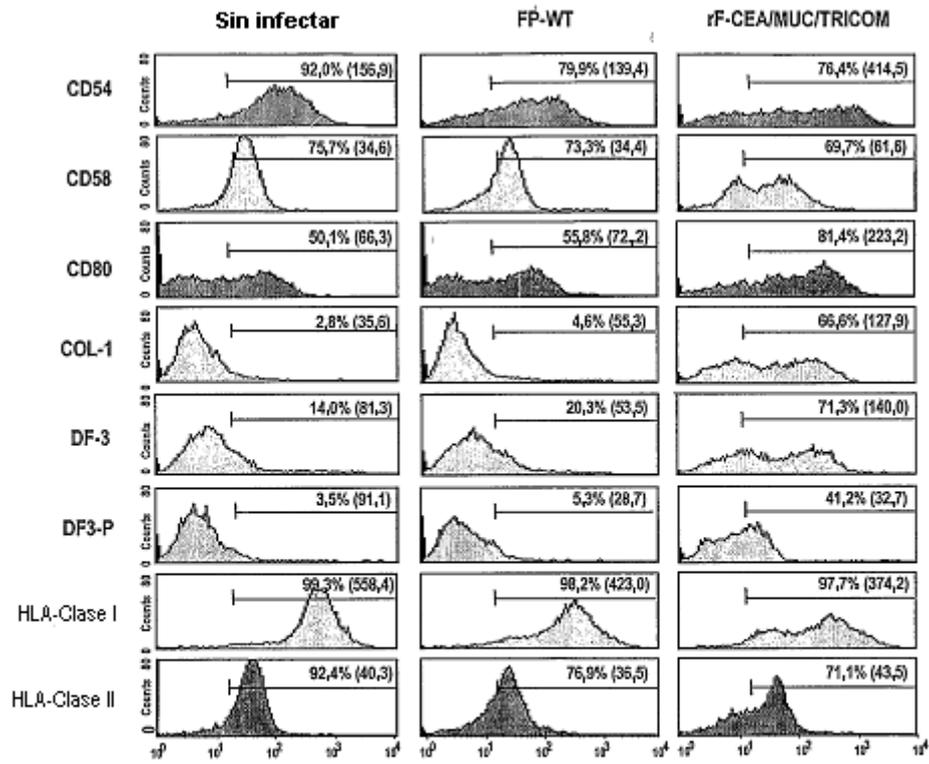


Figura 7

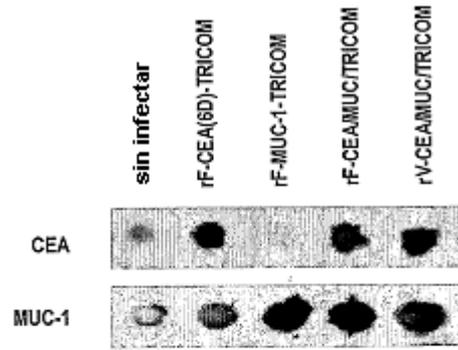


Figura 8

1 AAGACACCGG GACCCGAGTC TCCCTTCCTC CACGCTGTC TCCTACAGGT GCTTACAGTT
 61 GATTACGGGT CTGTCATGTC AAGCTCAGC CCAGGTGGG AAGAGGAGAC TTGGCTTACC
 121 CAGAGAGTT CAGTGGCCAG CTCTACTGAG AAGATGCTG AAGATGAGC AGCTCCGTA
 181 CTCTCAGCC ACGCTCCCG TTCCAGCTCC TCCACCACT AGGACAGGA TGTCACTCTG
 241 GCCCGGCCA CAGACCCAGC TTAGGTTCA GCTGCTTGT GGGACAGGA TGTCACTCTG
 301 GTACCAATTA CTAGACCCAGC TTAGGTTAGC ACGACACTC CTGCTCATGG AGTACTAGT
 361 GCTCCTGATA CTGCTCCAGC TCCGCGAGT ACTGACCCG CCGGACHTGG GGTACATCA
 421 GCACCTGATA CAGACCTGAC ACCCTGATCT ACGAGCCGC CTGGCCACGG AGTACACAGC
 481 GCGCCGATA CCGGCGCCG TCCCGGTAGC ACGGACGCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 541 GCACCCGATA CCGGCGCCG ACCCGGAGT ACCGCTCCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 601 GCGCCGATA CTGACCTGAC CCGGAGTGC ACTGACCCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 661 GCTCCTGATA CCGGCGCCG TCCCGGTAGC ACGGACGCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 721 GCTACCCAGA CCGGCGCCG TCCCGGTAGC ACGGACGCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 781 ACTCCTGATA CCGGCGCCG TCCCGGTAGC ACGGACGCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 841 ACGGACGCG CCGGCGCCG TCCCGGTAGC ACGGACGCG CCGCCACCGG TGTACAGT
 901 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 961 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1021 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1081 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1141 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1201 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1261 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1321 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1381 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1441 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT
 1501 TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT TCTTCTCTTT

SECUENCIA DE wMUC-1(6)

Figura 9

