

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 573**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/US2010/034082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO2010129895**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10772898 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2427485**

54 Título: **Epítomos de CD133**

30 Prioridad:

07.05.2009 US 176302 P

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**IMMUNOCELLULAR THERAPEUTICS,LTD
(100.0%)
21900 Burbank Boulevard 3rd. Floor
Woodland Hills, CA 91367, US**

72 Inventor/es:

**SINGH, MANISH y
BENDER, JAMES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 618 573 T3

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

DESCRIPCIÓN

Epítomos de CD133

CAMPO TÉCNICO

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

5 ANTECEDENTES

El marcador de superficie celular CD133 (Prominina 1) es expresado por las células madre neuronales y se ha utilizado para seleccionar las células madre de cáncer de cerebro. Además, células CD133 positivas están altamente enriquecidas para las células madre cancerosas en el cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, mieloma múltiple y melanoma.

10 El documento US 2008/0206286 A1 describe epítomos específicos para células T de la región entre el extremo N-terminal y el centro de la proteína CD133, específicamente de la región de los aa 116-270 y la región de los aa 325-350.

SUMARIO

15 La presente invención se define por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes describen otras realizaciones de la invención.

20 Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento de péptidos de CD133 humano que se unen a antígenos de leucocitos humanos (HLA) y pueden estimular las respuestas inmunes. Estos péptidos se pueden utilizar en la inmunoterapia de cánceres. Por consiguiente, se proporcionan en esta memoria composiciones para la inmunoterapia del cáncer y métodos para inducir respuestas inmunes en pacientes con cáncer contra los antígenos tumorales.

25 En un aspecto, la invención presenta un inmunógeno que incluye un péptido aislado que incluye la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ó 21 con dos o menos, una o cero sustituciones de aminoácidos (p. ej., sustituciones conservadoras). En algunas realizaciones, el inmunógeno es de 100 residuos de aminoácidos o menos, 80 residuos de aminoácidos o menos, 60 residuos de aminoácidos o menos, 50 residuos de aminoácidos o menos, 40 residuos de aminoácidos o menos, 30 residuos de aminoácidos o menos, 20 residuos de aminoácidos o menos, 15 residuos de aminoácidos o menos, 14 residuos de aminoácidos o menos, 13 residuos de aminoácidos o menos, 12 residuos de aminoácidos o menos, 11 residuos de aminoácidos o menos, 10 residuos de aminoácidos o menos o 9 residuos de aminoácidos). En algunas realizaciones, el inmunógeno comprende no más de no más de 100 residuos de aminoácidos, no más de 80 residuos de aminoácidos, no más de 60 residuos de aminoácidos, no más de 50 residuos de aminoácidos, no más de 40 residuos de aminoácidos, no más de 30 residuos de aminoácidos, no más de 20 residuos de aminoácidos, no más de 15 residuos de aminoácidos, no más de 14 residuos de aminoácidos, no más de 13 residuos de aminoácidos, no más de 12 residuos de aminoácidos, no más de 11 residuos de aminoácidos, no más de 10 residuos de aminoácidos o no más de 9 residuos de aminoácidos) de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, el inmunógeno incluye una variante de superagonista de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ó 21. En algunas realizaciones, el inmunógeno no incluye la secuencia FLLPALIFAV (SEQ ID NO: 27).

30 En otro aspecto, la invención presenta composiciones que incluyen un inmunógeno descrito en esta memoria unido a un soporte inmunogénico, p. ej., una albúmina de suero, toxoide tetánico, hemocianina de lapa bocallave, dextrano, un agonista de un receptor tipo Toll (TLR) o una partícula de virus recombinante.

40 En otro aspecto, la invención presenta polinucleótidos que incluyen una secuencia de ácido nucleico que codifica un inmunógeno descrito en esta memoria. Los polinucleótidos pueden incluir un vector de expresión, p. ej., un plásmido o un vector viral no replicativo (p. ej., vacuna, viruela aviar, virus de la encefalitis equina venezolana, virus adeno-asociado y adenovirus). En algunas realizaciones, el vector de expresión es un virus, p. ej., un virus de ARN o ADN.

5 En otro aspecto, la invención presenta composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas o de vacuna) que incluyen un inmunógeno o polinucleótido descrito en esta memoria. Las composiciones pueden incluir, además, un adyuvante (p. ej., adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, Montanide ISA-51, LAG-3, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre o saponina), una citoquina (p. ej., interleuquina-1 (IL- 1), IL-2, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de células madre (SCF) o factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF)), y/o un agonista de un receptor de tipo Toll (TLR) (p. ej., un agonista de TLR-3, TLR-4, TLR-7 o TLR-9). Las composiciones pueden incluir un vehículo, p. ej., un liposoma (p. ej., una emulsión, una espuma, una micela, una monocapa insoluble, un cristal líquido, una dispersión de fosfolípidos o una capa laminar), un complejo inmunoestimulante (ISCOM), o una partícula de liberación lenta.

10 En un aspecto adicional, la invención presenta métodos de inmunización que incluyen administrar a un sujeto un inmunógeno, polinucleótido, o la composición descrita en esta memoria en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmune (p. ej., una respuesta inmune terapéutica o profiláctica). La invención también presenta el uso de un inmunógeno, polinucleótido o composición descrito en esta memoria en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmune. La invención también presenta el uso de un inmunógeno, polinucleótido o composición descrito en esta memoria para estimular una respuesta inmune.

20 En otro aspecto, la invención presenta métodos para tratar un sujeto con un cáncer (p. ej., un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan una molécula de MHC clase I). Los métodos incluyen administrar al sujeto un inmunógeno, polinucleótido o la composición descrita en esta memoria en una cantidad eficaz para inducir una respuesta de CTL a las células tumorales. La invención también presenta el uso de un inmunógeno, polinucleótido o la composición descrita en esta memoria en la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto con un cáncer (p. ej., un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan una molécula de MHC clase I). La invención también presenta el uso de un inmunógeno, polinucleótido o la composición descrita en esta memoria para tratar a un sujeto con un cáncer (p. ej., un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan una molécula de MHC clase I).

25 En un aspecto adicional, la invención presenta métodos para tratar un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3. Los métodos incluyen administrar al sujeto linfocitos T citotóxicos (CTLs) inducidos en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de la lisis directa o para efectuar la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas, en que los CTLs son inducidos por un proceso que incluye inducir un CTL in vitro que es específico para las células tumorales en contacto con un CTL precursor con un inmunógeno descrito en esta memoria en condiciones que generan una respuesta CTL a las células tumorales. La invención también presenta el uso de un inmunógeno, polinucleótido o composición descrito en esta memoria en la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3. La invención también presenta el uso de un inmunógeno, polinucleótido o composición descrito en esta memoria para tratar un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3.

40 En otro aspecto, la invención presenta métodos para tratar un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan cualquier molécula de MHC clase I. Los métodos incluyen administrar al sujeto linfocitos T citotóxicos (CTLs) inducidos en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de la lisis directa o para efectuar la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas, dichos CTLs son inducidos por un procedimiento que comprende inducir un CTL in vitro que es específico para dichas células tumorales en contacto con un CTL precursor con un inmunógeno descrito en esta memoria en condiciones que generan una respuesta CTL a las células tumorales.

45 En un aspecto adicional, la invención presenta métodos para inducir un linfocito T citotóxico (CTL) in vitro que es específico para una célula tumoral que expresa HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3. Los métodos incluyen poner en contacto un CTL precursor con un inmunógeno descrito en esta memoria en condiciones que generan una respuesta CTL a las células tumorales.

50 En otro aspecto, la invención presenta métodos para inducir una respuesta de un linfocito T citotóxico (CTL) in vitro que es específico para una célula tumoral que expresa HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3. Los métodos incluyen poner en contacto un CTL precursor con una célula que incluye un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido que incluye un inmunógeno descrito en esta memoria.

En un aspecto adicional, la invención presenta métodos para tratar un sujeto con un cáncer caracterizado por células tumorales que expresan HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3. Los métodos incluyen administrar CTLs inducidos por un método descrito en esta memoria en una cantidad eficaz para destruir las células tumorales a través de la lisis

directa o para efectuar la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas.

5 La invención también presenta métodos para tratar un cáncer en un paciente, que incluyen administrar al paciente una composición que comprende células presentadoras de antígeno (p. ej., células dendríticas), en que las células presentadoras de antígeno presentan en su superficie un epítipo de péptido que comprende la secuencia amino de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-21 con cuatro o menos (p. ej., tres o menos, dos o menos, una o cero) sustituciones de aminoácidos (p. ej., sustituciones conservadoras) o una variante superagonista de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-21. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígenos (p. ej., células dendríticas) adquieren los epítipos de péptido in vitro por la exposición a péptidos sintéticos que tienen los epítipos de péptidos. La invención también presenta el uso de células presentadoras de antígenos que presentan en su superficie un inmunógeno descrito en esta memoria en la preparación de un medicamento para tratar un sujeto con cáncer. La invención también presenta el uso de células presentadoras de antígenos que presentan en su superficie un inmunógeno descrito en esta memoria para el tratamiento de un sujeto con cáncer.

15 En un aspecto adicional, la invención presenta métodos para preparar una vacuna de células para el tratamiento de un cáncer. Los métodos incluyen: obtener células mononucleares derivadas de la médula ósea de un paciente, cultivar las células mononucleares in vitro en condiciones en las que las células mononucleares se vuelven adherentes a un recipiente de cultivo; seleccionar un subconjunto de las células mononucleares que comprenden células adherentes; cultivar las células adherentes en presencia de una o más citoquinas en condiciones en las que las células se diferencian en células presentadoras de antígenos; y cultivar las células presentadoras de antígenos en presencia de un inmunógeno descrito en esta memoria en condiciones en las que las células presentan los péptidos sobre las moléculas de histocompatibilidad principal de clase I, preparando de este modo una vacuna de células.

En cualquiera de los aspectos anteriores, un cáncer o tumor pueden incluir una o más células que expresan CD133.

25 En otro aspecto, la invención presenta kits que incluyen uno o más inmunógenos, polinucleótidos y/o composiciones descritos en esta memoria.

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

35 A menos que se defina lo contrario, los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton et al, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001); y Lutz et al., Handbook of Dendritic Cells: Biology, Diseases and Therapies, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2006), proporcionan a un experto en la materia una guía general para muchos de los términos y expresiones utilizados en la presente solicitud. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, regirá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 Figs. 1A-C representan un alineamiento múltiple de proteínas CD133 humana (Hsap, SEQ ID NO: 26), chimpancé (Ptr, SEQ ID NO: 30), macaco Rhesus (Mmul, SEQ ID NO: 31), rata (Rnor, SEQ ID NO: 32), ratón (Mmus, SEQ ID NO: 33), perro (Cfam, SEQ ID NO: 34) y ganado (Btau, SEQ ID NO: 35). El alineamiento múltiple se preparó

utilizando ClustalW2 (Larkin et al, 2007, Bioinformatics. 23: 2947-48). "**", los residuos son idénticos en todas las secuencias; ".", sustituciones conservadas; ".", sustituciones semi-conservadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 La presente invención se refiere a inmunógenos y composiciones inmunogénicas, y a métodos de uso de los mismos, para la prevención, el tratamiento y/o diagnóstico de los cánceres. Se describen en esta memoria inmunógenos que incluyen proteínas o polipéptidos, cuyas secuencias de aminoácidos incluyen uno o más oligopéptidos epitópicos. Adicionalmente, la invención se refiere, además, a polinucleótidos que se pueden utilizar para estimular una respuesta CTL contra cánceres.

10 Se describen en esta memoria secuencias de oligopéptidos específicas con las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 1-21, que representan péptidos epitópicos (es decir, secuencias de oligopéptidos inmunogénicos) de al menos aproximadamente 9 a 10 aminoácidos de longitud.

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

15 Una secuencia de CD 133 humano a modo de ejemplo tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 26).

```
MALVLGSLLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKA
GPIGILFELVHIFLYVYVQPRDFPEDTLRKFQKAYESKIDYDKPETVIL
GLKIVYYEAGIILCCVLGLLFIILMPLVGYFFCMCRCCNKGGMHQQRQ
KENGPFRLRKCFAISLLVICIIISIGIFYGFVANHQVTRIKRSRKLADS
NFKDLRLLNETPEQIKYILAQYNTTKDKAFTDLNSINSVLGGGILDRL
RPNIIPVLDEIKSMATAIKETKEALENMNSTLKS LHQQSTQLSSSLTSV
KTSLSRSSLNDPLCLVHPSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQLPPVDAELD
NVNNVLRDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQRQTTTVVAGIKRVLNSIGSD
IDNVTQRLPIQDILSAFVYVNNTESYIHRNLP TLEEYDSYWWLGGGLVI
CSLLTLIVIFYYLGLLGGVCGYDRHATPTTRGCVSNTGGVFLMVGVGLS
FLFCWILMIIVVLTFFVFGANVEKLICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWE
YYLSGKLFNKSKMKLTFEQVYSDCKKNRGTYGTLHLQNSFNISEHLNIN
EHTGSI SSELES LKVN LNI FLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDSYLAQ
TGKSPAGVNL LSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVL
PIEQSLSTLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASLDFAQNFI TNNTSSVI
IEETKKYGR TIIIGYFEHYLQWIEFSISEKVASCKPVATALDTAVDVFLC
SYIIDPLNLFWFVGIGKATVFLLPALIFAVKLAKYRRMDS EDVYDDVET
IPMKNMENGNGYHKDHYVGIHNPVMTSPSQH (SEQ ID NO:26)
```

20 Los polipéptidos que forman los inmunógenos descritos en esta memoria tienen secuencias de aminoácidos que incluyen las SEQ ID NOs: 1-21 y variantes de los mismos con cuatro o menos (p. ej., tres o menos, dos o menos, una o cero) sustituciones de aminoácidos (p. ej., sustituciones conservadoras).

25 Tales polipéptidos pueden ser de cualquier longitud deseada con tal de que tengan actividad inmunogénica, debido a que son capaces, bajo un conjunto dado de condiciones, de provocar in vitro o in vivo la activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) (es decir, una respuesta CTL) contra una presentación de CD133 in vitro o in vivo por una célula presentadora de antígenos (APC). Polipéptidos a modo de ejemplo incluyen los de 800 residuos aminoácidos o menos (p. ej., 700 residuos de aminoácidos o menos, 600 residuos de aminoácidos o menos, 500 residuos de aminoácidos o menos, 400 residuos de aminoácidos o menos, 300 residuos de aminoácidos o menos, 200 residuos

de aminoácidos o menos, 150 residuos de aminoácidos o menos, 100 residuos de aminoácidos o menos, 80 residuos de aminoácidos o menos, 60 residuos de aminoácidos o menos, 50 residuos de aminoácidos o menos, 40 residuos de aminoácidos o menos, 30 residuos de aminoácidos o menos, 20 residuos de aminoácidos o menos, 15 residuos de aminoácidos o menos, 14 residuos de aminoácidos o menos, 13 residuos de aminoácidos o menos, 12 residuos de aminoácidos o menos, 11 residuos de aminoácidos o menos, 10 residuos de aminoácidos o menos o 9 residuos de aminoácidos). Los polipéptidos que forman los inmunógenos descritos en esta memoria pueden presentarse de forma natural o pueden sintetizarse químicamente. Los polipéptidos pueden incluir al menos una de las SEQ ID NOs: 1-21.

En algunos ejemplos, un inmunógeno descrito en esta memoria puede ser una secuencia variante tal como el homólogo de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-21 de la proteína CD133 de una especie animal (p. ej., chimpancé, macaco Rhesus, rata, ratón, perro o ganado). Un péptido homólogo se puede identificar alineando las proteínas CD133 humana y animal (p. ej., tal como se muestra en las Figs. 1A-C) y seleccionando la secuencia de la proteína animal que se alinea con la porción de la secuencia humana correspondiente al péptido de interés. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 11 y sus homólogos de animales se muestran en subrayado en la Fig. 1C. En algunos casos, el inmunógeno de secuencia homóloga puede tener más de cuatro diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia humana.

Oligopéptidos tal como se describen en esta memoria pueden por sí mismos prepararse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Grant, G.A., *Synthetic Peptides: A User's Guide*, 1992, W. H. Freeman and Company, Nueva York; Coligan, J. E. et al, *Current Protocols in Protein Science*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Además de las secuencias SEQ ID NOs: 1-21, las proteínas y los polipéptidos que forman los inmunógenos descritos en esta memoria también pueden incluir uno o más de otros tramos inmunogénicos de aminoácidos que se sabe están asociados con cánceres, y que pueden estimular una respuesta de CTL, con lo que los péptidos inmunogénicos se asocian con HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A1/A11, supertipos HLA, o cualquier molécula de MHC clase I (es decir, MHC-1).

Los oligopéptidos y polipéptidos descritos en esta memoria se pueden derivar por fraccionamiento de proteínas que se producen de forma natural por métodos tales como tratamiento con proteasas, o se pueden producir por metodologías recombinantes o sintéticas que son bien conocidas y son claras para el experto en la materia. Véase, p. ej., Ausubel, F. M. et al, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Coligan, J. E. et al, *Current Protocols in Protein Science*, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. El polipéptido puede incluir un polipéptido recombinante o sintético que incluye al menos una de SEQ ID NOs: 1-21, secuencias que también pueden estar presentes en múltiples copias. Por lo tanto, oligopéptidos y polipéptidos descritos en esta memoria pueden tener uno, dos, tres o más péptidos inmunogénicos de este tipo dentro de la secuencia de aminoácidos de dichos oligopéptidos y polipéptidos, y dichos péptidos inmunogénicos, o epítopos, pueden ser iguales o pueden ser diferentes, o pueden tener cualquier número de tales secuencias, en donde algunos de ellos son idénticos entre sí en la secuencia de aminoácidos, mientras que otros dentro de la misma secuencia de polipéptido son diferentes unos de otros y dichas secuencias epitópicas pueden producirse en cualquier orden dentro de dicha secuencia de polipéptido inmunogénica. La ubicación de estas secuencias dentro de la secuencia de un polipéptido que forma un inmunógeno descrito en esta memoria puede afectar a la actividad inmunogénica relativa. Además, los inmunógenos descritos en esta memoria pueden incluir más de una proteína que comprende las secuencias de aminoácidos descritas en esta memoria. Tales polipéptidos pueden ser parte de una sola composición o pueden estar por sí mismos unidos de forma covalente o no covalente entre sí.

Los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria también pueden estar unidos, directamente o a través de un espaciador o enlazador a: un soporte inmunogénico tal como albúmina de suero, toxoide tetánico, hemocianina de lapa bocallave, dextrano, o una partícula de virus recombinante; un agonista de receptor de tipo Toll (TLR); un péptido inmunogénico conocido por estimular una respuesta inmune de tipo de célula T cooperadora; una citoquina tal como interferón gamma o GM-CSF; un agente fijador de objetivo tal como un anticuerpo o ligando de receptor; un agente estabilizante tal como un lípido; o un conjugado de una pluralidad de epítopos a una estructura de núcleo de lisina ramificado, tal como el llamado "péptido antigénico múltiple" descrito en Posneft et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 1719-1725; un compuesto tal como polietilenglicol para aumentar la semivida del péptido; o aminoácidos adicionales tales como una secuencia líder o secretora, o una secuencia empleada para la purificación de la secuencia madura. Los espaciadores y enlazadores incluyen típicamente moléculas relativamente pequeñas, neutras tales como aminoácidos y que están sustancialmente descargados bajo condiciones fisiológicas.

Espaciadores de este tipo se seleccionan típicamente de entre el grupo de aminoácidos no polares o neutros tales como glicina, alanina, serina y otros aminoácidos similares. Tales espaciadores o enlazadores opcionales no necesitan incluir los mismos residuos y, así, pueden ser homo- o hetero-oligómeros. Cuando están presentes, dichos enlazadores tendrán comúnmente una longitud de al menos uno o dos, comúnmente 3, 4, 5, 6, y posiblemente tanto

- 5 como 10 o incluso hasta 20 residuos (en el caso de los aminoácidos). Además, tales enlazadores no tienen que estar compuestos de aminoácidos, pero cualquier estructura oligomérica será también tan larga, ya que proporcionan el espacio correcto con el fin de optimizar el nivel deseado de actividad inmunogénica de los inmunógenos descritos en esta memoria. Por lo tanto, el inmunógeno puede adoptar cualquier forma que sea capaz de provocar una respuesta CTL.
- 10 Además, los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria pueden ser parte de una estructura inmunogénica a través de uniones distintas a los enlaces peptídicos convencionales. Por lo tanto, cualquier forma de fijación de los péptidos a un inmunógeno descrito en esta memoria, tal como un polipéptido inmunogénico, podría proporcionar una estructura inmunogénica. Por lo tanto, los inmunógenos, tales como proteínas, oligopéptidos y polipéptidos, son
- 15 estructuras que contienen los péptidos descritos, pero tales péptidos inmunogénicos pueden no necesariamente estar unidos a la misma por medios convencionales de utilizar enlaces de péptidos ordinarias. Los inmunógenos descritos en esta memoria simplemente contienen dichos péptidos como parte de su constitución, pero la forma en la que dichos péptidos se han de combinar para formar el inmunógeno final se deja al talento y la imaginación del usuario y de modo alguno se restringe o limita por la descripción contenida en esta memoria.

Se ha de apreciar que un inmunógeno descrito en esta memoria puede consistir solamente en un péptido de SEQ ID NOs: 1-21 (o una variante del mismo), o puede incluir un péptido de SEQ ID NOs: 1-21 (o una variante del mismo), o puede incluir una pluralidad de péptidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1-21 (o una o más variantes de los mismos), o puede incluir un polipéptido que por sí mismo incluye uno o más de los péptidos epitópicos de SEQ ID NOs: 1-21 (o una o más variantes de los mismos). En algunas realizaciones, un inmunógeno, una composición o un kit descrito en esta memoria puede incluir además o excluir un polipéptido, epítipo u otra composición antigénica descrita en los

- 20 documentos US 2007/0020297; US 2008/0206296; US 2008/0311142; o WO 2010/028066.

Péptidos Modificados

Los péptidos que son procesados de forma natural y están unidos a una molécula de MHC clase I y que son reconocidos por un CTL específico para tumores, no son necesariamente los péptidos óptimas para estimular una respuesta de CTL. Véase, p. ej., Parkhurst et al., 1996, J. Immunol., 157:2539-48; Rosenberg et al., 1998, Nat. Med., 4:321-32. Por lo tanto, puede existir utilidad en la modificación de un péptido, de manera que induzca de una manera más fácil o efectiva una respuesta de CTL. Típicamente, los péptidos pueden ser modificados en dos tipos de posiciones. Los péptidos se pueden modificar en los residuos de aminoácidos que se predice interactuarán con la molécula de MHC clase I, en cuyo caso el objetivo es crear un péptido que tenga una mayor afinidad por la molécula de MHC clase I que la que tiene el péptido inicial. Los péptidos también se pueden modificar en los residuos de aminoácidos que se predice interactuarán con el receptor de células T en el CTL, en cuyo caso el objetivo es crear un péptido que tenga una mayor afinidad por el receptor de células T que la que tiene el péptido original. Ambos de estos tipos de modificaciones pueden dar como resultado un péptido variante que se relaciona con un péptido original, pero que es más capaz de inducir una respuesta de CTL que es el péptido original. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "péptido original" significa un oligopéptido con la secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1-21.

- 30
- 35
- 40

Los péptidos originales descritos en esta memoria pueden ser modificados por la sustitución de uno o más residuos en sitios distintos, posiblemente selectivos, en la cadena de péptido. Sustituciones de este tipo pueden ser de naturaleza conservadora, por ejemplo, en donde un aminoácido se reemplaza por un aminoácido de estructura y características similares tales como cuando un aminoácido hidrofóbico es reemplazado por otro aminoácido hidrofóbico. Incluso más conservador sería el reemplazo de aminoácidos del mismo o de un tamaño y naturaleza química similares, tal como cuando la leucina se reemplaza por isoleucina. En los estudios de variaciones de la secuencia en familias de proteínas homólogas que se producen de forma natural, determinadas sustituciones de aminoácidos son más a menudo toleradas que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes en tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, y la misma es la base para la definición de "sustituciones conservadoras".

- 45
- 50

Sustituciones conservadoras se definen en esta memoria como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1 - residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Grupo 2 - residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupo 3 - residuos polares,

cargados positivamente (His, Arg, Lys); Grupo 4 - residuos grandes, alifáticos, no polares (Met, Leu, Ile, Val, Cys); y Grupo 4 - residuos grandes, aromáticos (Phe, Tyr, Trp).

5 Menos sustituciones conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro que tenga características similares, pero que es algo diferente en tamaño, tal como el reemplazo de una alanina por un residuo isoleucina. Sustituciones altamente no conservadoras pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por uno que es polar, o incluso por uno que es de carácter básico, o viceversa.

10 Sustituciones de este tipo también pueden incluir estructuras distintas de los L-aminoácidos comunes. Por lo tanto, D-aminoácidos pueden ser sustituidos por los L-aminoácidos que se encuentran comúnmente en los péptidos antigénicos descritos en esta memoria y, sin embargo, todavía pueden ser abarcados por la presente descripción. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándares (es decir, grupos R distintos de los que se encuentran en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados con fines de sustitución para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos.

15 Sobre la base de los ensayos de citotoxicidad, un péptido epitópico sustituido se considera sustancialmente idéntico al péptido de referencia si tiene al menos 10% de la actividad antigénica del péptido de referencia tal como se define por la capacidad del péptido sustituido de reconstituir el epítipo reconocido por un CTL en comparación con el péptido de referencia. Por lo tanto, cuando se compara la actividad lítica en la porción lineal de las curvas de efector:diana con concentraciones equimolares de los péptidos de referencia y sustituidos, el porcentaje observado que extermina específicamente las células diana incubadas con el péptido sustituido debe ser igual al del péptido de referencia a una relación de efector:diana que no es mayor que 10 veces por encima de la relación efector:diana del péptido de referencia a la que se realiza la comparación.

20 Por lo tanto, los epítipos descritos en esta memoria pueden ser idénticos a los epítipos que se producen de forma natural asociados a tumores o específicos para tumores, o pueden incluir epítipos que difieren en no más de 4 residuos del péptido de referencia, siempre y cuando tengan una actividad antigénica sustancialmente idéntica.

Preparación de Péptidos Inmunogénicos y Estructuras

25 Los péptidos inmunogénicos y los polipéptidos descritos en esta memoria se pueden preparar sintéticamente, mediante tecnología de ADN recombinante o se pueden aislar de fuentes naturales tales como las células tumorales que expresan el producto proteico original.

30 Los polipéptidos y oligopéptidos descritos en esta memoria pueden sintetizarse en disolución o sobre un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Diversos sintetizadores de péptidos automatizados se encuentran disponibles comercialmente y pueden utilizarse de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Grant, G. A., Synthetic Peptides: A User's Guide, 1992, W. H. Freeman and Company, Nueva York; Coligan, J. E. et al, Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Fragmentos de polipéptidos descritos en esta memoria también pueden ser sintetizados como productos intermedios en la síntesis de un polipéptido mayor.

35 Se puede emplear la tecnología de ADN recombinante, en donde una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido o polipéptido inmunogénico de interés se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión. Estos procesos son bien conocidos en la técnica para el experto en la materia tal como se describe en, p. ej., Coligan, J. E. et al, Current Protocols in Immunology, 2006, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, F. M. et al, Current Protocols in Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Por lo tanto, los péptidos o polipéptidos producidos de forma recombinante se pueden utilizar como los inmunógenos descritos en esta memoria.

45 Las secuencias codificantes para péptidos de la longitud contemplada en esta memoria también se pueden sintetizar en sintetizadores de ADN automatizados disponibles comercialmente, utilizando protocolos que son bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Grant, G. A., Synthetic Peptides: A User's Guide, 1992, W. H. Freeman and Company, Nueva York; Coligan, J. E. et al, Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las secuencias codificantes también se pueden modificar de tal manera que se producirá un péptido o polipéptido que incorpora una sustitución de aminoácidos deseada. La secuencia codificante puede estar provista de enlazadores apropiados, ligada en vectores de expresión adecuados que están comúnmente disponibles en la técnica, y la molécula de ADN o ARN resultante puede ser transformada o transfectada en huéspedes adecuados

5 para producir la proteína de fusión deseada. Un número de tales vectores y sistemas huéspedes adecuados están disponibles, y su selección se deja para el técnico experto. Para la expresión de las proteínas de fusión, la secuencia codificante se proporcionará con codones de inicio y parada operativamente unidos, regiones de promotor y terminador, y un sistema de replicación para proporcionar un vector de expresión para la expresión en la célula huésped deseada. Por ejemplo, secuencias de promotor compatibles con huéspedes bacterianos se proporcionan en plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de la secuencia codificante deseada. Los vectores de expresión resultantes se transforman en huéspedes bacterianos adecuados. También se pueden utilizar células huéspedes de levaduras, insectos y mamíferos, empleando vectores adecuados y secuencias de control.

10 Las células huéspedes pueden ser modificadas por ingeniería genética (p. ej., transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores descritos en esta memoria que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células huéspedes manipuladas pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes. Las condiciones de cultivo
15 tales como temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto ordinario en la técnica.

La presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias tan ampliamente descritas anteriormente. Las construcciones incluyen un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el que se ha insertado una secuencia descrita en esta memoria, en una orientación directa o inversa. En un
20 aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende, además, secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, unido operativamente a la secuencia. Por los expertos en la técnica se conoce un gran número de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente.

Células Huéspedes

25 En una realización adicional, la presente invención se refiere a células huéspedes que contienen las construcciones descritas anteriormente. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, o electroporación. Véase, p.
30 ej., Ausubel, F. M. et al, Current Protocols in Molecular Biology, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Células de este tipo pueden ser utilizadas rutinariamente para ensayar la actividad de CTL al expresar dichas células huéspedes genéticamente manipuladas o recombinantes los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón
35 de mono, descritos por Gluzman, 1981, Cell, 23: 175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Vectores de expresión de mamíferos incluirán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados y también cualesquiera sitios de unión ribosoma necesarios, sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias flanqueantes 5' no transcritas. Pueden utilizarse secuencias de ADN
40 derivadas del corte y empalme SV40, y sitios de poliadenilación para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Los polipéptidos se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes por métodos que incluyen precipitación de sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad,
45 cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina. Se pueden utilizar etapas de replegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración de los péptidos y las proteínas maduros. Se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación final.

Células Presentadoras de Antígenos

50 Células presentadoras de antígenos que se han de utilizar para estimular una respuesta de CTL se incuban típicamente con un péptido de una longitud óptima, por ejemplo, un nonapéptido, que permite la unión directa del péptido a la molécula de MHC clase I sin procesamiento adicional. Oligopéptidos y polipéptidos mayores son

generalmente ineficaces en la unión a moléculas de MHC clase I, ya que no se procesan de manera eficiente en un péptido de tamaño apropiado en el medio extracelular. Se conocen en la técnica una diversidad de enfoques, sin embargo, que permiten a los oligopéptidos y polipéptidos ser adquiridos de forma exógena por una célula, que luego permite su procesamiento y presentación posteriores por una molécula de MHC clase I. Ejemplos representativos, pero no limitantes de estos enfoques incluyen la electroporación de las moléculas en la célula (Harding, 1992, Eur J. Immunol., 22:1865-69), la encapsulación de las moléculas en liposomas que se fusionan a las células de interés (Reddy et al., 1991, J. Immunol Methods, 141:157-163), o choque osmótico, en el que las moléculas son absorbidas a través de pinocitosis (Moore et al, 1988, Cell, 54: 777-785). Por lo tanto, oligopéptidos y polipéptidos que incluyen uno o más de los péptidos descritos en esta memoria pueden proporcionarse a células presentadoras de antígenos de una manera tal que se suministran al citoplasma de la célula, y posteriormente se procesan para permitir la presentación de los péptidos.

Células presentadoras de antígenos adecuadas para la estimulación de una respuesta de CTL in vitro que es específica para uno o más de los péptidos descritos en esta memoria también pueden prepararse mediante la introducción de vectores de polinucleótidos que codifican las secuencias en las células. Estos polinucleótidos pueden ser diseñados de tal manera que expresan solamente un único péptido, múltiples péptidos o incluso una pluralidad de péptidos. Se conocen en la técnica una diversidad de enfoques que permiten a los polinucleótidos ser introducidos y expresados en una célula, proporcionando de este modo uno o más péptidos descritos en esta memoria a la vía de unión de la molécula de MHC clase I. Ejemplos representativos, pero no limitantes de estos enfoques incluyen la introducción de ADN de plásmido a través de la transferencia de genes mediada por partículas o electroporación (Tuting et al, 1998, J. Immunol., 160:1139-47), o la transducción de células con un adenovirus que expresan el polinucleótido de interés (Pérez-Diez et al., 1998, Cancer Res., 58:5305-09). Por lo tanto, los oligonucleótidos que codifican uno o más de los péptidos descritos en esta memoria puede ser proporcionados a células presentadoras de antígenos de una manera tal que los péptidos se asocian con moléculas de MHC clase I y se presentan en la superficie de la célula presentadora de antígenos y, por lo tanto, están disponibles para estimular una respuesta de CTL.

En determinadas realizaciones, los métodos descritos en esta memoria incluyen un método para inducir una respuesta de CTL in vitro que es específica para una célula tumoral que expresa una molécula a partir de los supertipos A1, A2 o A3 (A11 es un miembro del supertipo A3), en que el método incluye poner en contacto un linfocito precursor de CTL con una célula presentadora de antígenos que ha sido unida a un inmunógeno que comprende uno o más de los péptidos descritos en esta memoria.

En realizaciones específicas, los métodos descritos en esta memoria incluyen un método para inducir una respuesta de CTL in vitro que es específico para una célula tumoral que expresa una molécula a partir de los supertipos A1, A2 o A3, en donde el método incluye poner en contacto un linfocito precursor de CTL con una célula presentadora de antígenos que ha adquirido exógenamente un oligopéptido o polipéptido inmunogénico que incluye uno o más de los péptidos descritos de acuerdo con la invención.

Una realización todavía adicional descrita en esta memoria se dirige a un procedimiento para inducir una respuesta de CTL in vitro que es específica para una célula tumoral que expresa una molécula a partir de los supertipos A1, A2 o A3, que comprende poner en contacto un linfocito precursor de CTL con una célula presentadora de antígenos que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en esta memoria, y en el que dicho polinucleótido está unido operativamente a un promotor.

Existe una diversidad de técnicas para someter a ensayo la actividad de CTL. Estas técnicas incluyen el marcaje de células diana con radionucleidos tales como $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ o ^3H -timidina, y midiendo la liberación o la retención de los radionucleidos de las células diana tal como un índice de la muerte celular. Ensayos de este tipo son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se sabe que los CTL liberan una diversidad de citoquinas cuando son estimulados por una célula diana apropiada tal como una célula tumoral que expresa la molécula de MHC clase I relevante y el péptido correspondiente. Ejemplos no limitantes de citoquinas de este tipo incluyen IFN- γ , TNF- α y GM-CSF. Ensayos para estas citoquinas son bien conocidos en la técnica. La metodología para la medición tanto de la muerte de células diana como la liberación de citoquinas como una medida de la reactividad de CTL se dan en Coligan, J.E. et al. (Current Protocols in Immunology, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Después de la expansión de los CTLs específicos para antígenos, éstos pueden ser transferidos de nuevo al paciente, en donde destruirán su célula diana específica. La utilidad de tal transferencia adoptiva se demuestra en North et al. (199, Infect. Immun., 67:2010-12) y Riddell et al. (1992, Science, 257:238-241). En la determinación del número de células a reinfundir, el médico experto será guiado por el número total de células disponibles, la actividad del CTL tal como se mide in vitro, y el estado del paciente. Típicamente, se infunden aproximadamente 1×10^6 a

aproximadamente 1×10^{12} (p. ej., aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{11} o aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10}) CTL específicos para péptidos. Métodos para la reinfusión de células T en un paciente son bien conocidos y se ejemplifica en la patente de EE.UU. N° 4.844.893 expedida a Honski, et al., y la patente de EE.UU. N° 4.690.915 expedida a Rosenberg.

5 El CTL específico para el péptido se puede purificar a partir de las células estimuladoras antes de la infusión en el paciente. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la proteína de superficie celular CD8, presente en el CTL, se pueden utilizar en unión con una diversidad de técnicas de aislamiento tales como lavado de anticuerpos, la clasificación por citometría de flujo y la separación de perlas magnéticas para purificar el CTL específicos para el péptido de cualquiera de los linfocitos no específicos para el péptido restantes o de las células estimuladoras. Estos métodos son bien conocidos en la técnica. Debe apreciarse que la generación de CTL
10 específicos para el péptido de esta manera evita la necesidad de la estimulación del CTL en presencia de tumor. Por lo tanto, no hay ninguna posibilidad de volver a introducir inadvertidamente células tumorales en el paciente.

Por lo tanto, una realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene cáncer caracterizado por células tumorales que expresan complejos de una molécula de los supertipos A1, A2 o A3, por ejemplo, HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, o HLAA11, en donde los CTLs producidos in vitro de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria se administran en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de lisis directa o para efectuar la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas.
15

Otra realización de la presente invención se dirige a un procedimiento para tratar a un sujeto con cáncer caracterizado por células tumorales que expresan cualquier molécula de MHC clase I y un epítipo de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ó 21, en donde los CTL son producidos in vitro y son específicos para el epítipo o la proteína original y se administran en una cantidad suficiente para destruir las células tumorales a través de la lisis directa o para efectuar la destrucción de las células tumorales indirectamente a través de la elaboración de citoquinas.
20

El CTL generado ex vivo se puede utilizar para identificar y aislar las moléculas receptoras de células T específicas para el péptido. Los genes que codifican las cadenas alfa y beta del receptor de células T se pueden clonar en un sistema de vector de expresión y transferir y expresar en células T naif de la sangre periférica, células T de los ganglios linfáticos o células progenitoras de linfocitos T de la médula ósea. Estas células T, que a continuación expresarían un receptor de células T específicas para péptidos, tendrían entonces la reactividad anti-tumor y podría ser utilizadas en la terapia adoptiva de cánceres.
25
30

Métodos de Rastreo y Diagnóstico

Además de su uso para fines terapéuticos o profilácticos, los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria son útiles como agentes de rastreo y diagnóstico. Por lo tanto, los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria, junto con las técnicas modernas del rastreo de genes, hacen posible rastrear a los pacientes en cuanto a la presencia de genes que codifican estos péptidos en células obtenidas por biopsia de tumores detectados en tales pacientes. Por ejemplo, los pacientes pueden ser rastreados utilizando ácidos nucleicos o anticuerpos para detectar la expresión de CD133. Los resultados de dicho rastreo pueden ayudar a determinar la eficacia de continuar con el régimen de tratamiento descrito en esta memoria utilizando los inmunógenos descritos en esta memoria.
35

Alternativamente, los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria, así como homólogos funcionalmente similares de los mismos, se pueden utilizar para rastrear una muestra en cuanto a la presencia de CTLs que reconocen específicamente los epítopos correspondientes. Los linfocitos a rastrear en este ensayo normalmente se obtendrán normalmente de la sangre periférica, pero los linfocitos pueden obtenerse de otras fuentes, incluyendo los ganglios linfáticos, el bazo, tumores y el líquido pleural. Los péptidos descritos en esta memoria se pueden utilizar como una herramienta de diagnóstico para evaluar la eficacia de los tratamientos inmunoterapéuticos descritos en esta memoria. Por lo tanto, la generación in vitro de CTL tal como se describe anteriormente se utiliza para determinar si los pacientes son propensos a responder al péptido in vivo. Del mismo modo, la generación in vitro de CTL se podría hacer con muestras de linfocitos obtenidos del paciente antes y después del tratamiento con los péptidos. La generación exitosa de CTL in vivo debería ser reconocida entonces por una capacidad correspondientemente más fácil de generar CTL específicos para el péptido in vitro de linfocitos obtenidos después del tratamiento en comparación con los obtenidos antes del tratamiento.
40
45
50

Los oligopéptidos descritos en esta memoria, tales como SEQ ID NOs: 1-21, también se pueden utilizar para preparar multímeros (p. ej., dímeros, tetrámeros o pentámeros), que se pueden utilizar, p. ej., en unión con una citometría de flujo, para cuantificar la frecuencia de CTL específicos para el péptido que están presentes en una muestra de linfocitos de un individuo. Por ejemplo, las moléculas de MHC clase I que comprenden péptidos de SEQ ID NOs: 1-21, podrían combinarse para formar tetrámeros tal como se ejemplifica en la patente de EE.UU. N° 5.635.363. Los multímeros (p. ej., tetrámeros) se pueden utilizar en el seguimiento de la frecuencia de CTLs en la sangre periférica, los ganglios linfáticos o la masa del tumor de un individuo sometido a inmunoterapia con los péptidos, las proteínas o los polinucleótidos descritos en esta memoria, y que se espera que una inmunización con éxito conduciría a un aumento en la frecuencia de los CTL específicos para el péptido. Una descripción de tetrámeros de péptidos y métodos de utilizarlos se puede encontrar en Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 2006, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

Métodos de Terapia

Una vacuna puede incluir uno o más de los polipéptidos o fragmentos de los mismos descritos en esta memoria, o una composición, o agrupación de péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria. Dos o más polipéptidos y/o fragmentos de los mismos pueden utilizarse como una mezcla física o como una fusión. El fragmento de fusión o polipéptido de fusión se puede producir, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o mediante el uso de enlazadores apropiados para condensar los polipéptidos o fragmentos previamente preparados.

Las moléculas inmunogénicas descritas en esta memoria, incluyendo composiciones de vacuna, se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria para los fines de inhibir, suprimir o tratar enfermedades que provocan la expresión de los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria tales como en los casos en los que el antígeno es expresado por células tumorales. Tal como se utiliza de acuerdo con la presente solicitud, el término "inhibir" se refiere a un proceso de profilaxis en el que un animal, especialmente un mamífero, y lo más especialmente un ser humano, es expuesto a un inmunógeno descrito en esta memoria antes de la inducción o aparición del proceso de la enfermedad. Esto se podría hacer en los casos en los que un individuo tiene un pedigrí genético que indica una predisposición a la aparición del estado de la enfermedad a ser prevenido. Por ejemplo, esto podría ser cierto de un individuo cuyos antepasados hubieran mostrado una predisposición hacia determinados tipos de cáncer. Alternativamente, el inmunógeno se podría administrar a la población general como se hace con frecuencia para las enfermedades infecciosas.

El término "supresión" se utiliza a menudo para describir un escenario en el que ya ha comenzado el proceso de la enfermedad, pero los síntomas evidentes de dicha afección aún tienen que hacerse realidad. Por lo tanto, las células de un individuo pueden haberse vuelto cancerosas, pero aún no se han reconocido clínicamente signos externos de la enfermedad. El término profilaxis se utiliza en esta memoria para abarcar tanto la inhibición como la supresión. Por el contrario, el término "tratamiento" se utiliza en esta memoria para dar a entender la aplicación clínica de agentes para combatir una afección ya existente, cuya presentación clínica ya se ha realizado en un paciente. Esto se produciría típicamente en los casos en los que un individuo ya ha sido diagnosticado como que tiene un tumor.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "cáncer" se refiere a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado anormal o afección caracterizado por un crecimiento celular de rápida proliferación. Estados patológicos hiperproliferativos y neoplásicos pueden ser categorizados como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen un estado de enfermedad, o pueden categorizarse como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal, pero no asociada a un estado de enfermedad. En general, un cáncer se asocia con la presencia de uno o más tumores, es decir, masas de células anormales. El término "tumor" quiere dar a entender que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos malignamente transformados, independientemente del tipo histopatológico o fase de invasividad. Células "hiperproliferativas patológicas" se producen en estados de enfermedad caracterizados por el crecimiento del tumor maligno.

Los tumores incluyen tumores malignos de los diversos sistemas de órganos tales como los que afectan a los pulmones, mama, tiroides, linfoides, gastrointestinal, y del tracto genito-urinario, así como adenocarcinomas que incluyen tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer hepatocelular, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. El término "carcinoma" está reconocido en la técnica y se refiere a tumores malignos de tejidos epiteliales o endocrinos que incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genito-urinario, carcinomas testiculares, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. En algunas realizaciones, la enfermedad es carcinoma renal o melanoma. Ejemplos de carcinomas incluyen los que se forman a partir de tejido del cuello

uterino, próstata, mama, cabeza y cuello, colon y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, p. ej., que incluyen tumores malignos compuestos por tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Un "adenocarcinoma" se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocibles. El término "sarcoma" está reconocido en la técnica y se refiere a tumores malignos de derivación mesenquimal.

Ejemplos adicionales de tipos de cáncer que pueden ser tratados utilizando los métodos y las composiciones descritos en esta memoria incluyen cánceres de cerebro y del sistema nervioso, incluyendo, pero no limitados a gliomas, glioblastomas, glioblastoma multiforme (GBM), oligodendrogliomas, tumores neuroectodérmicos primitivos, astrocitomas de grado de bajo, medio y alto, ependimomas (p. ej., ependimoma mixopapilar, ependimoma papilar, subependimoma, ependimoma anaplásico), oligodendrogliomas, meduloblastomas, meningiomas, adenomas pituitarios, neuroblastomas, neurofibromas, tumores malignos de la vaina nerviosa periférica, schwannomas y craneofaringiomas.

Ejemplos adicionales de trastornos proliferativos incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "trastornos neoplásicos hematopoyéticos" incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, p. ej., derivadas de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos. Por ejemplo, las enfermedades surgen de leucemias agudas poco diferenciadas, p. ej., leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Trastornos mieloides a modo de ejemplo adicionales incluyen, pero no se limitan a leucemia promieloide aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML) revisado en Vaickus (1991) Crit. Rev. in Oncol./Hematol 11:267-97); tumores malignos linfoides incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL de linaje B y de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Formas adicionales de linfomas malignos incluyen, pero no se limitan a linfoma no Hodgkin y variantes de los mismos, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T (ATL) del adulto, linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Se entiende que la dosificación adecuada de un inmunógeno descrito en esta memoria dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. Sin embargo, la dosificación más preferida se puede adaptar al sujeto individual, según lo determinado el investigador o médico. La dosis total requerida para cualquier tratamiento dado se determinará habitualmente con respecto a una dosis estándar de referencia tal como se establece por un fabricante, tal como se hace comúnmente con las vacunas, administrándose dicha dosis ya sea en un único tratamiento o en una serie de dosis, cuyo éxito dependerá de la producción de un resultado inmunológico deseado (es decir, la producción con éxito de una respuesta mediada por CTL al antígeno, respuesta que da lugar a la inhibición y/o el tratamiento deseado). Por lo tanto, el programa de administración global debe considerarse en la determinación del éxito de un curso de tratamiento y no si una dosis única, dada aisladamente, produciría o no el resultado o efecto terapéutico inmunológicamente deseado.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene uno o más de los inmunógenos descritos en esta memoria, es una cantidad suficiente para inducir una respuesta de CTL eficaz para inhibir o detener la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, esta dosis dependerá, entre otras cosas, de la identidad de los inmunógenos utilizados, de la naturaleza del estado de la enfermedad, de la gravedad del estado de la enfermedad, en la medida de cualquier necesidad de prevenir tal estado en los que ya no se haya detectado, la forma de administración dictada por la situación que requiera dicha administración, el peso y estado de salud del individuo que recibe dicha administración y el buen criterio del médico o investigador. Por lo tanto, para los propósitos de la administración profiláctica o terapéutica, las cantidades eficaces estarían, en general, dentro del intervalo de 1,0 µg a aproximadamente 5.000 µg de péptido para un paciente de 70 kg, seguido por dosis de refuerzo de aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 1.000 µg de péptido de conformidad a un régimen de refuerzo a lo largo de días, semanas o meses, dependiendo de la respuesta del receptor y según sea necesario por el subsiguiente seguimiento de la actividad mediada por CTL en el torrente sanguíneo. Por supuesto, tales dosificaciones se han de considerar únicamente como una guía general y, en una situación dada, la dosificación real puede exceder de tales regímenes de dosis sugeridos en los casos en los que el médico considere que el estado del receptor garantiza un programa de administración más agresivo. La eficacia de la administración de dosis adicionales y de aumentar o disminuir el intervalo, se puede reevaluar de forma continua, a la vista de la inmunocompetencia del receptor (por ejemplo, el nivel de actividad de CTL con respecto a antígenos asociados al tumor o específicos para el tumor).

5 A estos efectos, las composiciones inmunogénicas descritas en esta memoria se pueden utilizar contra un estado de enfermedad como el cáncer mediante la administración a un individuo por una diversidad de vías. Las composiciones se pueden administrar por vía parenteral u oral, y, si es parenteral, sistémica o tópicamente. Las vías parenterales incluyen las vías subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica o bucal. Se pueden emplear una o más de tales vías. La administración parenteral puede ser, p. ej., mediante inyección en bolo o por perfusión gradual en el tiempo.

10 Típicamente, las vacunas se preparan como inyectables, en forma de disoluciones o suspensiones acuosas. Las vacunas en una base de aceite también son bien conocidas, tales como para inhalación. También pueden formularse formas sólidas que se disuelven o suspenden antes de su uso. Se añaden generalmente soportes, diluyentes y excipientes farmacéuticos que son compatibles con los ingredientes activos y aceptables para uso farmacéutico. Ejemplos de tales soportes incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, dextrosa o glicerol. También pueden utilizarse combinaciones de soportes. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas, incluyendo la filtración estéril. Las disoluciones resultantes se pueden envasar para su uso tal cual, o las disoluciones acuosas pueden ser liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con agua estéril antes de la administración. Las composiciones de vacuna pueden incorporar, además, sustancias adicionales para estabilizar el pH, o para funcionar como adyuvantes, agentes humectantes o agentes emulsionantes, que pueden servir para mejorar la eficacia de la vacuna.

20 La concentración de los péptidos estimuladores de CTL descritos en esta memoria en formulaciones farmacéuticas están sujetos a una variación amplia, incluyendo cualquiera de menos de 0,01% en peso hasta tanto como 50% o más. También deben ser considerados factores tales como el volumen y la viscosidad de la composición resultante. Los disolventes, o diluyentes, que se utilizan para composiciones de este tipo incluyen agua, dimetilsulfóxido, PBS (solución salina tamponada con fosfato) o solución salina en sí, u otros soportes o excipientes posibles.

25 Los inmunógenos descritos en esta memoria también pueden estar contenidos en estructuras creadas artificialmente tales como liposomas, ISCOMS, partículas de liberación lenta, y otros vehículos que aumentan la inmunogenicidad y/o la semivida de los péptidos o polipéptidos en suero. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y similares. Liposomas para uso en los métodos y las composiciones descritos en esta memoria se forman a partir de lípidos formadores de vesículas estándares, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esteroles tal como colesterol. La selección de lípidos se determina generalmente por consideraciones tales como el tamaño del liposoma y la estabilidad en la sangre. Está disponible una diversidad de métodos para preparar liposomas tal como se revisa, por ejemplo, por Coligan, J. E. et al, Current Protocols in Protein Science, 1999, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y las patentes de EE.UU. N°s 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369. Los liposomas que contienen los péptidos o polipéptidos descritos en esta memoria pueden dirigirse al sitio de células linfoides, en donde los liposomas suministran entonces los inmunógenos seleccionados directamente a las células presentadoras de antígenos. La fijación como objetivo se puede lograr mediante la incorporación de moléculas adicionales tales como proteínas o polisacáridos en las membranas externas de dichas estructuras, resultando así el suministro de las estructuras a zonas particulares del cuerpo, o a células particulares dentro de un órgano o tejido determinado. Tales moléculas de fijación como objetivo pueden incluir una molécula que se une al receptor en células presentadoras de antígenos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a CD80 podría utilizarse para dirigir liposomas a células dendríticas.

40 Los inmunógenos descritos en esta memoria también pueden administrarse en forma de composiciones sólidas. Soportes sólidos no tóxicos convencionales incluyen calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, magnesio, celulosa, glucosa, sacarosa, sacarina sódica y similares. Tales composiciones sólidas se administrarán a menudo por vía oral, formándose una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable al incorporar los péptidos y polipéptidos descritos en esta memoria con cualquiera de los soportes enumerados anteriormente. Generalmente, tales composiciones contendrán 10-95% de ingrediente activo, y más preferiblemente 25-75% de ingrediente activo.

50 La administración en aerosol es también una alternativa, que sólo requiere que los inmunógenos sean dispersados adecuadamente dentro del propulsor de aerosol. Porcentajes típicos de los péptidos o polipéptidos descritos en esta memoria son 0,01%-20% en peso, p. ej., 1% -10%. Puede requerirse el uso de un agente tensioactivo para dispersar adecuadamente el inmunógeno. Tensioactivos representativos incluyen los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mixtos tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir 0,1-20% en peso de la composición, p. ej., 0,25-5%. Propelentes típicos para una administración de este tipo pueden incluir ésteres y

compuestos químicos similares, pero no se limitan de modo alguno a éstos. También se puede incluir un soporte, tal como lecitina, para la administración intranasal.

5 Los péptidos y polipéptidos descritos en esta memoria también pueden administrarse con un adyuvante. Adyuvantes incluyen, pero no se limitan a agonistas de receptores de tipo Toll (TLR), Bacillus Calmette Guerin (BCG), adyuvante de Freund completo o incompleto, un oligodesoxinucleótido citosina guanina (CpG-ODN), Montanide ISA-51, gen de activación-3 (LAG-3), fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre y saponina. Efectos adyuvantes también se pueden obtener mediante la administración de una o más citoquinas junto con los inmunógenos descritos en esta memoria. Estas citoquinas incluyen, pero no se limitan a IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18 y GM-CSF. Agonistas de TLR a modo de ejemplo se describen en Ghosh et al., 2006, Cell. Immunol., 243: 48-57 y Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology, Lippincott Williams & Wilkins; (1 de julio de 2007), ISBN-10: 0781795435, página 10 17.

15 Los péptidos y polipéptidos descritos en esta memoria también se pueden añadir a células profesionales presentadoras de antígenos tales como células dendríticas que han sido preparados ex vivo. Por ejemplo, las células dendríticas se podrían preparar a partir de células madre CD34 positivas de la médula ósea, o se podrían preparar a partir de monocitos CD14 positivos obtenidos de la sangre periférica. Las células dendríticas se generan ex vivo utilizando citoquinas tales como GM-CSF, IL-3, IL-4, TNF y SCF. Las DC cultivadas se pulsan entonces con péptidos a diversas concentraciones utilizando métodos estándares que son bien conocidos en la técnica. Las células dendríticas pulsadas con péptidos se pueden administrar, a continuación, por vía intravenosa, subcutánea o intradérmica, y la inmunización también puede incluir citoquinas tales como IL-2 o IL-12.

20 Una vacuna contra el cáncer basada en células presentadoras de antígenos (APC) puede ser suministrada a un paciente o animal de ensayo por cualquier vía de administración adecuada, que puede incluir inyección, infusión, inoculación, suministro quirúrgico directo, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna contra el cáncer se administra a un ser humano en la región deltoidea o región axilar. Por ejemplo, la vacuna se administra en la región axilar en forma de una inyección intradérmica. En otras realizaciones, la vacuna se 25 administra por vía intravenosa.

Un soporte apropiado para la administración de las APCs se puede seleccionar por un experto en la técnica mediante técnicas rutinarias. Por ejemplo, el soporte farmacéutico puede ser una solución salina tamponada, p. ej., medios de cultivo celular, y puede incluir DMSO para preservar la viabilidad celular.

30 La cantidad de APCs apropiada para la administración a un paciente en forma de una vacuna contra el cáncer puede basarse en una diversidad de factores, al igual que la formulación de la vacuna en sí. Algunos de estos factores incluyen las características físicas del paciente (p. ej., edad, peso y sexo), las características físicas del tumor (p. ej., ubicación, tamaño, tasa de crecimiento y accesibilidad), y el grado en que se están implementando otras metodologías terapéuticas (p. ej., quimioterapia y radioterapia de haz) en relación con un régimen de tratamiento global. A pesar de la diversidad de factores que se deben considerar en la implementación de los 35 métodos descritos en esta memoria para tratar un estado patológico, a un mamífero puede administrarse de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 APCs (p. ej., 10^7 APCs) en de aproximadamente 0,05 mL a aproximadamente 2 mL de disolución (p. ej., solución salina) en una sola administración. Pueden llevarse a cabo administraciones adicionales, dependiendo de los factores anteriormente descritos y otros tales como la gravedad de la patología del tumor. En una realización, de aproximadamente una a aproximadamente cinco administraciones de 40 aproximadamente 10^6 APCs se realizan a intervalos de dos semanas.

La vacunación con APC puede ir acompañada por otros tratamientos. Por ejemplo, un paciente que recibe una vacunación con APC también puede recibir al mismo tiempo quimioterapia, radiación, y/o terapia quirúrgica. Métodos de tratamiento de cáncer utilizando la vacunación con APC junto con quimioterapia se describen en Wheeler et al., publicación de patente de EE.UU. N° 2007/0020297. En algunas realizaciones, un paciente que recibe vacunación 45 con DC ya ha recibido quimioterapia, radioterapia y/o tratamiento quirúrgico para el cáncer. En una realización, un paciente que recibe la vacunación con DC es tratado con un inhibidor de COX-2 tal como se describe en Yu y Akasaki, documentos WO 2005/037995 y US 2008/0199484.

50 La presente invención también se dirige a una vacuna en la que un inmunógeno descrito en esta memoria se suministra o administra en forma de un polinucleótido que codifica un polipéptido o fragmento tal como se describe en esta memoria, en que el péptido o polipéptido o fragmento se produce in vivo. El polinucleótido puede incluirse en un vector de expresión adecuado y combinarse con un soporte farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos podrían expresarse en el ADN de plásmido y vectores virales no replicativos tales como vacuna, viruela aviar, virus de la encefalitis equina venezolana, adenovirus u otros virus de ARN o ADN. Estos

ejemplos están destinados a ser solamente ilustrativos y no deben considerarse como limitantes. Está disponible una amplia diversidad de otros vectores y son evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción dada en esta memoria. En este enfoque, una porción de la secuencia de nucleótidos del vector viral está diseñada para expresar los péptidos o polipéptidos descritos en esta memoria. Vectores y procedimientos útiles en protocolos de inmunización se describen en la patente de EE.UU. N° 4.722.848.

Independientemente de la naturaleza de la composición dada, agentes terapéuticos adicionales también pueden acompañar a los inmunógenos descritos en esta memoria. Por lo tanto, para los fines de tratamiento de tumores, composiciones que contienen los inmunógenos descritos en esta memoria pueden, además, contener otros productos farmacéuticos antitumorales. El uso de tales composiciones con múltiples ingredientes activos se deja a la discreción del médico.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta de CTL en un sujeto, que comprende administrar a sujetos que expresan antígenos supertipo HLA-A1, -A2 o -A3 una cantidad eficaz (es decir, estimulante del CTL) de un inmunógeno descrito en esta memoria, p. ej., una cantidad suficiente para inducir una respuesta de CTL a células tumorales que expresan al menos HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3 o, según el caso, provocando con ello una respuesta celular contra dichas células tumorales.

Una realización todavía adicional de la presente invención se refiere a un método para inducir una respuesta de CTL en un sujeto, en el que el inmunógeno está en forma de un polinucleótido. En un ejemplo no limitativo, el método incluye administrar a sujetos que expresan HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3 al menos un epítipo de CTL, en donde dicho epítipo o dichos epítipos se seleccionan de un grupo que comprende los péptidos descritos en esta memoria, y se codifican dentro de una secuencia de polinucleótidos que no incluye toda la región codificante de la proteína, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta de CTL a células tumorales que expresan HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3.

Anticuerpos

Los inmunógenos descritos en esta memoria pueden utilizarse para estimular la producción de anticuerpos para su uso en inmunoterapia pasiva, para su uso como reactivos de diagnóstico y para uso como reactivos en otros procedimientos tales como cromatografía de afinidad.

La presente invención/descripción también se refiere a anticuerpos que reaccionan con inmunógenos tal como un polipéptido que comprende uno o más de los péptidos epitópicos de SEQ ID NOs: 1-21 (o una variante del mismo) como se describe en esta memoria. Fragmentos activos de estos anticuerpos también se contemplan específicamente. Tales anticuerpos, y fragmentos activos de tales anticuerpos, por ejemplo, y la estructura Fab, pueden reaccionar con, incluyendo los casos en los que es altamente selectiva o específica para una estructura inmunogénica que comprende 2, 3, 4 o más de los péptidos epitópicos descritos en esta memoria.

Con la llegada de métodos de biología molecular y tecnología recombinante, ahora es posible para el experto ordinario en la materia producir moléculas de anticuerpo por medios recombinantes y de ese modo generar secuencias de genes que codifican secuencias de aminoácidos específicas que se encuentran en la estructura polipeptídica de los anticuerpos. Tales anticuerpos pueden ser producidos por clonación de las secuencias de genes que codifican las cadenas de polipéptidos de dichos anticuerpos o mediante síntesis directa de dichas cadenas de polipéptidos, con ensamblaje in vitro de las cadenas sintetizadas para formar estructuras tetraméricas (H₂L₂) activas con afinidad por epítipos y determinantes antigénicos específicos. Esto ha permitido la producción rápida de anticuerpos que tienen secuencias características de anticuerpos neutralizantes de diferentes especies y fuentes.

Independientemente de la fuente de los anticuerpos o nanocuerpos, o la forma en la que el experto en la materia elija para producir tales anticuerpos o nanocuerpos, incluyendo la forma recombinante construida o sintetizada, in vitro o in vivo, mediante el uso de animales transgénicos tales como vacas, cabras y ovejas, o mediante el uso de cultivos de células en biorreactores, o mediante síntesis química directa no empleando organismos vivos en cualquier etapa del proceso, todos los anticuerpos y nanocuerpos tienen regiones capaces de interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Las regiones que interactúan con la diana se denominan regiones "variables" o "V" y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de anticuerpos de diferente especificidad antigénica.

Los anticuerpos también pueden ser totalmente sintéticos, en donde las cadenas de polipéptidos de los anticuerpos se sintetizan y, posiblemente, se optimizan para la unión a los polipéptidos descritos en esta memoria al ser receptores. Tales anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados y pueden ser totalmente

tetraméricos en la estructura, o pueden ser diméricos e incluir una única cadena pesada y una única cadena ligera. Tales anticuerpos también pueden incluir fragmentos tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, capaces de reaccionar con y unirse a cualquiera de los polipéptidos descritos en esta memoria como receptores.

Péptidos Superagonistas

- 5 Los péptidos y los inmunógenos descritos en esta memoria también pueden incluir mutaciones internas que les hacen "superantígenos" o "superagonistas" para la estimulación de células T. Péptidos superantígenos se pueden generar mediante el rastreo de células T con un banco combinatorio de péptidos sintéticos de rastreo posicional (PS-CSL) tal como se describe en Pinilla et al., 1992, *Biotechniques*, 13:901-5; Borrás et al., 2002, *J. Immunol. Methods*, 267:79-97; documento US 2004/0072246; y Lustgarten et al., 2006, *J. Immunol.*, 176:1796-1805. Cuando se conoce un epítipo de células T nativo, se encuentra que aproximadamente el 25% de las variantes identificadas son superagonistas. Éstos pueden ser de hasta 3 órdenes de magnitud más eficaces que el ligando nativo (Hemmer et al., 2000, *J. Immunol.*, 164:861-871; La Rosa et al., 2001, *Blood*, 97:1776-86).

- 15 Bancos combinatorios sintéticos de rastreo posicional (PS-SCL) que representan trillones de péptidos de diferentes longitudes se pueden utilizar como fuentes imparciales de antígenos peptídicos en ensayos de activación de células T para la identificación de epítipos de células T. Los PS-SCL (Pinilla et al., 1992, *Biotechniques*, 13:901-905) se componen de mezclas dispuestas sistemáticamente. En el caso de un PS-SCL definido de posición única, cada uno de los compuestos presentes en una mezcla dada tiene un aminoácido individual común en una posición dada, mientras que las posiciones restantes se componen de mezclas de todos los ácidos 19 L-aminoácidos naturales (cisteína omitida). Los datos del rastreo de un PS-SCL dado permite la identificación de residuos clave en cada una de las posiciones del péptido. Es importante señalar, sin embargo, que la actividad encontrada para una mezcla es debida a la presencia de péptido(s) activo(s) específico(s) dentro de la mezcla, y no a los aminoácidos individuales como entidades separadas. La combinación de todos los aminoácidos definidos en las mezclas más activas conduce a los compuestos individuales activos.

Vigilancia

- 25 Las respuestas inmunitarias celulares específicas para antígeno de los sujetos vacunados pueden ser monitorizadas mediante un cierto número de diferentes ensayos tales como ensayos de tetrámero, ELISPOT y PCR cuantitativa. Las siguientes secciones proporcionan ejemplos de protocolos para detectar respuestas con estas técnicas. Están disponibles métodos y protocolos adicionales. Véase, p. ej., *Current Protocols in Immunology*, Coligan, J. et al., Comps., (John Wiley & Sons, Inc.; Nueva York, N.Y.).

- 30 Pueden utilizarse tetrámeros formados por moléculas de MHC recombinantes formando complejo con el péptido para identificar poblaciones de células T específicas para el antígeno. Para detectar células T específicas para antígenos tales como CD133, se sintetizan fluorocromo complejos de péptido tetrámero específicos marcados (p. ej., ficoeritrina (PE)-tHLA) que contienen péptidos de estos antígenos y se suministran por Beckman Coulter (San Diego, California). Células CD8 del clon CTL específicas se resuspenden a razón de 10⁵ células/50 µl de tampón FACS (tampón fosfato más 1% de tampón FCS inactivado). Las células se incuban con 1 µl de tHLA durante 30 minutos a temperatura ambiente y se continúa la incubación durante 30 minutos a 4°C con 10 µl del mAb anti-CD8 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Las células se lavan dos veces en 2 ml de tampón FACS frío antes del análisis mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (Becton Dickinson).

- 40 Se pueden utilizar ensayos ELISPOT para detectar células secretoras de citoquinas, p. ej., para determinar si las células en un paciente vacunado secretan citoquinas en respuesta al antígeno, demostrando con ello si se han suscitado respuestas específicas para el antígeno. Kits de ensayo ELISPOT se suministran de R & D Systems (Minneapolis, Minnesota) y se realizan como se describe por las instrucciones del fabricante. Células PBMC de 1 x 10⁵ pacientes respondedoras (R) antes y después de la vacunación se siembran en placas de 96 pocillos con insertos de membrana de nitrocelulosa recubiertos con Ab de captura. Se añaden células estimuladoras (S) (células T2 deficientes en TAP pulsadas con antígeno) en la relación R:S de 1:1. Después de una incubación durante 24 horas, las células se separan 4 veces por lavado de las placas. El Ab de detección se añade a cada uno de los pocillos. Las placas se incuban a 4°C durante la noche y se repetirán las etapas de lavado. Después de una incubación durante 2 horas con estreptavidina-AP, se lavan las placas. Partes alícuotas (100 µl) de cromógeno BCIP/NBT se añaden a cada uno de los pocillos para desarrollar las manchas. La reacción se detiene después de 60 min mediante lavado con agua. Las manchas se escanearon y se cuentan con el análisis de imágenes asistido por ordenador (Cellular Technology Ltd, Cleveland, Ohio). Cuando los valores experimentales son significativamente diferentes del número medio de manchas frente a las células T2 no pulsadas (valores de fondo), tal como se

determina por una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de dos colas, los valores de fondo se restan de los valores experimentales.

La PCR cuantitativa es otro medio para evaluar las respuestas inmunes. Para examinar la producción de IFN- γ en pacientes mediante PCR cuantitativa, PBMCs crioconservadas de muestras pre-vacunación y post-vacunación de los pacientes y células dendríticas autólogas se descongelan en medio de cultivo RPMI DC con suero del paciente al 10%, se lavan y se cuentan. Las PBMC se siembran a razón de 3×10^6 PBMCs en 2 ml de medio en placas de 24 pocillos; células dendríticas se siembran a razón de 1×10^6 /ml y se pulsan durante 24 horas con 10 μ g/ml de péptido tumoral en 2 ml en cada una de las placas de 24 pocillos. Se recogen las células dendríticas, se lavan y se cuentan, y se diluyen hasta 1×10^6 /ml, y 3×10^5 (es decir, 300 μ l de disolución) añaden a pocillos con PBMC (DC:PBMC = 1:10). 2.3 μ l de IL-2 (300 UI/ml) se añaden cada 3-4 días, y las células se cosechan entre el día 10 y el día 13 después del inicio del cultivo. Las células recogidas son luego estimuladas con células tumorales o PBMC autólogas pulsadas con 10 μ g/ml de péptido tumoral durante 4 horas a 37°C. Los días 11-13 se recogen los cultivos, se lavan dos veces, luego se dividen en cuatro pocillos diferentes, utilizando dos pocillos para el control (sin diana); y otros dos pocillos CTL co-cultivados con células tumorales (1:1) si están disponibles células tumorales. Si las células tumorales no están disponibles, se añaden 10 μ g/ml de lisado de tumor a CTL. Después de 4 horas de estimulación, se recogen las células, se extrae el ARN y se evalúa la expresión de IFN- γ y ARNm de CD8 con un sistema termociclador/cámara de fluorescencia. La eficiencia de amplificación por PCR sigue un progreso logarítmico natural, con análisis de regresión lineales que demuestran coeficientes de correlación superiores a 0,99. Basado en el análisis empírico, una diferencia de un ciclo se interpreta como una diferencia de dos veces en la cantidad de ARNm, y se determinan las cantidades de IFN- γ CD8-normalizadas. Un incremento $> 1,5$ veces en el IFN- γ post-vacuna en relación con la pre-vacuna es el patrón establecido para la capacidad de respuesta a la vacuna positiva tipo I.

Métodos Ex Vivo

Se puede utilizar el siguiente protocolo para producir células presentadoras de antígenos y/o CTL específicos para antígenos in vitro a partir de PBMC derivadas de pacientes. Para generar células dendríticas, las células adherentes plásticas de PBMCs se cultivan en medio AIM-V complementado con GM-CSF humano recombinante e IL-4 humana recombinante a 37°C en una incubadora humidificada con CO₂ (5%). Seis días después, las células dendríticas inmaduras en los cultivos se estimulan con TNF- α humano recombinante para la maduración. Las células dendríticas maduras se recogen a continuación el día 8, se resuspenden en PBS a razón de 1×10^6 por mL con el péptido (2 μ g/mL) y se incuban durante 2 horas a 37°C.

Células T CD8+ autólogas se enriquecen a partir de PBMCs utilizando microperlas magnéticas (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Células T CD8+ (2×10^6 por pocillo) son co-cultivadas con 2×10^5 células dendríticas pulsadas con péptido por pocillo en 2 mL/pocillo de medio AIM-V complementado con suero AB humano al 5% y 10 unidades/mL de rIL-7 (Cell Sciences) en cada uno de los pocillos de placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos. Se añaden aproximadamente 20 U/ml de IL-2 24 h más tarde a intervalos regulares, 2 días después de cada re-estimulación. El día 7, los linfocitos se re-estimulan con células dendríticas autólogas pulsadas con péptido en medio AIM-V complementado con 5% de suero humano AB, rIL-2 y rIL-7 (10 unidades/mL cada uno). Se añaden aproximadamente 20 U/ml de IL-2 24 h más tarde a intervalos regulares, 2 días después de cada re-estimulación. El séptimo día, después de las tres rondas de re-estimulación, las células se recogen y se ensaya la actividad de CTL. Las células (CTL) cultivadas CD8+ estimuladas se co-cultivan con células T2 (una línea celular deficiente en TAP humano) pulsadas con 2 μ g/ml de péptidos CD133. Después de 24 horas de incubación, el IFN- γ en el medio se mide mediante el ensayo ELISA.

Modelos Animales

La vacunación (p. ej., la vacunación con DC) puede evaluarse en modelos animales. Modelos adecuados para cánceres incluyen modelos de inyección, en los que se inyectan células de una línea celular de tumor en el animal, y los modelos genéticos, en el que surgen los tumores durante el desarrollo. En algunos casos, se puede utilizar un animal transgénico (p. ej., un ratón) que expresa un HLA (p. ej., HLA-A2). Véase, p. ej., Choi et al., 2002, J. Immunol. Methods, 268: 35-41.

Para evaluar la vacunación de células dendríticas en un modelo animal, las células dendríticas funcionales se aíslan de células derivadas de la médula ósea de los animales y se diferencian in vitro en presencia de citoquinas, tal como se detalló anteriormente. Células dendríticas maduras se pulsan con antígenos tumorales (p. ej., antígenos tumorales derivados de la línea celular de tumor que ha de ser implantado en el animal o péptidos sintéticos correspondientes a los epítomos de esos antígenos). A los animales se implantaron células de la línea celular de

tumor. Después de la implantación, los animales se vacunan con células dendríticas pulsadas con antígeno una o más veces. Se mide la supervivencia y la respuesta inmune.

Kits

5 La presente invención también se dirige a kits para el tratamiento de cánceres. Los kits son útiles para la práctica de los métodos descritos en esta memoria para el tratamiento de cáncer con una vacuna que comprende un antígeno o APCs cargadas con un antígeno tal como se describe en esta memoria. El kit es un conjunto de materiales o componentes, incluyendo al menos una de las composiciones descritas en esta memoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el kit incluye un conjunto de péptidos para su uso en la vacunación o la preparación de células para la vacunación. El kit también puede incluir agentes para la preparación de las células (p. ej., citoquinas para inducir la diferenciación de DC in vitro). La invención también proporciona kits que contienen una composición que incluye una vacuna que comprende células dendríticas (p. ej., células dendríticas crioconservadas) cargadas con los antígenos tal como se describe en esta memoria.

15 La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit depende de su finalidad prevista. Por ejemplo, algunas realizaciones están configuradas con el propósito de tratar el cáncer de cerebro, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata, mieloma múltiple y melanoma. En una realización, el cáncer de cerebro es un glioma. En otra realización, el cáncer de cerebro es el glioblastoma multiforme (GBM). En otra realización, el cáncer de cerebro es un astrocitoma. En una realización, el kit está configurado, en particular, con el propósito de tratar sujetos mamíferos. En otra realización, el kit está configurado, en particular, con el propósito de tratar sujetos humanos. En otras realizaciones, el kit está configurado para aplicaciones veterinarias, el tratamiento de sujetos tales como, pero no limitados a animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

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

Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles tales como diluyentes, tampones, soportes farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteado o de medición, u otra parafernalia útil como será fácilmente reconocido por los expertos en la técnica.

30 Los materiales o componentes ensamblados en el kit se pueden proporcionar al médico almacenados de cualquier manera conveniente y adecuada que preserven su operabilidad y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; que se puede proporcionar a las temperaturas ambiente, refrigerada o congelada. Los componentes están típicamente contenidos en material o materiales de envasado adecuados. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas utilizadas para albergar el contenido del kit tales como las composiciones descritas en esta memoria y similares. El material de envasado se construye por métodos bien conocidos, preferiblemente para proporcionar un entorno estéril, libre de contaminantes. Los materiales de envasado utilizados en el kit son los habitualmente utilizados en los tratamientos de cáncer o en vacunaciones. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "envase" se refiere a una matriz sólida adecuada o material tal como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaz de contener los componentes individuales del kit. Así, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio utilizado para contener cantidades adecuadas de una composición que contiene una vacuna, p. ej., una vacuna que comprende un inmunógeno o células dendríticas cargadas con los antígenos tal como se describe en esta memoria. El material de envasado tiene generalmente una etiqueta externa que indica el contenido y/o la finalidad del kit y/o de sus componentes.

45 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1. Predicción y Síntesis de Epítopos de CD133

50 Epítopos de CD133 se predijeron utilizando la base de datos pública libre Immune Epitope para predecir la unión a HLA-A*0101, -A*0201 y -A*0301 del péptido de MHC Clase 1 utilizando el método de la red neural artificial (ANN) (Nielsen et al., 2003, Protein Sci., 12:1007-17). El algoritmo utilizado se puede encontrar en la World Wide Web en tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_binding.html. Se seleccionaron péptidos basados en la CI₅₀ predicha

5 para HLA-A*0101 ($CI_{50} \leq 5000$ nM), HLA-A*0201 ($CI_{50} \leq 500$ nM) y HLA-A*0301 ($IC_{50} \leq 500$ nM). Ochenta y cuatro candidatos de secuencias de nueve aminoácidos de CD133 se sintetizaron (ProImmune Ltd., Oxford, Reino Unido) para determinar si los péptidos unidos a las MHCs HLA-A*0101, HLA-A*0201 y HLA-A*0301. La información generada a partir de la base de datos Immune Epitope es sólo una guía general. Estas puntuaciones se basan únicamente en algoritmos y no pueden confirmar si las secuencias son epítomos de células T verdaderos u óptimos. Adicionalmente, puede haber algunas secuencias que no tienen una buena puntuación en algoritmos que serán buenos epítomos de células T.

Ejemplo 2. Identificación de Epítomos de HLA-A*0101

10 Dieciocho de los péptidos candidatos se reunieron con HLA-A*0101 y se analizaron en cuanto a la unión a MHC para determinar su nivel de incorporación en las moléculas de MHC utilizando el ensayo de unión a MHC REVEAL™ (ProImmune Ltd., Oxford, Reino Unido). La unión a moléculas de MHC se comparó con la de dos epítomos de células T conocidos: un péptido de control intermedio y un péptido de control positivo con propiedades de unión débil y fuerte, respectivamente. Tres péptidos unidos a HLA-A*0101 en al menos el 50% del nivel del control positivo, tal como se indica en la Tabla 1.

15 **Tabla 1. Unión a HLA-A*0101**

SEQ ID NO	Secuencia	% Control positivo
1	AVDVFLCSY	58,58
2	SSELESKLV	74,14
3	IIDPLNLFW	91,46
Control Intermedio	-	2,25 ± 1,2
Control Positivo	-	100,00 ± 15,2

20 Los péptidos que se unían a HLA-A*0101 se sintetizaron como pentámeros ProVE® (ProImmune Ltd., Oxford, Reino Unido) para su posterior análisis. Los pentámeros se sometieron a incubación y análisis a 37°C para determinar la estabilidad de los complejos de péptido-MHC. Constantes de disociación de los complejos se midieron mediante análisis de disociación Reveal™ (ProImmune Ltd., Oxford, Reino Unido) después de 0, 2 y 24 horas de incubación a 37°C. Las constantes de disociación de los péptidos en términos de valores de semivida $t_{1/2}$ se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Constantes de Disociación de HLA-A*0101

SEQ ID NO	Secuencia	$t_{1/2}$ (h)
1	AVDVFLCSY	20,71
2	SSELESKLV	0,46
3	IIDPLNLFW	0,35
Control Intermedio	-	0,29
Control Positivo	-	102,74 *

*: El intervalo de medición de 24 horas era demasiado corto para calcular este valor con precisión.

25 Ejemplo 3. Identificación de Epítomos de HLA-A*0301

30 Quince de los péptidos candidatos se ensamblaron con HLA-A*0301 y se analizaron en cuanto a la unión a MHC para determinar su nivel de incorporación en moléculas de MHC utilizando el ensayo de unión a MHC REVEAL™ (ProImmune Ltd., Oxford, Reino Unido). La unión a moléculas de MHC se comparó con la de dos epítomos de células T conocidos: un péptido de control intermedio y un péptido de control positivo con propiedades de unión débil y fuerte, respectivamente. Seis péptidos unidos a HLA-A*0301 en por lo menos 45% del nivel del control positivo, tal como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Unión a HLA-A*0301

SEQ ID NO	Secuencia	% Control positivo
4	KLFNKSKMK	80,81

5	ILAQYNTTK	46,61
6	YLSGKLFNK	46,87
7	RTRIKRSRK	87,33
8	LSSSLTSVK	52,49
9	NLFWFGIGK	53,08
Control Intermedio	-	9,19 ± 1,5
Control Positivo	-	100,00 ± 4,6

- 5 Cinco de los péptidos que se unen a HLA-A*0301 fueron sintetizados como pentámeros ProVE® (Prolimmune Ltd., Oxford, Reino Unido) para su posterior análisis. Los pentámeros se sometieron a incubación y análisis a 37°C para determinar la estabilidad de los complejos de péptido-MHC. Constantes de disociación de los complejos se midieron mediante análisis de disociación REVEAL™ (Prolimmune Ltd., Oxford, Reino Unido) después de 0, 2 y 24 horas de incubación a 37°C. Las constantes de disociación de los péptidos en términos de valores de semivida $t_{1/2}$ se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Constantes de disociación de HLA-A*0301

SEQ ID NO	Secuencia	$t_{1/2}$ (h)
4	KLFNKSKMK	27,81*
5	ILAQYNTTK	2,07
7	RTRIKRSRK	23,92
8	LSSSLTSVK	1,80
9	NLFWFGIGK	3,35
Control Intermedio	-	0,56
Control Positivo	-	49,82*

*: El intervalo de medición de 24 horas era demasiado corto para calcular estos valores con precisión.

Ejemplo 4. Identificación de Epítomos de HLA-A*0201

- 10 Cincuenta y cinco de los péptidos candidatos se ensamblaron con HLA-A*0201 y se analizaron en cuanto a la unión a MHC para determinar su nivel de incorporación en moléculas de MHC utilizando el ensayo de unión a MHC REVEAL™ (Prolimmune Ltd., Oxford, Reino Unido). La unión a moléculas de MHC se comparó con la de dos epítomos de células T conocidos: un péptido de control intermedio y un péptido de control positivo con propiedades de unión débil y fuerte, respectivamente. Once péptidos se unían a HLA-A*0201 tan bien o mejor que el control positivo, tal como se indica en la Tabla 5.
- 15

Tabla 5. Unión a HLA-A*0201

SEQ ID NO	Secuencia	% Control positivo
10	VLDEIKSMA	309,26
11	YLQWIEFSI	112,67
12	NLLSFAYDL	179,71
13	FITNNTSSV	107,15
14	RVLDTPLYLL	165,18
15	SLDFAQNFI	114,58
16	ELVHIFLYV	155,93
17	LVLGSLLLL	101,90
18	SQLNSNPEL	123,10
19	ILCCVLGLL	163,06
20	GLLERVTRI	131,30
21	FLLPALIFA	93,59
Control Intermedio	-	2,65 ± 2,1
Control Positivo	-	100,00 ± 6,7

- 5 Doce de los péptidos que se unen a HLA-A*0201 fueron sintetizados como pentámeros ProVE[®] (Prolimmune Ltd., Oxford, Reino Unido) para su posterior análisis. Los pentámeros se sometieron a incubación y análisis a 37°C para determinar la estabilidad de los complejos de péptido-MHC. Constantes de disociación de los complejos se midieron mediante análisis de disociación Reveal[™] (Prolimmune Ltd., Oxford, Reino Unido) después de 0, 2 y 24 horas de incubación a 37°C. Las constantes de disociación de los péptidos en términos de valores de semivida $t_{1/2}$ se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Constantes de disociación de HLA-A*0201

SEQ ID NO	Secuencia	$t_{1/2}$ (h)
10	VLDEIKSMA	1,43
11	YLQWIEFSI	83,00 *
12	NLLSFAYDL	1,83
13	FITNNTSSV	19,98
14	RVLDTPYLL	3,51
15	SLDFAQNF	15,49
16	ELVHIFLYV	6,86
17	LVLGSLLLL	8,25
18	SQLNSNPEL	2,37
19	ILCCVLGLL	5,63
20	GLLERVTRI	74,30*
21	FLLPALIFA	> 120*
De control intermedio	-	1618
Control positivo	-	55.67 *

*: El intervalo de medición de 24 horas era demasiado corto para calcular estos valores con precisión.

Ejemplo 5. Generación de Súper agonista CD 133 péptidos

- 10 Péptidos superagonistas de los epítomos de CD133 descritos en esta memoria son producidos por los métodos descritos más adelante. Estos superagonistas de péptidos exhiben una superior capacidad para inducir respuestas de CTL.

15 Para esta solicitud se generan líneas y clones de células T a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de pacientes con glioma. Células B autólogas transformadas con Epstein Barr se utilizan como células presentadoras de antígenos a través de todos los ensayos y estímulos funcionales de células T. La sangre se obtiene de pacientes con glioma y cuidadosamente se depositan sobre la parte superior de tubos cónicos de 50 ml (polipropileno, Sarsted) en una relación de 2 volúmenes por 1 volumen de Histopaque (Sigma, St Louis, Missouri). Cada uno de los tubos se coloca entonces en una centrifuga abatible clínica (Beckman) y se centrifuga durante 30 minutos a 400 g a temperatura ambiente. Las PBMC se recogen entonces de la interfase con una pipeta de transferencia de plástico (Samco) y se lavan 2 veces con D-PBS a 250 g y 1 vez con medio de cultivo (IMDM, Bio-whittaker, Walkersville, Maryland) que contiene suero humano AB al 8% (Gemini Bio-products, Woodland, California) a 200 g durante 10 minutos cada paso. Se aspira el sobrenadante y se desecha, y las células se resuspenden en medio de cultivo.

25 Células T CD8+ y CD4+ se aislaron de PBMC por selección positiva, siguiendo las instrucciones del fabricante (kits de selección CD8 y CD4 positivos, Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY). Las células aisladas se utilizan de inmediato para los protocolos de estimulación.

30 La transformación de células B a partir de PBMC por el virus de Epstein Barr (EBV) se realiza inmediatamente después del aislamiento de PBMC. En síntesis, PBMCs congeladas se descongelan, se lavan y se resuspenden en CRPMI con FBS al 10%. 5 a 10 millones de PBMCs se resuspenden en 2,5 ml de CRPMI con FBS al 10%. A continuación, se añaden 2,5 ml de sobrenadante descongelado a partir de células B95.8 de tití (que contienen el EBV) a cada uno de los tubos cónicos que contienen las células. Las células se incubaron durante 2 horas en un baño de agua a 37°C. A continuación se añade CRPMI con FBS al 10% que contiene 1 µg/ml de Ciclosporina A a cada uno de los tubos. Suspensiones de 10 ml se transfieren a matraces T-25 y se incuban durante 3 semanas. En este punto, las células forman grumos visibles a simple vista. Mediante el examen microscópico, las células parecen grandes, transparentes y posiblemente pilosas. Estos son indicadores de la inmortalización de células B por parte

del EBV. Las células se mezclan en sus matraces y el cultivo de 10 ml se divide en 2 nuevos matraces T-25 (5 ml cada uno). 5 ml de medio CRPMI-10 reciente que contiene 1 µg/ml de ciclosporina A se añaden a cada uno de los matraces y los cultivos se incuban durante 1 semana a 37°C. En este instante, una parte alícuota de células de cada uno de los donantes se tiñe para la expresión de CD 19 (mancha anti-CD19-APC Pharmingen) y se analiza por citometría de flujo. Las líneas celulares se expanden a continuación y se congelan a razón de 5×10^6 /vial. Células B inmortalizadas se expanden en cultivo mediante la división 1:3 en medio CRPMI-10 (sin ciclosporina A) en matraces T-25 una vez a la semana y se incuban a 37°C, 5% de CO₂. Estas líneas de células linfoblastoides B (EBV-LCL) se utilizan como células presentadoras de antígenos en los siguientes ensayos funcionales de células T.

PBMC se estimulan con los antígenos CD133 reseñados y con líneas de células madre de cáncer en presencia de células dendríticas autólogas. En síntesis, se utilizan células T derivadas ya sea de un solo pocillo o de múltiples pocillos (cultivos a granel) después de 6-7 días de estimulación. Se realizan diluciones limitantes de células T a una concentración de 0,3, 1, 3 y 10 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Corning). 1×10^5 células dendríticas autólogas irradiadas por pocillo se añaden junto con IL-2 e IL-7 (20 U/ml y 10 ng/ml, respectivamente). Se obtiene alrededor de cinco a diez veces el número original de las células sembradas en placas. Los pocillos que muestran crecimiento se expanden por re-estimulación con un mayor número de alimentadores alogénicos irradiados, fitohemaglutinina (PHA) e IL-2 hasta obtener un número suficiente para las pruebas de especificidad. En este punto, algunas células se congelan mientras que otras se ensayan en cuanto a la reactividad de antígeno mediante el uso de diferentes lecturas de la activación de células T, a saber, la producción de citoquinas, el exterminio y la proliferación de las células. El ensayo de citoquinas Multiplex (Millipore, Billerica, MA) se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante para cuantificar, de una manera imparcial, un amplio espectro de citoquinas para determinar la o las mejores citoquinas para la evaluación de la especificidad de antígeno.

Se obtienen perfiles de TCR de los clones de células T generadas para demostrar y vigilar la clonalidad. El repertorio Vβ se determina utilizando citometría de flujo (como se describe anteriormente) con mAbs específicos (disponibles a través de Immunotech, Miami, Florida) para células que se expanden a grandes números (> 10 millones).

La inmortalización de las células T humanas de respuesta a antígenos de PBMC proporciona una ventaja para el estudio de su especificidad fina con los bancos combinatorios, ya que se necesita un gran número de células T para el rastreo de estos bancos. De hecho, con el fin de obtener datos adecuados de bancos combinatorios, las células deberían cultivarse a un mínimo de 30 a 100 millones de células. Por esta razón, serán inmortalizadas las líneas de células T y los clones definidos. En síntesis, la transducción se obtiene por magnetofección en células T en división (recientemente estimuladas), que se lavan, se cuentan y se siembran con 100 U/ml de IL-2 en medio completo en placas de 96 pocillos (fondo plano). Se incuba una mezcla del vector retroviral con Viromag R/L (OZ Biosciences) durante 20 minutos antes de ser depositada en capas sobre las células T, y la placa se fija luego cuidadosamente en la parte superior de la placa magnética y se incuba durante la noche. Al día siguiente, las células se resuspenden en medio completo reciente con IL-2 y se transfieren a un pocillo mayor. Después de 48 horas la eficacia de la transfección se evalúa por citometría de flujo mediante tinción con anti-NGFR-PE. El enriquecimiento en perlas magnéticas de células transducidas se lleva a cabo de acuerdo con protocolos de Miltenyi utilizando perlas anti-PE (Miltenyi).

Líneas y clones de células T específicos para CD133 se obtienen en el espacio de 2-4 meses después de la estimulación primaria.

Bancos de péptidos combinatorios para el rastreo de péptidos superagonistas se preparan tal como se ha descrito previamente en Pinilla et al., 1994, *Biochem. J.*, 301:847-853.

Ensayos funcionales de células T se realizan en placas de 96 pocillos (Corning Inc., Corning, NY). Cada una de las placas puede alojar 80 muestras en las columnas 3-12, estando las 2 primeras columnas reservadas para los pocillos de control negativos y positivos. La dispensación de muestras y reactivos comunes se logra utilizando un instrumento de manipulación de líquidos automatizado Precision Biotek (Biotek, Winooski, Vermont). Todas las muestras, tanto los bancos como compuestos individuales, se almacenan en estantes de 96 tubos que son compatibles tanto con las placas de 96 pocillos como con la instrumentación manipuladora de líquidos. Treinta placas por semana se prueban con los ensayos funcionales de células T. Para los ensayos que se realizan por duplicado, esto genera aproximadamente 1.000 puntos de datos por semana. Los datos se adquieren en los instrumentos especificados para cada tipo de ensayo y se transfieren a los libros de Excel especialmente diseñado para el análisis rápido y preciso.

Mezclas de bancos se ensayan a una concentración final de 100 o 200 µg/ml utilizando la disposición de placa general descrita anteriormente. En síntesis, 25.000 células T se cultivan en presencia de 50.000 líneas de células

linfoblastoides (LCLs) irradiadas autólogas y 25 µl de cada uno de los bancos de mezclas a razón de 2 mg/ml en RPMI completo. Cada una de las mezclas se ensaya por duplicado. Los pocillos de control incluyen células T y LCLs sin mezclas y con o sin PHA (a una concentración final de 5 µg/ml). Como se ha mencionado antes en esta memoria para la especificidad de antígeno, se ensayan diferentes lecturas de la activación de células T para confirmar la lectura del ensayo que proporciona la mejor señal para el rastreo con los bancos. Después del rastreo con los bancos, los resultados se utilizan para diseñar péptidos individuales mediante la combinación de la selección de los aminoácidos definidos de las mezclas más activas en cada una de las posiciones definidas. Este enfoque proporciona agonistas optimizados y péptidos superagonistas de los epítomos CD133 descritos en esta memoria. Los péptidos más activos son seleccionados para determinar su inmunogenicidad in vitro y reactividad cruzada con el antígeno nativo.

Péptidos agonistas y superagonistas individuales se sintetizan por el método de síntesis simultánea de múltiples péptidos (Houghten, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5131-35). La pureza y la identidad de cada uno de los péptidos se caracterizan utilizando un espectrómetro de masas por electroproyección en interfaz con un sistema de cromatografía líquida.

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

Estos estudios identifican péptidos superagonistas derivados del CD133 descrito en esta memoria. Se identifican péptidos agonistas fuertes reconocidos con valores EC-50 en el intervalo nanomolar.

Ejemplo 6. Inmunización con péptidos CD133

La vacunación con péptidos de epítomo CD133 descritos en esta memoria y superagonistas de los mismos se ensaya para el exterminio de tumores en ratones transgénicos HLA-A2 humanizados. Métodos similares se pueden también realizar en ratones transgénicos para otros HLA (véase, p. ej., Alexander et al, 1997, J. Immunol, 159:4753-61). Se somete a ensayo la eficacia de la vacunación con el epítomo CD133 y sus superagonistas con respecto a la citotoxicidad periférica, infiltración de tumor intracraneal y la supervivencia.

En síntesis, ratones HHD se inmunizaron con un péptido epítomo descrito en esta memoria emulsionado en adyuvante ayudante Incompleto de Freund y antígeno cooperador. Se someten a ensayo poblaciones a granel de esplenocitos en cuanto a la citotoxicidad específica contra las células EL4-HHD pulsadas con el péptido, EL4-HHD-no pulsadas de control o células de péptidos EL4-HHD. Se realiza una medición de la unión y estabilidad del complejo péptido/HLA. Se compara la supervivencia de los animales vacunados con superagonistas del epítomo de CD133.

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

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

Se crea una línea de células tumorales HHD-singénica que expresa CD133. El fragmento de ADNc de CD133 humano de longitud completa se genera por PCR con transcripción inversa utilizando cebadores directos (AGTATGGCTTTTCGTTTGCTTGGC; SEQ ID NO: 22) e inversos (TACCGAGCTCGGATCCACTAGT; SEQ ID NO: 23) y el ARN total derivado de células madre de cáncer glioblastoma multiforme CSC1. El ADNc de CD133 se clona a continuación en el vector pEF6/VS-His-TOPO del plásmido de expresión (Invitrogen) para generar pEF6/V5-CD133. Células EL4-HHD son entonces transfectadas con el pEF6/V5-CD133 utilizando el kit T de Cell Line Nucleofector (Amaxa, Gaithersburg, Maryland), y se selecciona (EL4-HHD-CD133) para su uso posterior un clon resistente a blastidina que expresa de forma estable el nivel más alto de CD133 basado en citometría de flujo utilizando el mAb de CD133 (Tessa).

Las células se tiñen con tetrámeros HLA-A*0201 conjugado con ficoeritrina/péptido (10 µg/ml) en PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron una vez y se tiñeron con CD8 anti-humano conjugado con FITC o CD8 anti-ratón (BD Biosciences, San Diego, CA). Los análisis de citometría de flujo se realizan mediante el citómetro Coulter EPICS (Beckman Coulter, Fullerton, California).

5 Para medir la unión y la estabilidad del complejo péptido/HLA-A2, células T2 (1×10^6 células/mL) se incuban con diversas concentraciones (0,1-100 nmol/L) de péptidos en RPMI 1640 libre de suero a 37°C durante la noche en una atmósfera que contiene 5% de CO₂. A continuación, las células se lavan dos veces con PBS y se tiñen con el mAb BB7.2 durante 30 minutos a 4°C. Después del lavado, IgG anti-ratón de cabra conjugada con FITC (Caltag, Burlingame, California) se utiliza como el anticuerpo secundario. Los niveles de expresión en superficie de HLA-A2
10 se examinan por citometría de flujo. La unión del péptido se evalúa determinando la intensidad de fluorescencia media (MFI).

Ratones HHD son vacunados (los días 0 y 7) con inyecciones s.c. de 100 µg de péptido o superagonista emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco, Detroit, Michigan) en presencia de 140 µg del epítipo T cooperador HBVcore128 restringido con I-Ab, que estimula una respuesta de células T cooperadoras CD4+.
15 Animales de control reciben IFA que contiene solamente péptido cooperador HBV. El día 11 después de la segunda inmunización, se sacrifica a los animales y 5×10^7 esplenocitos son estimulados in vitro con el mismo péptido que el que se utiliza para la estimulación in vivo (10 µmol/L). El día 6 de cultivo, las poblaciones a granel se ensayan en cuanto a la citotoxicidad específica contra células EL4-HHD o EL4-HHD-peptídicas.

20 Para evaluar la inmunidad protectora sistémica contra el enfrentamiento i.c. del tumor, el día 7 después de la segunda inmunización, ratones HHD reciben una inoculación i.c. de células EL4-HHD-peptídicas. En síntesis, 5×10^4 células EL4-HHD-peptídicas son inyectadas estereotácticamente a través de un sitio de entrada en el bregma 2 mm a la derecha de la sutura sagital y 3 mm por debajo de la superficie del cráneo de ratones anestesiados utilizando un marco estereotáctico. Los animales se vigilan diariamente después del tratamiento en cuanto a la manifestación de signos patológicos.

25 Ratones portadores de tumores i.c. EL4-HHD-peptídicos reciben inmunizaciones los días 14 y 21 después de la inoculación del tumor, se sacrifican por asfixia con CO₂ el día 28, y se perfunden a través del ventrículo cardíaco izquierdo con PBS. Los cerebros se digieren enzimáticamente (Walker et al., 2000, J. Immunol, 165 3128-35; Calzascia et al., 2005, Immunity, 22:175-184), y las células de cada uno de los cerebros se resuspenden en Percoll al 70% (Sigma, Saint Louis, Missouri), se cubren con Percoll al 37% y 30% y se centrifugan durante 20 minutos a
30 500 x g. Poblaciones enriquecidas de linfocitos infiltrantes de cerebro (BIL) se recuperan en la interfase de Percoll al 70% a 37%.

Los datos de supervivencia se compararon mediante una prueba de rango logarítmico. Números comparativos de respuestas de células T son analizados por el test t de Student para dos muestras con varianzas desiguales. La significancia estadística se determina en el nivel $<0,05$. La respuesta positiva también se define como sigue: la lisis específica por las células respondedoras frente a células diana antígeno-positivas es de al menos 15% y 2 veces mayor que los niveles líticos por las condiciones de control correspondientes en al menos dos relaciones efector/diana (E/T). Contrastes post-hoc (p. ej., test 't' de Student) se llevan a cabo para determinar las diferencias significativas, es decir, $p < 0,05$ entre los 3 grupos de animales que recibieron la vacunación de epítipo, vacunaciones control y el control del vehículo PBS. Se utilizan 10 animales/grupo, suficientes para detectar una
40 diferencia de 1,2 SD entre los grupos a una potencia de 0,8 y una $p = 0,05$.

La inflamación del cerebro en respuesta a la vacunación se mide mediante la realización de un análisis estereológico cuantitativo de la infiltración de linfocitos y macrófagos T, B y NK. Un infiltrado celular inmune se detecta sólo en el tumor intracraneal. El influjo de células CD4+, CD8+ y NK se observa en el tumor y el área peritumoral. También se observa una activación incrementada de astrocitos, como se evidencia por la sobre-regulación de inmunorreactividad de GFAP en astrocitos.
45

Ejemplo 7. inducción de Respuestas Inmunes Utilizando Péptidos Superagonistas de CD133

Se determina la capacidad de los péptidos superagonistas de CD 133 para inducir CTLs capaces de reacción cruzada contra el epítipo de tipo salvaje. Se realizan ensayos de unión y estabilidad de HLA para determinar si la inmunogenicidad mejorada de los péptidos análogos es al menos parcialmente atribuible a una mayor
50 unión/estabilidad de estos péptidos superagonistas en complejos de HLA que se requieren para el reconocimiento de CTL específico. Se llevan a cabo ensayos de CTL que analizan la reactividad frente a la titulación de la dosis de

péptidos en las células diana T2 para detectar si los CTLs desarrollados utilizando los péptidos superagonistas poseen una mayor avidéz funcional que los cebados con el péptido de tipo salvaje. Clones de CTL dirigidos contra el péptido-epítipo agonista tienen un uso más restringido del receptor de células T (TCR) y una mayor avidéz funcional TCR que los clones de CTL dirigidos contra el péptido-epítipo natural.

- 5 PBMCs se obtienen de pacientes con glioma y donantes sanos bajo un protocolo aprobado por la Junta de Revisión Institucional. La expresión de HLA (p. ej., HLA-A2) en la PBMC se valida utilizando los (mAbs) contra MA2.1 (HLA A2, B17) y BB7.2 (contra HLA A2, Aw69: ambos de American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) en ensayos de inmunofluorescencia indirecta vigilados por citometría de flujo.

- 10 Clones de CTL restringidos a HLA-A*0201 específicos para CD133 de péptido-epítipos naturales y superagonistas se generan in vitro. Las células dendríticas derivadas de monocitos recolectadas maduras (mMoDC) se pulsaron con péptidos naturales y superagonistas (20 μ M) y, después del lavado, se mezclan con células T CD8+ enriquecidas magnéticamente de PBMCs CD14 negativas descongeladas criopreservadas o PBMCs recientes. mMoDC pulsadas con péptidos y células T CD8+ enriquecidas se mezclan en una relación de 1:20 en presencia de sCD40L (2 μ g/ml) para iniciar la polarización Th1 de mMoDC, que refuerza la producción de IL-12 (Mailliard et al., 2002, J. Exp. Med. 195:473-483; Mailliard et al., 2004, Cancer Res., 64:5934-37). El tercer día, el cultivo de cebado se complementa con IL-2 (50 U/ml) e IL-7 (10 U/ml), y el día 12 el cultivo se re-estimula con PBMC autóloga pulsada en péptido. Los días 24-28, el cultivo de cebado se ensaya mediante tinción con tetrámero en cuanto a la presencia de CTL cebado expandido, específico para el péptido utilizado. Como control positivo, se efectúa al mismo tiempo el cebado con p24HIV-1 (SLYNVATL; SEQ ID NO: 24) restringido a HLA-A*0201 (Kan-Mitchell et al, 2006, J. Immunol., 176:6690-6701; Mitchell et al., 2007, Cancer Immunol. Immunother., 56:287-301).

- 25 Para la evaluación de la estabilidad, células T2 derivadas del paciente (1×10^6 por mL) se incuban durante la noche con 100 μ mol/L de cada uno de los péptidos en RPMI 1640 libre de suero a 37°C. Posteriormente, las células se lavan cuatro veces para separar péptidos libres y se incuban a 37°C durante 0, 3 ó 6 horas. Las células se tiñen con el mAb BB7.2 para evaluar la expresión de la molécula de HLA-A2 en cada momento. La expresión de HLA-A2 inducida por el péptido se evalúa calculando la fluorescencia media de células T2 incubadas con péptido menos la fluorescencia media de células T2 en ausencia de péptido. La DC50 se mide como el tiempo requerido para la pérdida de 50% de los complejos HLA-A2/péptido estabilizados en $t = 0$.

- 30 El uso de TCR de clones de CTL se determina por la expresión de la región variable de la cadena β (V- β) de TCR. La expresión de TCR-V- β y V- α entre las células T CD8 expandidas clonalmente se evalúa mediante una PCR en tiempo real utilizando una sonda fluorogénica (Lang et al., 1997, J. Immunol. Methods, 203:181-192). Este método ofrece un grado similar de sensibilidad para la detección convencional de la expresión TCR-V- β con un tiempo de procesamiento reducido. En síntesis, se realizan una extracción de ARN total y una transcripción inversa. En la etapa de PCR, una sonda V- β -específica 5', cebadores CB 3' comunes y una sonda fluorogénica interna se utilizan para amplificar 26 posibles genes V- β . La detección y cuantificación de los productos de la PCR se realizan mediante el uso de un Sistema de PCR Rápido en Tiempo Real 7900HT (Applied Biosystems), con el que es posible calcular la relación semi-cuantitativa de la expresión de TCR V- β de entre las células T CD8 expandidas clonalmente. Una vez que se determina la expresión de una TCR V- β , usando el mismo cebador específico para V- β se determina la secuencia correspondiente a CDR 3. Esto permite la delimitación de la clonalidad de los CTLs.

- 40 Se realiza el análisis de descomposición de tetrámeros para determinar la avidéz de TCR por los clones de CTL (Savage et al., 1999, Immunity, 10:485-492). Clones de CTL se tiñen con tetrámero (1-25 nM), como en los experimentos de unión en equilibrio anteriores. Las células se lavan dos veces con tampón FACS (FCS al 4% y azida de sodio al 0,1% en PBS) y se mantienen en hielo hasta que se mezclan con un exceso de mAb anti-HLA-A02 (BB7.2, BD Biosciences) y después se incuban a temperatura ambiente para permitir la disociación del tetrámero. El mAb anti-HLA-A02 se utiliza para bloquear la re-unión del tetrámero al TCR. La disociación es seguida durante 0-45 180 minutos, después de lo cual las células se lavan rápidamente con tampón enfriado con hielo para separar todo el tetrámero no unido y el mAb de bloqueo. Las células se fijan a continuación para el análisis por citometría de flujo (CyanADP, Beckman-Coulter). El logaritmo natural del porcentaje de la fluorescencia media geométrica (GMF) en cada momento (comparado con 0 minutos) se representa en función del tiempo. La semivida de cada uno de los multímeros pMHC se deriva de la pendiente por la ecuación $t_{1/2} = -\ln 2 / \text{pendiente}$.

- 50 La actividad de CTL de los clones de CTL cebados in vitro se mide por el ensayo de citometría de flujo (Betts et al, 2003, J. Immunol. Methods, 281:65-78; Betts et al., 2004, Methods Cell Biol., 75:497-512). En síntesis, el cultivo de cebado que contiene el clon de CTL se mezcla 1:1 con células T2 pulsadas con péptidos durante 6 horas en presencia de CD107a, monensina y Brefeldina A. Después de la incubación durante 6 horas, las células se tiñen con correspondientes tetrámeros y mAb anti-CD8, seguido por IFN- γ intracelular y tinción con TNF α . Las células teñidas

se ejecutan en Beckman Coulter-CyanADP (color 9, 11 parámetros) para el análisis por citometría de flujo. Todos los ensayos se realizan por triplicado.

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

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

15 Se miden la afinidad relativa (RA) de péptidos superagonistas de CD133 para HLA-A*0201. En síntesis, células T2 se incuban con diversas concentraciones de péptidos que oscilan entre 100 y $0,1 \mu\text{M}$ durante la noche y después se tiñen con el mAb BB7.2 para cuantificar la expresión en superficie del alelo de HLA-A*0201. Para cada una de las concentraciones de péptido, la tinción específica para HLA-A*0201 se calcula como el porcentaje de tinción obtenido con $100 \mu\text{M}$ del péptido de referencia HIVpo1589 (IVGAETFYV; SEQ ID NO: 25). La RA se determina como: RA = (concentración de cada uno de los péptidos que induce el 20% de expresión/concentración de HLA-A*0201 de péptido de referencia que induce el 20% de la expresión de HLA-A*0201).

20 Se evalúa la estabilidad de complejos de péptido superagonista/HLA-A*0201. En síntesis, células T2 se incuban durante la noche con $100 \mu\text{M}$ de cada uno de los péptidos. Las células se incuban después con Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO) a razón de $10 \mu\text{g/ml}$ durante 1 hora, se lavan, se incuban a 37°C durante 0, 2, 4 ó 6 horas en presencia de Brefeldina A ($0,5 \mu\text{g/ml}$), y después se tiñen con el mAb BB7.2. Para cada momento, la expresión de HLA-A*0201 inducida por péptidos se calcula como: fluorescencia media de células T2 preincubadas con péptido - fluorescencia media de células T2 tratadas en condiciones similares en ausencia de péptido. La DC50 se define como el tiempo requerido para la pérdida del 50% de los complejos de HLA-A*0201/péptido estabilizados a $t = 0$.

30 Los CTL se generan a partir de PBMCs humanas. PBMCs se recogen por leucoféresis de voluntarios HLA-A*0201 sanos. Las células dendríticas se producen a partir de células adherentes (2×10^6 células/ml) cultivadas durante 7 días en presencia de 500 UI/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Leucomax; Schering-Plough, Kenilworth, Nueva Jersey) y 500 UI/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) en medio completo [medio RPMI 1640 complementado con suero AB humano al 10% inactivado por calor, L-glutamina $2 \mu\text{M}$ (Invitrogen) y antibióticos]. El día 7, las células dendríticas se recogen y pulsan con $40 \mu\text{g/ml}$ de péptido en presencia de $3 \mu\text{g/ml}$ de β2m (Sigma) durante 4 horas a 20°C y luego se irradian (4200 rad). Células T CD8+ se aíslan por selección positiva con perlas inmunomagnéticas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un total de $0,5 \times 10^6$ células T CD8+ se co-cultivan con $0,25 \times 10^5$ células dendríticas en un volumen final de $0,5 \text{ mL/pocillo}$ en una placa de 48 pocillos en presencia de 10 ng/mL de IL-7 (R&D Systems). IL-10 humana (R&D Systems) a 10 ng/ml se añade al día siguiente y 30 UI/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Corp.) se añade el segundo día. Siete y 14 días después de la estimulación primaria, las células T CD8+ se re-estimulan con células adherentes irradiadas pulsadas con $10 \mu\text{g/ml}$ de péptido en presencia de $3 \mu\text{g/ml}$ de β2m . IL-10 humana (10 ng/ml) e IL-2 (50 UI/ml) se añaden 24 y 48 horas más tarde, respectivamente. Siete días después de la segunda re-estimulación, los pocillos individuales de los cultivos se ensayan en cuanto a la citotoxicidad específica del péptido en células T2 cargadas con péptidos en presencia de células K562 frías (relación de objetivo caliente/fría de 1:33).

45 CTL también se generan de pacientes de glioblastoma. PBMCs de un total de 30 pacientes con glioma HLA-A2+ son evaluados en cuanto a su capacidad de respuesta in vitro frente a los péptidos de tipo salvaje y superagonistas. Se determina la proporción de pacientes humanos que desarrollarán CTLs específicas capaces de reconocer el péptido de CD133 de tipo salvaje después de la estimulación con el péptido superagonista. También se determina si estas células T2 pulsadas con péptido que reconocen CTL o líneas de células madre del cáncer HLA-A2+ que expresan CD133.

50 Se detecta la producción intracelular de IFN- γ . Un total de 5×10^4 células T se incuban con 10^5 células T2 cargadas con péptido o con 10^5 células tumorales en presencia de $20 \mu\text{g/ml}$ de Brefeldina A a 37°C . Seis horas más tarde, las células se tiñen con el mAb anti-CD8 conjugado con ficoeritrina (Caltag Laboratories, Burlingame, California) en PBS durante 25 minutos a 4°C y se fijan con PBS paraformaldehído al 4% (Sigma). Las células se permeabilizan después con PBS + BSA al 0,5%+ saponina al 0,2% (Sigma) y se tiñen con el mAb anti-IFN- γ conjugado con poliposid coli

adenomatosa (PharMingen, Mississauga, Ontario, Canadá) durante 25 minutos a 4°C. Las células se analizan en un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

5 Kits de ensayo inmunosorbente-spot ligado a enzimas (ELISPOT) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) se utilizan para detectar las respuestas inmunes. PBMC de 1×10^5 pacientes respondedoras (R) antes y después de la vacunación se siembran en placas de 96 pocillos con insertos de membrana de nitrocelulosa recubiertas con Ab de captura. Se añaden células estimuladoras (S) (péptido potencial pulsado con T2) en la relación R:S de 1:1. Después de una incubación durante 24 horas, las células se separan 4 veces por lavado de las placas. El Ab de detección se añade a cada uno de los pocillos. Las placas se incuban a 4°C durante la noche y se repiten las etapas de lavado. Después de una incubación durante 2 horas con estreptavidina-fosfatasa alcalina se lavan las placas. Partes alícuotas (100 µl) de disolución de sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT se añaden a cada uno de los pocillos para desarrollar las manchas. La reacción se detiene después de 60 min mediante lavado con agua. Las manchas se escanean y se cuentan con el análisis de imágenes asistido por ordenador (Cellular Technology Ltd, Cleveland, Ohio). Cuando los valores experimentales son significativamente diferentes del número medio de manchas frente a las células T2 no pulsadas (valores de fondo), tal como se determina por una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de dos colas, los valores de fondo se restan de los valores experimentales. Este ensayo proporciona un coeficiente de variación de intra-ensayo para ELISPOT de menos de 10%.

20 Los CTLs inducidos por superagonistas poseen una mayor avidéz, ya sea debido a una mayor afinidad o estabilidad entre los TCRs y complejos de péptido-MHC. La avidéz más alta se correlaciona con la avidéz de interacciones diana de células T, y la capacidad de respuesta antitumoral de las células T. La intensidad (Yee et al., 1999, J. Immunol., 162:2227-34) o la estabilidad (Dutoit et al., 2002, J. Immunol., 168:1167-71) de la tinción de células T específica con tetrámeros de HLA, y el umbral de tinción positiva utilizando dosis de titulación de tetrámeros (Ercolini et al, 2005, J. Exp Med., 201:1591-1602) son indicativos de la avidéz relativa de células T específicas.

Ejemplo 8. Ensayos Funcionales de Péptidos Inmunogénicos

25 Este ejemplo demuestra la utilidad de algunos de los péptidos inmunogénicos HLA-A2 descritos en esta memoria en ensayos funcionales.

PBMC HLA-A2 positivas aisladas por leucoféresis de dos sujetos humanos sanos se obtuvieron de HemaCare Corporation (Van Nuys, California). La PBMC de cada uno de los sujetos se utilizó para preparar células T CD8+ y células dendríticas autólogas para la estimulación con péptidos inmunogénicos. Después de la estimulación, las células T se sometieron a ensayos funcionales.

30 Células T CD8+ se prepararon a partir de PBMC de cada uno de los sujetos por selección positiva utilizando microperlas CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 DC autólogas se prepararon a partir de PBMC adherente (2×10^6 células/ml), se cultivaron durante 5 días en presencia de 500 UI/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Leucomax; Schering-Plough, Kenilworth, Nueva Jersey) y 500 UI/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) en medio completo [RPMI 1640 suplementado con suero AB humano al 10% inactivado por calor, L-glutamina 2 µM (Invitrogen) y antibióticos]. El día 5, la maduración de DC fue inducida por la adición de 50 ng/ml de TNF-α. El día 7, las DC maduras se recogieron y se pulsaron con el 20 µg/ml de péptido durante 4 horas a 20°C. Las DC pulsadas con péptido no utilizadas de inmediato fueron congeladas para su uso posterior.

40 Las DC maduras pulsadas con péptido se diluyeron hasta 3×10^5 células/mL en medio completo de CTL y se irradiaron a 2800 Rads. La estimulación inicial in vitro se realizó en una relación DC:células T de 1: 5 mediante siembra en placas de 100 µL/pocillo de cada uno de los lotes de DC en una placa de cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos (3×10^4 DC/pocillo). Por cada péptido se preparó una placa. A todos los pocillos se añadieron 100 µL de la población de células T enriquecida con CD8+ a razón de $1,5 \times 10^6$ células/mL, resultando una concentración final de $1,5 \times 10^5$ células T/pocillo. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de dióxido de carbono y humedad alta.

45 Los días 7 y 14, DC maduras pulsadas con péptido crioconservadas se descongelaron y se utilizaron para re-estimular las células T. Muestras crioconservadas de cada uno de los lotes de DC pulsadas con péptido fueron separadas de nitrógeno líquido y descongeladas rápidamente en un baño de agua a 37°C. Las muestras se diluyeron al menos 1:10 con medio AIM V (Invitrogen, Carlsbad, California). Las muestras se lavaron dos veces por centrifugación a 400 g durante 7 minutos, y se evaluaron muestras representativas para la concentración y la viabilidad celular. Cada uno de los lotes de DC se diluyó a 3×10^5 células/mL en medio completo de CTL que

contenía 20 U/mL de IL-2, 10 ng/mL de IL-7 y 2 µg/mL del péptido específico, y las DC se irradiaron con 2800 rads. Placas de estimulación in vitro se retiraron cuidadosamente de la incubadora y 90 µL de sobrenadante (sin células) se retiraron de cada uno de los pocillos. A cada uno de los pocillos se añadieron 100 µL del lote de DC adecuado. Las placas se incubaron a continuación adicionalmente a 37°C, 5% de dióxido de carbono y humedad alta.

5 Después de la segunda estimulación in vitro, las placas se verificaron diariamente en cuanto a la proliferación de células T. Cuando se requería, las placas se dividieron (una placa se convertirá en dos placas) para evitar el crecimiento excesivo de los CTL. Generalmente, esto se produjo los días 19, 23, 26 y 30. Las placas se mezclaron para asegurar una población homogénea, a continuación se transfirieron 90 µL de cada uno de los pocillos de CTL a una nueva placa de fondo plano en U de 96 pocillos. Cuando la división se llevó a cabo en el espacio de 3 días de la
10 última estimulación in vitro, se añadieron 100 µL de medio completo de CTL que contenía 20 U/mL de IL-2 y 10 ng/mL de IL-7. Si la división se llevó a cabo más de 3 días más tarde desde la última estimulación in vitro, se añadieron 100 µL de medio de CTL completo que contiene 40 U/mL de IL-2 y 20 ng/mL de IL-7. Las placas divididas se devolvieron a la incubadora a 37°C, 5% de dióxido de carbono y humedad alta.

15 El día 21, las células T se estimularon por cuarta vez. Se repitió el proceso descrito para las estimulaciones in vitro 2-3, con la excepción de que IL-2 se reemplazó por 25 ng/mL de IL-15.

Los CTL estimulados se analizaron para la tinción utilizando dímeros de péptido-HLA-A2. Las células se recogieron 19 días después de la tercera estimulación (sujeto 1) o 6 días después de la cuarta estimulación (sujetos 1 y 2). Dímeros de cada uno de los péptidos presentados en HLA-A2 se prepararon utilizando BD™ DimerX I: Proteína de Fusión HLA-A2:Ig Recombinante Soluble Dimérica Humana (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del
20 fabricante en un exceso de 640 veces de péptido y 2 µg de proteína HLA -A2:Ig. La proteína de fusión HLA-A2:Ig consiste en tres dominios HLA-A2 de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I extracelulares que están condensados a las regiones VH de IgG1 de ratón. La tinción por inmunofluorescencia se realizó esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los CTL se lavaron y se resuspendieron en tampón de tinción FACS. La unión no específica se bloqueó con IgG humana policlonal. Se añadió la proteína HLA -A2:Ig cargada con péptido, y las muestras se incubaron durante 60 minutos a 4°C. Las células se lavaron y se añadió de nuevo
25 disolución de bloqueo de IgG humana. Para la inmunofluorescencia se añadió IgG1 anti-ratón conjugada con PE que contiene tampón FACS. Después de la incubación a temperatura ambiente, las células se fijaron en paraformaldehído al 2% y se analizaron por citometría de flujo. Los porcentajes de células que se tiñeron de forma positivas (por encima del fondo) tanto para el dímero como para CD8 se indican en la Tabla 7 que figura a continuación. Las SEQ ID NOs: 11 y 21 tiñeron fuertemente por encima del fondo, las SEQ ID NOs: 28 y 29 tiñeron
30 moderadamente por encima del fondo y la tinción de SEQ ID NO: 20 era indistinguible del fondo.

Tabla 7. Tinción del Dímero de Péptido

SEQ ID NO	Antígeno	Secuencia	Sujeto 1		Sujeto 2
			3ª estim.	4ª estim	4ª estim
11	CD 133	YLQWIEFSI	38,64	20,74	19,39
21	CD133	FLLPALIFA	20,43	13,23	21,18
28	CD133	ILSAFSVYV	4,15	0,12	14,08
20	CD 133	GLLERVTRI	0,27	-0,41	-0,32
29	Mart-1a	ELAGIGILTV	0,50	0,82	0,68
		sin péptido	NT	0	0,01

35 Los CTL se recogieron 6 días después de la tercera y cuarta estimulaciones para el análisis por ELISPOT. Las células efectoras (5000 ó 25.000 células T estimuladas con DC pulsadas con péptido o DC sin péptido) se sembraron en placas de 96 pocillos con insertos de membrana de nitrocelulosa recubiertos con Ab IFN-γ anti-humano. Células estimuladoras (1×10^5 DC pulsadas con péptido) se añadieron a cada uno de los pocillos. 5 µg/ml de PHA se utilizaron como control positivo. Después de una incubación durante 16-20 horas, las células se retiraron por lavado de las placas. A cada uno de los pocillos se añadió un Ab de detección de IFN-γ anti-humano biotinilado
40 (mAb 7-B6-1Biotina de Mabtech), y las placas se incubaron a 20°C durante 2 horas. Después de incubación durante 1 hora con complejo de avidina-fosfatasa (Vectastain ABC Elite), se lavaron las placas. Partes alícuotas de sustrato de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (Kit AEC de Vectastain) se añadieron a cada uno de los pocillos para desarrollar las manchas. La reacción se detuvo después de 4-10 minutos (cuando aparecieron manchas) mediante lavado con agua. Las manchas se inspeccionaron visualmente. Los pocillos que claramente tenían más manchas que el control

negativo se indicaron como positivos (Tabla 8). Para el sujeto 1, sólo Mart-1a era positiva; para el sujeto 3, tanto Mart-1a como SEQ ID NO: 11 eran claramente positivas.

Tabla 8. Ensayo ELISPOT

SEQ ID NO	Secuencia	Sujeto 1		Sujeto 2	
		3ª estim	4ª estim	3ª estim	4ª estim
11	YLQWIEFSI	-	-	-	++
21	FLLPALIFA	-	-	-	-
28	ILSAFSVYV	-	-	-	-
20	GLLERVTRI	-	-	-	-
29	ELAGIGILTV	-	++	++	++

- 5 Este ejemplo demuestra que los péptidos inmunogénicos descritos en esta memoria pueden estimular la inducción de CTL.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunógeno, que comprende un péptido aislado de 100 residuos aminoácidos o menos que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ó 21 con dos o menos sustituciones de aminoácidos.
- 5 2. El inmunógeno de la reivindicación 1, en donde el inmunógeno es de 80 o menos, 60 o menos, 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 14 o menos, 13 o menos, 12 o menos, 11 o menos, 10 o menos o 9 residuos aminoácidos de longitud.
3. El inmunógeno de la reivindicación 1 ó 2, en donde el inmunógeno tiene la secuencia de aminoácidos recogida en una cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20 ó 21.
- 10 4. El inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el inmunógeno tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 11.
5. Una composición que comprende el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La composición de la reivindicación 5, que comprende, además, un adyuvante o una citoquina.
- 15 7. La composición de la reivindicación 6, en donde el adyuvante comprende adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, Montanide ISA-51, LAG-3, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, alumbre o saponina.
8. La composición de la reivindicación 5, en donde el inmunógeno está unido a un soporte inmunogénico.
- 20 9. La composición de la reivindicación 5, que comprende, además, un soporte farmacéuticamente aceptable, en particular en donde el soporte farmacéuticamente aceptable es un liposoma, un complejo inmunoestimulante (ISCOM) o una partícula de liberación lenta.
10. La composición de la reivindicación 5, en donde la composición comprende células presentadoras de antígenos.
11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 para uso en inmunizar a un sujeto.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, para uso en el tratamiento de un cáncer.
- 25 13. Un método *in-vitro* para inducir un linfocito T citotóxico (CTL) que es específico para una célula que expresa CD133, comprendiendo el método poner en contacto un precursor de CTL con el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 bajo condiciones que generan una respuesta de CTL a dichas células tumorales.
- 30 14. Un método para preparar una vacuna de células para tratar un cáncer, comprendiendo el método: cultivar células mononucleares derivadas de la médula ósea en un recipiente de cultivo bajo condiciones en las que las células mononucleares se pueden adherir al recipiente; seleccionar un subconjunto de las células mononucleares que comprenden células que se han adherido al recipiente; cultivar el subconjunto de las células mononucleares en presencia de una o más citoquinas en condiciones en las que el subconjunto de las células mononucleares se diferencian en células presentadoras de antígenos; y
- 35 cultivar las células presentadoras de antígenos en presencia del inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en condiciones en las que las células presentan los péptidos sobre moléculas de histocompatibilidad principal de clase I, preparando de este modo una vacuna de células.
15. Una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos que codifican el inmunógeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

ES 2 618 573 T3

```

Hsap MALVLGSLLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVH 60
Ptro MALVLGSLLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHKAGPIGILFELVH 60
Mmul MALVLGSLLLLGLCGNSFSGGQPSSTDAPKAWNYELPATNYETQDSHTAGPIGILFELVH 60
Rnor MALVFSVLLLLGLCGKMASGGQPAFDNTPGALNYELPTTEYETQDTFNAGIIDPLYQMVH 60
Mmus MALVFSALLLLGLCGKISSEGGQPAFHNTPGAMNYELPTTKYETQDTFNAGIVGPLYKMH 60
Cfam MALLLGFLLLLLELCWDTLSALGPLSSTKGS DGLFELPATNYETKDSNQAGPISVLFQIVQ 60
Btau MALLLGFLLLLGLCEDTLSEELSSSGYRDPGLEFQLPPTS YQTS DSDYDPGLAGFFFQIVR 60
***:.. ***** ** . : : . . :*:*.*.*.*.*: .* . :*:*:

Hsap IFLYVVQPRDFPEDTLRKFLQ-KAYESKIDYDKPETVILGLKIVYYEAGIILCCVLGLLF 119
Ptro IFLYVVQPRDFPEDTLRKVIQ-KAYESKIDYDKPETVILGLKIVYYEAGIILCCVLGLLF 119
Mmul IFLYVVQPRDFPEDTLRKVIQ-KARESKIDYDKPETLILGLKIIYYEAGIILCSVLGLLF 119
Rnor IFLNVVQPNDFPQDLVKKLIQ-KRFDISVDTKE-----VAIYEIGVLICVILGLLF 110
Mmus IFLSVVQPNDFPLDLIKKLIQNKKFDISVDSKEPEIIVLALKIALYEIGVLICAILGLLF 120
Cfam VFLQVVQPHFPEDILRKILQ-KKFDSTDYDK-----IIYYEIGIICAVLGLLF 110
Btau FFVQIVQPNAFPEDILRKIIQ-KKFDLSKEYDKPENVVLT LKIIYYEIGIICAAVGLLF 119
.*: :*. *. * :*:.* * : . : . : : * * *:::* *****

Hsap IILMPLVG YFFCMCRCCNKC GGEMHQ RQKENG PFLRKCFAISLLVICIIISIGIFYGFVA 179
Ptro IILMPLVG YFFCMCRCCNKC GGEMHQ RQKENG PFLRKCFAISLLVICIIISIGIFYGFVA 179
Mmul IILMPLVG YFFCMCRCCNKC GGEMHQ RQKENG LFLRKCFAISLLVICIIISIGIFCGFVA 179
Rnor IFLMPLV GFFFCMCRCCNKC GGEMHQ RQKQNE SCRRKCLAI SLLLICLLMSLGI AFGFVA 170
Mmus IILMPLV GCFMCRCCNKC GGEMHQ RQKQNA PCRRKCLGLSLLVICLLMSLGI IYGFVA 180
Cfam VILMPLV GFCFLCRCCNKC GGEMHQ RQKKN GAFLRKYFTV SLLVICIFISVGI IYGFVA 170
Btau VILMPLV GFFFCLCRCCNKC GGEMHQ RQKKS GPF LKKYFTI SLLVICVFISIGI IYGFVA 179
::***** * :*****:.. :* : :*:*:*:*:*: **.*

Hsap NHQVRTRIKRSRKLADSNFKDLR TLLNETPEQIKY I LAQYNTTKDKAFTDLNS INSVLGG 239
Ptro NHQVRTRIKRSRKLADSNFKDLR TLLNETPEQIKY I LAQYNTTKDKAFTDLNS INSVLGG 239
Mmul NHQVRTRIKRSRKLADSNFKDLR TLLNETPEQIKY I LAQYNTTKDKAFSDLNS INSVLGG 239
Rnor NQQRTRIQRTQKLAESNYRDLR ALLTEAPKQIDY I LGQYNTTKNKA FSDLSDS I DSVLGG 230
Mmus NQQRTRIKGTQKLAESNFRDFQ TLLTETPKQIDY VVEQY T NTKNKA FSDLGIGSVLGG 240
Cfam NHHLRTRIEKTRKLAESNLKDLR TLLIGTPAQI NYVLSQYASTKEKAFSDLN IKSLLGG 230
Btau NHYMRTNVEETRKLSESNLNDLR TLLNVVPGQIDY I LDQFTLPKEKAFDDL NINLLVGG 239
*: **.: :*:*. ** .*:*:*. * **.*: * : .*:*** **.* :*:

Hsap GILDRLRPNIIPVLDEIKSMATA-----IKETKEALEN MN 274
Ptro GILDRLRPNIIPVLDEIKSMATA-----IKETKEALEN MN 274
Mmul GILDRLRPNIIPVLDEIKSMATA-----IKETKEALEN MN 274
Rnor RIKGQLKPKVTPVLEEIKAMATA-----IRQTKDALQN MS 265
Mmus RIKDQLKPKVTPVLEEIKAMATA-----IKQTKDALQN MS 275
Cfam GIHDQLRPKVIPVLDDIKAMAEA-----IKETREALLN VN 265
Btau SIYERLKP KVL PVLKDIKDLAEDGKGF PPLVSPV GASVLKQAVFL TDMKTNRD TLVRMN 299
* :*:*:*: **:*. ** :* : :*:*:*. **.*

```

FIG. 1A

ES 2 618 573 T3

```

Hsap  STLKSLHQQSTQLSSSLTSVKTSLRSSLNDPLCLVHPSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQ  334
Ptro  STLKSLHQQSTQLSSSLTSVKTSLRSSLNDPLCLVPSSEICNSIRLSLSQLNSNPELRQ  334
Mmul  STLKSLHQQSTQLSSSLTSVKTSLRASLNDPLCSVPSSETCNSIRLSLSQLNSNPELRQ  334
Rnor  SSLKSLRDASTQLSTNLTSVRNSIENSLNSNDCASDPASKICDSLRLPQLSNLGSNHNGSQ  325
Mmus  SSLKSLQDAATQLNTNLSSVRNSIENSLSSSDCTSDPASKICDSIRPSLSSLGSSLNSSQ  335
Cfam  NTLKELKMSTAQLNTSLSDVQRNLEQSLNDPMCSVPPVATTCCNNIRMSLGQLDDNTNLGQ  325
Btau  TVLTDMKQSSAQLRTSLRDVKTNMEQTLMDPQCSSPAAAPTCD SIRKSLSVLDGSANFDH  359
      . * . . . : : : * * : . * . * : . . : * . * . : * : : * : : * . * . . . : :

Hsap  LPPVDAELDNVNNVLRDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQRQTTTVVAGIKRVLNSIGSDID  394
Ptro  LPPVDAELDNVNNVLRDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQRQTTTVVAGIKRVLNSIGSDID  394
Mmul  LPSVDAELDKVNNVLRDLDGLVQQGYQSLNDIPDRVQSQTKTVVAGIKRVLNSIGSDID  394
Rnor  LPSVDRELNTVNDVDRTDLESVLRKGYMSIDEIPNMIQNQOTGDVIKDVKKTLDVSSKVK  385
Mmus  LPSVDRELNTVTEVDKTDLESVLRKGYTTIDEIPNTIQNQTVDVIKDVKNTLDSISSNIK  395
Cfam  LPSLDKQIDNINNVLQTDLSSLVQKGYKSFNDIPEMVQNQTTDIVSDVKRTLNSLGSIE  385
Btau  LPSLDGHITQLDGLLQTDLSGLVQKANESLSNIPEEVQNQTRDFISEFKKTLNSLQSDVK  419
      ** : * : : : : * * . * * : . : : * * : * * * : : . * . * * : * : .

Hsap  NVTQRLPIQDILSAFSVYVNNTESYIHRNLPTLEEYDSYWWLGGLVICSLLLTLIVIFYLL  454
Ptro  NVTQRLPIQDILSEFSVYVNNTESYIHRNLPTLEEYDSYWWLGGLVICSLLLTLIVIFYLL  454
Mmul  NVTQHLPIQNILSEFSVYVNNTESYIHRNLPTLEEYDSYWWLGGLVICSLLLTLIVIFYLL  454
Rnor  NMSQSIPEEVLQFQSHYLNDSNRYIHESLPRVEEYDSYWWLGGLVICFLLTLIVTFYYL  445
Mmus  DMSQSIPIEDMLLQVSHYLNNSNRYLNQELPKLEEYDSYWWLGGLVICFLLTLIVTFYYL  455
Cfam  NMSEQIPIQDKLSDFIGYINDTETYIHRNLPTLEEYDSYRWLGGLVICCLLLTLIVFYLL  445
Btau  NISTKIPIQKTLNMFVRYINDSEDIYIQLPTMEECDSYRWLVCLVICCLLLTLILIFYLL  479
      : : : : * * . * * : : * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Hsap  GLLCGVCGYDRHATPSTRGCVSNTGGVFLMVGVLGSLFLFCWILMIIVVLTFFVFGANVEKL  514
Ptro  GLLCGVCGYDRHATPSTRGCVSNTGGVFLMVGVLGSLFLFCWILMIIVVLTFFVFGANVEKL  514
Mmul  GLLCGVCGYDRHATPSTRGCVSNTGGVFLMVGVLGSLFLFCWILMIIVVLTFFVFGANVEKL  514
Rnor  GLLCGVFGYDKRATPSTRGCVSNTGGIFLMAGVGFSLFLFCWILMILVVLTFFVFGANVEKL  505
Mmus  GLLCGVFGYDKHATPSTRGCVSNTGGIFLMAGVGFSLFLFCWILMILVVLTFFVFGANVEKL  515
Cfam  GLMCGTFGYDRHATPSTRGCVSNTGGIFLMVGVGISFLFLFCWILMTIVVLTFFVIGGNMEKL  505
Btau  GLLCGTLGYDQKATPSTRGCVSNTGGLLLMVGVLGSLFFFSWIIMTIVVLTFFVTGGNMEKL  539
      ** : * * . * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Hsap  ICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEYYLSGKLFNKSKMKLTFEQVYSDCKKNRGTYGTLLH  574
Ptro  ICEPYTSKELFQVLDTPYLLNEDWEYYLSGKLFNKSKMKLTFEQVYSDCKKNRGTYGTLLH  574
Mmul  ICEPYTSKELFRVLDTPYLLNEDWEYYLSGKLFNKSEMKLTFFQVYSDCKKNRGTYGTLLH  574
Rnor  LCEPYENKLLQVLDTPYLLNDQWQFYLSGILLKNPDINMTFEQVYRDCKRGRGVYATFQ  565
Mmus  LCEPYENKLLQVLDTPYLLKEQWQFYLSGMLFNNPDINMTFEQVYRDCKRGRGIYAAFQ  575
Cfam  VCEPYQNRKLFQILDTPYLLNENWKYYLSGMVLDKPDINLTFEQVYSDCKENKGIYSTLK  565
Btau  VCEPYRNKLFQVLDTPYLLNEDWKYYLSGLVFNKPDINLTFEQVYSDCKENKGLYATLK  599
      : * * * * . : : : : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIG. 1B

ES 2 618 573 T3

Hsap LQNSFNISEHLNINEHTGSSISSELESKVNLN-IFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDS 633
 Ptro LQNSFNISERLNINEHTGSSISSELESKVNLN-IFLLGAAGRKNLQDFAACGIDRMNYDS 633
 Mmul LENSFDISDYLNINEHTASISSELESKVNLN-IFLLGAAGRKSLQDFAACGIDRMNYDT 633
 Rnor LENVFNITENFNIERLSEDIVKELEKLVNIDSIELLDKTGRKSLEDFFAQSGIDRINYSM 625
 Mmus LENVVNSDHFNIDQISENINTELENLVNIDSIELLDNTGRKSLEDFAHSGIDTIDYST 635
 Cfam LENTYNISEHLNIQEHAHRLNSNDFKNMNVNIDNIVLLDAAGRKNLMDFSSSGVDTIDYNV 625
 Btau LDHIYNVSEQLNITKHTGDINSNLENMNIREDIEELLDKTGMKTLMDLRSSGIDDIDYAA 659
 *:: :::: :** . : .: .:~::~:~::~: * ** . : * * . * * : . * : * : *

Hsap YLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVLPPIEQSLS 693
 Ptro YLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVLPPIEQSLS 693
 Mmul YLAQTGKSPAGVNLLSFAYDLEAKANSLPPGNLRNSLKRDAQTIKTIHQQRVLPPIEQSLS 693
 Rnor YLQEAEKPPTKVDLLTFASFLETEANQLPDGNLQKQAFLLMDAQNIRAIHQHVPPVQQSLN 685
 Mmus YLKETEKSPTEVNLLTFASTLEAKANQLPEGKPKQAFLLDVQNIIRAIHQHLLPPVQQSLN 695
 Cfam YLAEMGKTPTKVNLLSFADDDLTKANLNPQGSLSKQSLKNNNAQNLTIKTIHQVMPLEQSMS 685
 Btau YLNATERSPTRVNLI SFANNLRRKANQLPSGNLKTSLKSHDTLTNIHENQVVPVLPQNSMN 719
 ** : * : * : * : * * * : * * . * . : : : . . : : * * . : * : * : *

Hsap TLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASLDFAQNFITNNTSSVIEETKKYGRTIIGYFEHY 753
 Ptro TLYQSVKILQRTGNGLLERVTRILASLDFAQNFITNNTSSVIEETKKYGRTIIGYFEHY 753
 Mmul TLYQSVKILQRTGNGLLERVNRILASLDFAQNFITNNTSSVIEETKKYGRTIIGYFEHY 753
 Rnor SLKQSVWALKQTSKSLPEEVKVLASLDSAQHFLTSNLSSIVIGETKKFGRTIIGYFEHY 745
 Mmus TLRQSVWTLQQTSNKLPEKVKKILASLDSVQHFLTNNVSLIVIGETKKFGKTIIGYFEHY 755
 Cfam TINQSIKELQHKSSGLRVKVANILSSLDSAQDFLQTRISSVIVKESKYGNMIIGYFEHY 745
 Btau AMHQQMKGLQYRTSGLKVRVSTTIFFLNSTQDFLTSQLSEVVVEESKQFGNKIISYFERY 779
 :: * . : * : . * . * : * : . * . * : . . * : : * : : : . * : . * * : *

Hsap LQWIEFSISEKVASCKPVATALD~~TA~~VDVFLCSYIIDPLNLFWFGIGKATVFLLPALIFAV 813
 Ptro LQWIEFSISEKVASCKPVATALD~~TA~~VDVFLCSYIIDPLNLFWFGIGKATVFLLPALIFAV 813
 Mmul MQWIEFSISEKVASCKPVATALD~~TA~~VDVFLCSYIIDPLNLFWFGIGKATVFLLPALIFAV 813
 Rnor LQWVLYAITEKMTSCKPMITAMDSAVNGILCSYVADPLNLFWFGIGKATMLLLPAVIAI 805
 Mmus LHWVFYAITKMTSCKPMATAMDSAVNGILCGYVADPLNLFWFGIGKATVLLLPAVIAI 815
 Cfam LQWVKISITEQIAACKPVATALD~~SA~~VDVFLCSYIIDPMNLFWFGIGKATIFLLPAIIFAV 805
 Btau LQWVEMAITQQAACRPVATALD~~SA~~VNVFLCSYIVDPLNLFWFGV GKATILLPAVIFAV 839
 :: * : * : : : : * : * : * * : * * : * * : * * * * : * * * * : * * * : *

Hsap KLAKYYRRMSEDVYDDVETIPMKNMENGNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH 865
 Ptro KLAKYYRRMSEDVYDDVETIPMKNMENGNGYHKDHVYGIHNPVMTSPSQH 865
 Mmul KLAKYYRRMSEDVYDDVETIPMKNPSH----- 841
 Rnor KLAKYYRRMSEDVYDDVETVPMKNLENGSNGYHKDHLYGVHNPVMTSPSRY 857
 Mmus KLAKYYRRMSEDVYDDVETVPMKNLEIGSNGYHKDHLYGVHNPVMTSPSRY 867
 Cfam KLAKYYRRMSEDVYDE----- 822
 Btau KLAKYFRMYSEDVYEDEPVNKVQSKPRAQTVPRVQTVPMVQTVPMTKAL-- 889
 * * * * * : * * * * * * * * * * : :

FIG. 1C