

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 620 740**

51 Int. Cl.:

C07K 14/535 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2007 PCT/US2007/075704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2008 WO08022030**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2007 E 07840861 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2056859**

54 Título: **Epítomos de células T CD4 de PAP promiscuos**

30 Prioridad:

11.08.2006 US 837053 P
09.08.2007 US 836653

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WOLLAN, JAMI B. y
JONES, LORI A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 620 740 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 células T CD4 de PAP promiscuos

5 **Antecedentes de la invención**

10 Las células T CD4+ restringida a HLA de clase II desempeñan una función crítica en la inmunidad celular y son un componente clave de las respuestas inmunitarias antitumorales. Las células T CD4+ proporcionan la ayuda necesaria a los CTL específicos de tumor (Topalian 1994. *Curr Opin Immunol* 6:741-745) y producen citoquinas tales como interferón gamma (F γ), que puede activar las células presentadoras de antígeno y mediar otros efectos inmunológicos (Corthay *et al.*, 2005. *Immunity* 22:371-383). Los resultados experimentales en varios sistemas han demostrado que las células T CD4+ son necesarias para una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz. Dada la importancia de las células T CD4+ en la generación de una robusta respuesta inmunitaria, una inmunoterapia contra el cáncer diseñada de forma óptima o vacuna antitumoral debe inducir células T tanto CD4+ como CD8+ específicas de tumor para una eficacia máxima.

20 La fosfatasa ácida prostática (PAP) humana es una fosfatasa expresada predominantemente en la glándula prostática. A menudo se observa un nivel elevado en suero de PAP en pacientes con cáncer de próstata y otras afecciones de la próstata, con los mayores niveles de PAP encontrados en cáncer de próstata metastatizado. Además, las enfermedades del hueso, tales como enfermedad de Paget o hiperparatiroidismo, enfermedades de las células sanguíneas, tales como enfermedad falciforme, mieloma múltiple o enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como enfermedad de Gaucher, mostrarán niveles moderadamente aumentado de PAP. Como más del 95 % de las células de cáncer de próstata expresan PAP, se han ideado varias estrategias inmunoterapéuticas para el cáncer de próstata usando PAP como diana. Por ejemplo, *Cancer Biology and Therapy* (marzo de 2005, vol. 4, tema 3) ha presentado resultados prometedores de un estudio clínico en que se recogieron células inmunitarias del propio paciente, se estimularon para quedar inmunorreactivas a PAP, y se devolvieron al paciente por inyección intravenosa. Estos nuevos enfoques inmunológicos dependen de métodos que pueden inducir de forma eficaz una inmunidad específica de PAP, incluyendo inmunidad mediada por células T.

30 El documento WO2004/031211 describe péptidos que son capaces de unirse a una o más moléculas MHC para inducir una respuesta inmunitaria. El documento WO2004/026238 describe composiciones inmunoterapéuticas y métodos para el tratamiento de cánceres, que son composiciones que emplean células presentadoras de antígeno activadas por un conjugado de proteína, incluyendo una proteína de fusión PAP/GM-CSF. Southwood *et al.*, *Journal of Immunology*, vol. 160, n.º 7 (1998) describen las especificidades de unión de diversos alelos HLA-DR por péptidos derivados de PAP específicos. Matsueda *et al.*, *Clinical Cancer Research*, vol. 11, n.º 19 (2005) identificaron candidatos de vacuna peptídica derivada de antígeno relacionado con próstata para alelos HLA específicos. Machlenkin *et al.*, *Cancer Research*, vol. 65, n.º 14 (2005) identificaron un novedoso péptido inmunogénico derivado de PAP, que podría constituir un candidato de vacuna contra el cáncer de próstata.

40 La utilidad de un epítipo de célula T definido está limitada por su restricción a HLA. Los epítomos peptídicos normalmente formar complejos de péptido-MHC productivos con una pequeña cantidad de alelos HLA y estimulan las respuestas de células T solamente en individuos que expresan esos alelos. Esto confina los estudios inmunológicos y los ensayos clínicos a individuos de un tipo de HLA específico, a menudo el 20 % o menos de la población general. Los llamados epítomos de células T promiscuos, que pueden presentarse por una cantidad mayor de alelos HLA, se han descrito para varios antígenos tumorales. Los epítomos de células T promiscuos pueden unirse a múltiples alelos HLA para estimular células T específicas de antígeno, que permite la inducción y estudio de respuestas de células T en individuos de diferentes tipos de HLA. Adicionalmente, los epítomos promiscuos son valiosos porque las inmunoterapias y vacunas basadas en estos epítomos pueden ser ampliamente aplicables a la población general para el tratamiento y la prevención del cáncer. Por tanto, existe una clara necesidad de nueva información respecto a los epítomos promiscuos previamente desconocidos de antígenos tumorales, incluyendo PAP.

55 Los presentes inventores han identificado una serie de novedosos epítomos de células T promiscuos en la secuencia de la proteína PAP humana. Estos epítomos, que comprenden la región de 257-271 de la proteína PAP se reconocen por un clon de célula T CD4+ (PAPc66) en el contexto de HLA-DR y son capaces de inducir la activación de células T cuando se presentan por células presentadoras de antígeno de al menos 15 alelos HLA-DR β 1* diferentes. La promiscuidad de estos epítomos por diferentes alelos HLA-DR β 1* hace de estos epítomos una herramienta valiosa para evaluar las respuestas inmunitarias específicas de PAP independientemente del tipo de HLA del paciente. Adicionalmente, estos epítomos pueden usarse como un epítipo de célula T auxiliar CD4 universal en vacunas basadas en péptidos o inmunoterapias para el tratamiento de cánceres de próstata PAP+.

60 **Breve resumen de la invención**

65 La presente invención describe novedosos epítomos PAP que pueden presentarse por células presentadoras de antígeno de varios alelos HLA diferentes para inducir una respuesta de células T específica de PAP. En el primer aspecto, esta invención proporciona un péptido aislado que consiste en 15 a 18 aminoácidos y que comprende la

5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, donde el péptido activa las células T cuando se presenta por células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR1, células presentadoras de antígeno que expresan DR4, células presentadoras de antígeno que expresan DR7, células presentadoras de antígeno que expresan DR8, células presentadoras de antígeno que expresan DR11, células presentadoras de antígeno que expresan DR12, células presentadoras de antígeno que expresan DR13, células presentadoras de antígeno que expresan DR14 y células presentadoras de antígeno que expresan DR15. También se proporciona un producto de fusión que comprende el péptido derivado de PAP fusionado a un polipéptido heterólogo. En algunos casos, el polipéptido se fusiona al polipéptido heterólogo a través de un enlace peptídico. La invención se define adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas.

10 Preferiblemente, el péptido aislado derivado de la secuencia PAP o su producto de fusión es capaz de inducir una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína PAP cuando se presenta por una célula presentadora de antígeno de al menos 10 alelos HLA-DR diferentes y, más preferiblemente, al menos 11, 12, 13, 14, 15 o más alelos HLA-DR diferentes.

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

20 En algunas realizaciones, el péptido derivado de PAP tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

25 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido derivado de PAP descrito anteriormente o una proteína de fusión que une un péptido derivado de PAP y un polipéptido heterólogo por un enlace peptídico, un casete de expresión que comprende el ácido nucleico y una célula hospedadora que comprende el casete de expresión.

30 En algunos casos, la secuencia polinucleotídica codifica el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. También se describen casos donde la secuencia polinucleotídica codifica una proteína de fusión en que el polipéptido heterólogo es GM-CSF.

35 En algunas realizaciones, el casete de expresión es un vector vírico recombinante. En otros casos, el casete de expresión dirige la expresión del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o una proteína de fusión recombinante en que el polipéptido heterólogo es GM-CSF.

40 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido derivado de PAP como se describe anteriormente o un producto de fusión del péptido fusionado con un polipéptido heterólogo, además de un excipiente fisiológicamente aceptable.

45 En algunas realizaciones, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En otras realizaciones más, la composición comprende adicionalmente una célula presentadora de antígeno, que tiene el péptido derivado de PAP que forma un complejo con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de la célula.

50 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el péptido de la invención como se define anteriormente y un excipiente fisiológicamente aceptable para su uso en un método de inducción en un paciente de una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína PAP humana.

55 En algunas realizaciones, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).

60 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para detectar en un paciente una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína fosfatasa ácida prostática (PAP) humana usando una muestra del paciente que comprende una célula presentadora de antígeno y una célula T, comprendiendo el método las etapas de (a) poner en contacto la célula presentadora de antígeno y la célula T con el péptido de la invención como se define anteriormente; y (b) detectar la respuesta de células T, donde la detección de una respuesta de células T indica la presencia de una respuesta inmunitaria de células T específica para la proteína PAP en el paciente.

65 En algunas realizaciones, la etapa (b) se realiza por ELISPOT, ensayo de proliferación o citometría de flujo. En otras realizaciones, el péptido derivado de PAP tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El clon de células T PAPc66 reconoce un epítipo procesado de forma natural de PAP. (A) Las

proteínas de fusión de PAP PA2024, CHOPA2024 y hPAPGM y PAP de un sistema de expresión baculovírico (iPAP) y un sistema de expresión de mamífero (CHOPAP) se valoraron con EBV-LcL autólogo y PAPc66. El ensayo se configuró en placas de fondo redondo de 96 pocillos con 1×10^5 células/pocillo de PAPc66, 2×10^5 células/pocillo de EBV-LcL y antígenos a 50 $\mu\text{g/ml}$ (barras negras), 25 $\mu\text{g/ml}$ (barras de bandas) y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ (barras de puntos) en medio RPMI completo con FBS al 10 %. El ensayo se incubó durante 48 horas a 37 °C con CO_2 al 5 %, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron para IFN γ por ELISA. (B) Para ubicar el péptido PAP específico, se usaron péptidos sintetizados químicamente de la secuencia de PAP. Estos 94 péptidos son de 15 aminoácidos de longitud que solapan en 11 aminoácidos y se ensayaron individualmente para la capacidad de estimular PAPc66 usando EBV-LcL autólogo y cada péptido a 2 $\mu\text{g/ml}$ en el ensayo. El ensayo se configuró como en (A) y los sobrenadantes se ensayaron para IFN γ por ELISA. (C) El péptido n.º 65, PAP₂₅₇₋₂₇₁, se valoró con EBV-LcL autólogo y PAPc66 en un ensayo configurado como en (A). Los sobrenadantes se analizaron para la producción de IFN γ específica de péptido por ELISA.

Figura 2. PAPc66₁ está restringido a MHC de clase II. PAPc66 se estimuló con EBV-LcL autólogo a 2×10^5 células/ml y PAP₂₅₇₋₂₇₁ a 2 $\mu\text{g/ml}$ en presencia de anticuerpos de bloqueo de MHC de clase II. El ensayo se configuró en placas de fondo redondo de 96 pocillos en medio RPMI completo + FBS al 10 % con anti-HLA-DR \blacklozenge (Dendreon) y anti-HLA-DP \blacksquare o anti HLA-DQ \blacktriangle (Leinco Technologies, Inc., St. Louis, MI) a las concentraciones mostradas. El anticuerpo anti-HLA-A2 (o) se usó como control negativo. Se añadió PAPc66 a todos los pocillos a 1×10^5 células/pocillo y el ensayo se incubó durante 48 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %. Después de la incubación, los sobrenadantes se recogieron y ensayaron para IFN γ por ELISA. No se detectó IFN γ para las condiciones sin péptido. Estos resultados indican que PAP₂₅₇₋₂₇₁ se presenta tanto en el contexto de HLA-DR como HLA-DQ.

Figura 3. PAP₂₅₇₋₂₇₁ es un epítipo de PAP de MHC de clase II promiscuo reconocido por el clon de células T PAPc66. (A) El péptido PAP₂₅₇₋₂₇₁ (RLQGGVLVNEILNHM), reconocido por un clon de células T CD4+ (PAPc66) en el contexto de MHC de clase II, es capaz de inducir la activación de células T cuando se presenta por líneas celulares linfoblastoides que representan 9 familias serológicas diferentes de HLA-DR (cadena β ; DR1, DR4, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15) que tienen más de 15 alelos HLA-DR β 1 distintos. Como se muestra en la Figura 2, el péptido puede presentarse en el contexto de HLA-DR o HLA-DQ. El ensayo se configuró en placas de fondo redondo de 96 pocillos con PAPc66 a 1×10^5 células/pocillo, PAP₂₅₇₋₂₇₁ a 2 $\mu\text{g/ml}$ y 2×10^5 EBV-LcL por pocillo en RPMI completo + FBS al 10 %. Cada línea HLA-DREBV-LcL, homocigótica para el alelo HLA-DR β 1 mostrado, se ensayó para la capacidad de presentar PAP₂₅₇₋₂₇₁ a PAPc66. También se incluyó un péptido PAP irrelevante y un control sin péptido. Después de incubación durante 48 horas a 37 °C y CO_2 al 5 %, se ensayaron los sobrenadantes para IFN γ y granzima B (B) por ELISA. Los resultados se muestran con el fondo (sin péptido) para cada línea EBV-LcL y PAPc66 sustraído.

DEFINICIONES

El término "**aislado**", cuando se aplica a un ácido nucleico o proteína, indica que el ácido nucleico o proteína está esencialmente libre de otros componentes celulares con el que está asociado en su estado natural. Está preferiblemente en un estado homogéneo, aunque puede estar en una forma seca o en solución acuosa. La pureza y homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un gen aislado se separa de las fases de lectura abierta que flanquean el gen y codifica una proteína diferente del gen de interés. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Particularmente, significa que el ácido nucleico o proteína es al menos un 85 % puro, más preferiblemente al menos un 95 % puro y mucho más preferiblemente al menos un 99 % puro.

En esta solicitud, el término "**aminoácido**" se refiere a aminoácidos de origen natural, y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamina y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido de origen animal, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero son capaces de funcionar de un modo similar a un aminoácido de origen natural.

La expresión "**ácido nucleico**" o "**polinucleótido**" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria. Salvo que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al aminoácido de referencia y se metabolizan de un modo similar a los nucleótidos de origen natural. Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias

complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en que la tercera posición de uno o más (o todos) los codones seleccionados está sustituida con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc o ARNm codificado por un gen.

Cuando se mencionan las localizaciones relativas de elementos en una secuencia polinucleotídica, una localización "en dirección 3'" es una en el lado 3' de un punto de referencia, y una localización "en dirección 5'" es una en el lado 5' de un punto de referencia.

Los términos "**polipéptido**", "**péptido**" y "**proteína**" se usan de forma intercambiable en este documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácido. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Como se usa en este documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa (es decir, antígenos), donde los restos de aminoácido están unidos por enlaces peptídicos covalentes. En esta solicitud, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido se presenta del extremo N-terminal al extremo C-terminal. En otras palabras, cuando se describe una secuencia de aminoácidos de un péptido, el primer aminoácido del extremo N-terminal se menciona como el "primer aminoácido".

Cuando se usa en el contexto de descripción de compañeros de un péptido de fusión el término "**heterólogo**" se refiere a la relación de un compañero de fusión del péptido con el otro compañero de fusión del péptido: la manera en que los compañeros de fusión están presentes en el péptido de fusión no es uno que pueda encontrarse en una proteína de origen natural. Por ejemplo, un "polipéptido heterólogo" fusionado con un epítipo de fosfatasa ácida prostática (PAP) promiscuo para formar un péptido de fusión puede ser uno que se origina de una proteína diferente de la proteína PAP, tal como un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Por otro lado, un "polipéptido heterólogo" puede ser uno derivado de otra parte de la proteína PAP que no está inmediatamente contigua al epítipo promiscuo. Un "polipéptido heterólogo" puede contener modificaciones de una secuencia proteica de origen natural o una parte de la misma, tales como deleciones, adiciones o sustituciones de uno o más restos de aminoácido. Independientemente del origen del "polipéptido heterólogo" (es decir, si se obtiene de la proteína PAP u otra proteína), el péptido de fusión no debe contener una subsecuencia de la proteína PAP que abarque la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y debe tener más de 18 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones a modo de ejemplo, un "polipéptido heterólogo" para su uso en la presente invención tiene no más de 15-20 aminoácidos de longitud; en otras realizaciones, un "polipéptido heterólogo" tiene al menos 100 aminoácidos de longitud.

La palabra "**fusionar**" o "**fusionado**", como se usa en el contexto de descripción de un péptido de esta invención que comprende un epítipo de PAP promiscuo unido con un polipéptido heterólogo, se refiere a una conexión entre el epítipo y el polipéptido heterólogo por cualquier enlace covalente, incluyendo un enlace peptídico.

La expresión "**una secuencia de ácido nucleico codificante**" se refiere a un ácido nucleico que contiene información de secuencia para un ARN estructural tal como ARNr, un ARNt o la secuencia de aminoácidos primaria de una proteína o péptido específico, o un sitio de unión para un agente regulador de acción en trans. Esta expresión abarca específicamente codones degenerados (es decir, codones diferentes que codifican un único aminoácido) de la secuencia o secuencias nativas que pueden introducirse para adaptarse a la preferencia de codones en una célula hospedadora específica.

Un "**casete de expresión**" es una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos específicos de ácido nucleico que permiten la transcripción de una secuencia polinucleotídica particular en una célula hospedadora. Un casete de expresión puede ser parte de un plásmido, genoma vírico o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, un casete de expresión incluye un polinucleótido a transcribirse, unido de forma funcional a un promotor.

El término "**recombinante**", cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína de una fuente externa o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se obtiene de una célula así modificada. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que por el contrario se expresan de forma anormal, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

El término "**administración**" o "**administrar**", se refiere a diversos métodos de poner en contacto una sustancia con un mamífero, especialmente un ser humano. Los modos de administración pueden incluir, aunque sin limitación, métodos que implican poner en contacto la sustancia por vía intravenosa, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, tópica, subcutánea, parenteral, intramuscular, oral o sistémica, y a través de inyección, ingesta, inhalación, implante o adsorción por cualquier otro medio. Un medio de administración del péptido PAP promiscuo a modo de ejemplo de esta invención o de un péptido de fusión que comprende el péptido PAP y un polipéptido heterólogo es a través de

suministro intravenoso, donde el péptido o péptido de fusión pueden formularse como una composición farmacéutica en forma adecuada para inyección intravenosa, tal como una solución acuosa, una suspensión o una emulsión, etc. Otros medios para suministrar el péptido PAP promiscuo o un péptido de fusión de esta invención, incluye inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intramuscular o aplicación transdérmica como con un parche.

Una "**cantidad eficaz**" de una cierta sustancia se refiere a una cantidad de la sustancia que es suficiente para lograr un resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una composición que comprende un péptido de esta invención que se pretende para inducir inmunidad anti-PAP es una cantidad eficaz para conseguir el objetivo de inducir la inmunidad cuando se administra a un sujeto. El efecto a conseguir puede incluir la prevención, corrección o inhibición de la progresión de los síntomas de una enfermedad/afección y las complicaciones relacionadas en cualquier grado detectable. La cantidad exacta de una "cantidad eficaz" dependerá del propósito de la administración, y puede averiguarse por un experto en la materia usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vol. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

Un "**excipiente fisiológicamente aceptable**" es un ingrediente inerte usado en la formulación de una composición de esta invención, que contiene el ingredientes o ingredientes activos de un péptido PAP promiscuo o un péptido de fusión que comprende el péptido PAP y un polipéptido heterólogo y es adecuado para su uso, por ejemplo, por inyección en un paciente que lo necesita. Este ingrediente inerte puede ser una sustancia que, cuando se incluye en una composición de esta invención, proporciona un pH, consistencia, color, olor o aroma deseado de la composición.

Como se usa en este documento, la expresión "**respuesta inmunitaria de células T**" se refiere a la activación de células T específicas de antígeno medida por proliferación o expresión de moléculas sobre la superficie celular o secreción de proteínas tales como citoquinas.

Descripción detallada de la invención

I. INTRODUCCIÓN

Los presentes inventores han identificado novedosos epítomos de células T promiscuos de una proteína fosfatasa ácida prostática (PAP) humana. Estos epítomos peptídicos muestran notable promiscuidad de HLA ya que pueden presentarse en el contexto de al menos 9 diferentes familias serológicas de HLA-DR y al menos 15 alelos diferentes HLA-DR β 1. La presentación de estos epítomos por dicho amplio intervalo de alelos HLA-DR β 1 hace que los epítomos sean extremadamente valiosos como epítomos de células T CD4 auxiliares universales en la preparación de vacunas o inmunoterapias para el tratamiento de cáncer de próstata que sobreexpresa la proteína PAP en la población humana general.

II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS

Los péptidos de la presente invención, particularmente aquellos de longitud relativamente corta, (por ejemplo, no más de 50-100 aminoácidos), pueden sintetizarse químicamente usando síntesis convencional de péptidos u otros protocolos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos pueden sintetizarse por métodos de síntesis de péptidos en fase sólida usando procedimientos similares a los descritos por Merrifield *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963); Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology* Gross and Meienhofer (eds.), Academic Press, N.Y., vol. 2, pág. 3-284 (1980); y Stewart *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* 2.^a ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984). Durante la síntesis, se añaden por etapas aminoácidos N- α protegidos que tienen cadenas laterales protegidas a una cadena polipeptídica en crecimiento unida por su extremo C-terminal y a un soporte sólido, es decir, perlas de poliestireno. Los péptidos se sintetizan uniendo un grupo amino de un aminoácido N- α desprotegido a un grupo α -carboxi de un aminoácido N- α protegido que se ha activado haciendo que reaccione con un reactivo tal como dicitclohexilcarbodiimida. La unión de un grupo amino libre al carboxilo activado conduce a formación de enlaces peptídicos. Los grupos N- α protectores más habitualmente usados incluyen Boc, que es inestable en ácido, y Fmoc, que es inestable en base.

Los materiales adecuados para su uso como soporte sólido son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: resinas de halometilo, tales como resina de clorometilo o resina de bromometilo; resinas de hidroximetilo; resinas de fenol, tales como resinas de 4-(α -[2,4-dimetoxifenil]-Fmoc-aminometil)fenoxi; resinas de terc-alkuilocarbonil-hidrazida, y similares. Dichas resinas están disponibles en el mercado y sus métodos de preparación son conocidos por los expertos en la materia.

En resumen, el aminoácido C-terminal N- α protegido se une primero al soporte sólido. El grupo N- α protector entonces se retira. El grupo α -amino desprotegido se acopla al grupo α -carboxilato activado del siguiente aminoácido N- α protegido. El proceso se repite hasta que se sintetiza el péptido deseado. Los péptidos resultantes después se escinden del soporte polimérico insoluble y se desprotegen las cadenas laterales de aminoácido. Pueden obtenerse

péptidos más largos por condensación de fragmentos peptídicos protegidos. Los detalles de las químicas apropiadas, las resinas, los grupos protectores, los aminoácidos protegidos y los reactivos son bien conocidos en la técnica y también se analizan en detalle en este documento (véase, por ejemplo, Atherton *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1989), y Bodanszky, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, 2.^a Ed., Springer-Verlag (1993)).

III. PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE PÉPTIDOS

A. Tecnología recombinante general

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

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

Los oligonucleótidos que no están disponibles en el mercado pueden sintetizarse químicamente, por ejemplo, de acuerdo con el método de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 (1981), usando un sintetizador automatizado, como se describe en Van Devanter *et al.*, Nucleic Acids Res. 12:6159-6168 (1984). La purificación de los oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel de acrilamida en estado nativo o HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Reanier, J. Chrom. 255:137-149 (1983).

La producción recombinante es un medio eficaz para obtener péptidos de esta invención, particularmente aquellos de peso molecular relativamente grande, por ejemplo, un péptido de fusión de un epítipo de PAP promiscuo y un GM-CSF. La secuencia de un polinucleótido que codifica un péptido de esta invención, y los oligonucleótidos sintéticos puede verificarse después de la clonación o subclonación usando, por ejemplo, el método de terminación de cadena para secuenciar moldes bicatenarios de Wallace *et al.*, Gene 16: 21-26 (1981).

B. Construcción de un casete de expresión

Obtención de una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido de la invención

Una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido de esta invención puede obtenerse por síntesis química, o puede adquirirse de un proveedor comercial, que después puede manipularse adicionalmente usando técnicas convencionales de clonación molecular.

Modificación de ácidos nucleicos para el uso preferido de codones en un organismo hospedador

La secuencia polinucleotídica que codifica un péptido de esta invención puede alterarse opcionalmente para que coincida con el uso preferido de codones de un hospedador particular. Por ejemplo, el uso preferido de codones de una cepa de células bacterianas puede usarse para obtener un polinucleótido que codifique un péptido de la invención e incluya los codones favorecidos por esta cepa. La frecuencia de uso preferido de codones mostrada por una célula hospedadora puede calcularse promediando la frecuencia del uso preferido de codones en una gran cantidad de genes expresados por la célula hospedadora (por ejemplo, el servicio de cálculo está disponible en el sitio web del Kazusa DNA Research Institute, Japón). Este análisis se limita preferiblemente a genes que se expresan mucho por la célula hospedadora.

Al completarse la modificación, las secuencias codificantes se verifican por secuenciación y después se subclonan en un vector de expresión apropiado para la producción recombinante de los péptidos de esta invención.

Después de la verificación de la secuencia codificante, el péptido de la presente invención puede producirse usando técnicas rutinarias en el campo de genética recombinante.

C. Sistemas de expresión

Para obtener una expresión de alto nivel de un ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención, normalmente se subclona un polinucleótido que codifica el péptido en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción y un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell, *supra*, y Ausubel *et al.*, *supra*. Los sistemas de expresión bacteriana para expresar un péptido de esta invención están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.*,

Salmonella, y *Caulobacter*. Están disponibles en el mercado kits para dichos sistemas de expresión. Los sistemas de expresión eucariotas para células de mamífero, levaduras y células de insecto son bien conocidos en la técnica y también están disponibles en el mercado. En una realización, el vector de expresión eucariota es un vector adenovírico, un vector adenoasociado o un vector retrovírico.

El promotor usado para dirigir la expresión de un ácido nucleico heterólogo depende de la aplicación particular. El promotor opcionalmente se posiciona a aproximadamente la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heterólogo que del sitio de inicio la transcripción en su entorno natural. Como se sabe en la técnica, sin embargo, puede acomodarse alguna variación en esta distancia sin pérdida de la función promotora.

Además del promotor, el vector de expresión normalmente incluye una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión de un péptido de esta invención en células hospedadoras. Un casete de expresión típico, por tanto, contiene un promotor unido de forma funcional a la secuencia polinucleotídica que codifica el péptido y señales requeridas para la poliadenilación eficaz del transcrito, sitios de unión al ribosoma y terminación de la traducción. La secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido normalmente se une a una secuencia de péptido señal escindible para promover la secreción del péptido por la célula transformada. Dichos péptidos señal incluyen, entre otros, los péptidos señal del activador de plasminógeno tisular, insulina y factor de crecimiento de neuronas, y la esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*. Los elementos adicionales del casete pueden incluir potenciadores y, si se usa ADN genómico como gen estructural (por ejemplo, que codifica el polipéptido heterólogo), intrones con sitios donantes y aceptores funcionales de corte y empalme.

Además de una secuencia promotora, el casete de expresión también debe contener una región de terminación de la transcripción en dirección 3' del gen estructural para proporcionar una terminación eficaz. La región de terminación puede obtenerse del mismo gen que la secuencia promotora o puede obtenerse de diferentes genes.

El vector de expresión particular usado para transportar la información genética a la célula no es particularmente crítico. Puede usarse cualquiera de los vectores convencionales usados para la expresión en células eucariotas o procariotas. Los vectores de expresión bacterianos convencionales incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23D, y sistemas de expresión de fusión tales como GST y LacZ. También pueden añadirse marcas epitópicas a proteínas recombinantes para proporcionar métodos convenientes de aislamiento, por ejemplo, c-myc.

Normalmente se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas en vectores de expresión eucariotas, por ejemplo, vectores de SV40, vectores de papilomavirus y vectores derivados del virus de Epstein-Barr. Otros vectores eucariotas a modo de ejemplo incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas en la dirección del promotor temprano de SV40, el promotor tardío de SV40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus del tumor mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la polihedrina u otros promotores que han demostrado ser eficaces para la expresión en células eucariotas.

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

Los elementos que se incluyen normalmente en los vectores de expresión también incluyen un replicón que funciona en *E. coli*, un gen que codifica resistencia a antibióticos para permitir la selección de las bacterias que albergan plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias eucariotas. El gen de resistencia a antibióticos particular elegido no es crítico, son adecuados cualquiera de los muchos genes de resistencia conocidos en la técnica. Las secuencias procariotas se eligen opcionalmente de modo que no interfieran con la replicación del ADN en células eucariotas, si fuera necesario. Similar a los marcadores de selección de resistencia a antibióticos, también pueden usarse marcadores de selección metabólica basados en rutas metabólicas conocidas como un medio para seleccionar células hospedadoras transformadas.

Cuando se desea expresión de una proteína recombinante (por ejemplo, un péptido de la presente invención) en el periplasma, el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia que codifica una señal de secreción, tal como la señal de secreción de OppA de *E. coli* (proteína de unión a oligopéptido periplasmático) o una versión modificada de la misma, que está directamente conectada al 5' de la secuencia codificante de la proteína a expresar. Esta secuencia señal dirige la proteína recombinante producida en el citoplasma a través de la membrana celular al espacio periplasmático. El vector de expresión puede comprender adicionalmente una secuencia codificante para la peptidasa señal 1, que escapa de escindir enzimáticamente la secuencia señal cuando la proteína recombinante entra en el espacio periplasmático. Puede encontrarse una descripción más detallada para la producción periplasmática de una proteína recombinante en, por ejemplo, Gray *et al.*, Gene 39: 247-254 (1985), patentes de

Estados Unidos n.º 6.160.089 y 6.436.674.

C. Métodos de transfección

5 Se usan métodos convencionales de transfección para producir líneas celulares bacterianas, de mamífero, de levadura, de insecto o de plantas que expresan grandes cantidades de un péptido de esta invención, que después se purifican usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Colley *et al.*, J. Biol. Chem. 264:17619-17622 (1989); Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariotas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Morrison, J. Bact. 132:349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, Methods in Enzymology 101:347-362 (Wu *et al.*, eds, 1983).

15 Puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias nucleotídicas foráneas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato cálcico, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmídicos, vectores víricos y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético foráneo en una célula hospedadora (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, *supra*). Solamente es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular usado sea capaz de introducir de forma satisfactoria al menos un gen en la célula hospedadora capaz de expresar el péptido de esta invención.

20 D. Detección de la expresión recombinante de un péptido en células hospedadoras

Después de introducir el vector de expresión en células hospedadoras apropiadas, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del péptido de esta invención. Las células después se criban para la expresión del péptido recombinante, que posteriormente se recupera del cultivo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (1982); patente de Estados Unidos n.º 4.673.641; Ausubel *et al.*, *supra*; y Sambrook y Russell, *supra*).

30 Varios métodos generales para el cribado de la expresión génica son bien conocidos entre los expertos en la materia. En primer lugar, puede detectarse la expresión génica a nivel de ácido nucleico. Se usa habitualmente diversos métodos de medición de ADN y ARN específico usando técnicas de hibridación de ácido nucleico (por ejemplo, Sambrook y Russell, *supra*). Algunos métodos implican una separación electroforética (por ejemplo, transferencia de Southern para detectar ADN y transferencia de Northern para detectar ARN), pero la detección del ADN o ARN puede realizarse también sin electroforesis (tal como por transferencia puntual). La presencia de ácido nucleico que codifica un péptido de esta invención en células transfectadas también puede detectarse por PCR o RT-PCR usando cebadores específicos de secuencia.

40 En segundo lugar, la expresión génica puede detectarse a nivel de polipéptido. Los expertos en la materia usan de forma rutinaria diversos ensayos inmunológicos para medir el nivel de un producto génico, particularmente usando anticuerpos policlonales o monoclonales que reaccionan específicamente con un péptido de la presente invención, particularmente uno que contiene un polipéptido heterólogo suficientemente grande (por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, capítulo 14, Cold Spring Harbor, 1988; Kohler y Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975)). Dichas técnicas requieren preparación de anticuerpos seleccionando anticuerpos con alta especificidad frente al péptido o una parte antigénica del mismo. Los métodos de creación de anticuerpos policlonales y monoclonales están bien establecidos y sus descripciones pueden encontrarse en la bibliografía, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*; Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6: 511-519(1976).

IV. Purificación de péptidos

50 A. Purificación de péptidos sintetizados químicamente

La purificación de péptidos sintéticos se consigue usando diversos métodos de cromatografía, tales como HPLC en fase inversa, exclusión molecular, intercambio iónico, exclusión de tamaño, afinidad, reparto o distribución contracorriente. Las elecciones de matrices apropiadas y tampones son bien conocidas en la técnica.

55 B. Purificación de péptidos producidos de forma recombinante

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

60 Cuando un péptido de la presente invención se produce de forma recombinante por bacterias transformadas en grandes cantidades, normalmente después de la inducción del promotor, aunque la expresión pueda ser constitutiva, los péptidos pueden formar agregados insolubles. Hay varios protocolos que son adecuados para la purificación de cuerpos de inclusión de proteínas. Por ejemplo, la purificación de proteínas de agregados (a partir de ahora en este documento, mencionadas como cuerpos de inclusión) normalmente implica la extracción, separación y/o purificación de los cuerpos de inclusión por alteración de las células bacterianas, por ejemplo, por incubación en un tampón de aproximadamente 100-150 µg/ml de lisozima y Nonidet P40 al 0,1 %, un detergente no iónico. La suspensión celular

puede molerse usando un triturador Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY). Como alternativa, las células pueden sonicarse en hielo. Se describen métodos alternativos de lisis de las bacterias en Ausubel *et al.*, y Sambrook y Russell, ambos *supra*, y serán evidentes para los expertos en la materia.

- 5 La suspensión celular generalmente se centrifuga y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se resuspenden en tampón que no disuelve, pero lava, los cuerpos de inclusión, por ejemplo, Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, NaCl 150 mM y Triton-X 100 al 2 %, un detergente no iónico. Puede ser necesario repetir la etapa de lavado para retirar la máxima cantidad posible de desechos celulares. El sedimento restante de los cuerpos de inclusión puede resuspenderse en un tampón apropiado (por ejemplo, fosfato sódico 20 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM).
10 Otros tampones apropiados serán evidentes para los expertos en la materia.

Después de la etapa de lavado, los cuerpos de inclusión se solubilizan por la adición de un disolvente que es tanto un fuerte aceptor de hidrógeno como un fuerte donante de hidrógeno (o una combinación de disolventes que tiene, cada uno, una de estas propiedades). Las proteínas que forman los cuerpos de inclusión pueden entonces renaturalizarse por dilución o diálisis con un tampón compatible. Los disolventes adecuados incluyen, aunque sin limitación, urea (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M), formamida (al menos aproximadamente el 80 %
15 en una base de volumen/volumen) y clorhidrato de guanidina (de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M). Algunos disolventes que son capaces de solubilizar las proteínas que forman agregados, tales como SDS (dodecil sulfato sódico) y ácido fórmico al 70 %, pueden ser inapropiados para su uso en este procedimiento debido a la posibilidad de desnaturalización irreversible de las proteínas, acompañada por una ausencia de inmunogenicidad y/o actividad. Aunque el clorhidrato de guanidina y agentes similares son desnaturalizantes, esta desnaturalización no es irreversible y puede producirse renaturalización tras la eliminación (por diálisis, por ejemplo) o dilución del desnaturalizante, que permite la reformación de la proteína inmunológica y/o biológicamente activa de interés. Después de la solubilización, la proteína puede separarse de otras proteínas bacterianas por técnicas convencionales de separación. Para una descripción adicional de la purificación de los polipéptidos recombinantes de cuerpos de inclusión bacterianos, véase, por ejemplo, Patra *et al.*, Protein Expression and Purification 18:182-190 (2000).
20
25

Como alternativa, es posible purificar polipéptidos recombinantes, por ejemplo, un péptido de esta invención del periplasma bacteriano. Cuando el polipéptido recombinante se exporta al periplasma de las bacterias, la fracción periplasmática de las bacterias puede aislarse por choque osmótico en frío además de otros métodos conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *supra*). Para aislar péptidos recombinantes del periplasma, las células bacterianas se centrifugan para formar un sedimento. El sedimento se resuspende en un tampón que contiene sacarosa al 20 %. Para lisar las células, las bacterias se centrifugan y el sedimento se resuspende en MgSO₄ 5 mM enfriado en hielo y se mantienen en un baño de hielo durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular se centrifuga y el sobrenadante se decanta y se guarda. Los péptidos recombinantes presentes en el sobrenadante pueden separarse de las proteínas hospedadoras por técnicas convencionales de separación bien conocidas para los expertos en la materia.
30
35

40 2. Técnicas convencionales de separación de proteínas para la purificación

Cuando un polipéptido recombinante, por ejemplo, un péptido de la presente invención, se expresa en células hospedadoras en una forma soluble, su purificación puede seguir el procedimiento convencional de purificación de proteínas descrito a continuación. Este procedimiento convencional de purificación también es adecuado para purificar péptidos obtenidos de síntesis química.
45

i. Fraccionamiento por solubilidad

A menudo, como etapa inicial, y si la mezcla de proteínas es compleja, un fraccionamiento inicial con sal puede separar mucha de las proteínas indeseadas de la célula hospedadora (o proteínas derivadas del medio de cultivo celular) de la proteína recombinante de interés, por ejemplo, un péptido de la presente invención. La sal preferida es sulfato de amonio. El sulfato de amonio precipita proteínas reduciendo de forma eficaz la cantidad de agua en la mezcla de proteínas. Las proteínas entonces precipitan basándose en su solubilidad. Cuando más hidrófoba sea una proteína, más probablemente precipitará a concentraciones inferiores de sulfato de amonio. Un protocolo típico es añadir sulfato de amonio saturado a una solución de proteínas de modo que la concentración resultante de sulfato de amonio sea entre el 20-30 %. Esto precipitará la mayoría de las proteínas hidrófobas. El precipitado se descarta (salvo que la proteína de interés sea hidrófoba) y se añade sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración que se sabe que precipita la proteína de interés. El precipitado después se solubiliza en tampón y se retira el exceso de sal si fuera necesario, a través de diálisis o diafiltración. Otros métodos que dependen de la solubilidad de las proteínas, tal como precipitación con etanol frío, son bien conocidos para los expertos en la materia y pueden usarse para fraccionar mezclas complejas de proteínas.
50
55
60

ii. Filtración diferencial por tamaño

Basándose en el peso molecular calculado, puede aislarse una proteína de mayor y menor tamaño usando ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poro (por ejemplo, membranas Amicon o Millipore).
65

Como primera etapa, la mezcla de proteínas se ultrafiltra a través de una membrana con un tamaño de poro que tiene un punto de corte de peso molecular más bajo que el peso molecular de una proteína de interés, por ejemplo, un péptido de la presente invención. El retenido de la ultrafiltración después se ultrafiltra frente a una membrana con un punto de corte molecular mayor que el peso molecular del péptido de interés. La proteína recombinante pasará a través de la membrana al filtrado. El filtrado entonces puede someterse a cromatografía como se describe a continuación.

iii. Cromatografía en columna

Una proteína de interés (tal como un péptido de la presente invención) también puede separarse de otras proteínas basándose en su tamaño, su carga superficial neta, su hidrofobicidad o su afinidad por ligandos. Además, pueden conjugarse anticuerpos creados contra un péptido de esta invención a las matrices de columna e inmunopurificarse el péptido. Todos estos métodos son bien conocidos en la técnica.

Será evidente para los expertos en la materia que pueden realizarse técnicas cromatográficas a cualquier escala y usando equipos de muchos fabricantes diferentes (por ejemplo, Pharmacia Biotech).

C. Confirmación de la secuencia peptídica

La secuencia de aminoácidos de un péptido de esta invención puede confirmarse por varios métodos bien establecidos. Por ejemplo, el método convencional de degradación de Edman puede usarse para determinar la secuencia de aminoácidos de un péptido. Varias variaciones de los métodos de secuenciación basados en la degradación de Edman, incluyendo microsecuenciación, y métodos basados en espectrometría de masas, también se usan frecuentemente para este propósito.

D. Modificación de los péptidos

Los péptidos de la presente invención pueden modificarse para conseguir propiedades más deseables. El diseño de péptidos modificados químicamente y peptidomiméticos que son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas o tienen solubilidad o capacidad de unión mejorada es bien conocido.

Los aminoácidos modificados o derivados químicos de un péptido PAP promiscuo o péptidos de fusión de esta invención pueden contener restos químicos adicionales de aminoácidos modificados que no forman parte normalmente de la proteína PAP. También se describen en este documento modificaciones covalentes de los péptidos. Dichas modificaciones pueden introducirse en un péptido haciendo reaccionar los restos de aminoácido diana del péptido con un agente orgánico de derivatización que escapa de reaccionar con cadenas laterales o restos terminales seleccionados. Los siguientes ejemplos de derivados químicos se proporcionan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

El diseño de peptidomiméticos que son resistentes a la degradación por enzimas proteolíticas es conocido para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sawyer, Structure-Based Drug Design, P. Verapandia, Ed., N.Y. (1997); patentes de Estados Unidos n.º 5.552.534 y 5.550.251. Las modificaciones tanto en la estructura peptídica como en las cadenas laterales pueden usarse en el diseño de mimetismo de la estructura secundaria. Las modificaciones posibles incluyen sustitución de D-aminoácidos, N^α-Me-aminoácidos, C_α-Me-aminoácidos y deshidroaminoácidos. Hasta la fecha, se ha diseñado diversos miméticos de estructura secundaria y se han incorporado en péptidos o peptidomiméticos.

Otras modificaciones incluyen sustitución de un aminoácido natural con un aminoácido hidroxilado no natural, sustitución de los grupos carboxi en aminoácidos ácidos con derivados de nitrilo, sustitución de los grupos hidroxilo en aminoácidos básicos con grupos alquilo o sustitución de metionina con sulfóxido de metionina. Además, un aminoácido de un péptido PAP promiscuo o péptido de fusión de esta invención puede remplazarse por el mismo aminoácido, pero de quiralidad opuesta, es decir, un L-aminoácido de origen natural puede remplazarse por su configuración D.

V. FUSIÓN DE UN EPÍTOPO DE PAP CON UN POLIPÉPTIDO HETERÓLOGO

En un aspecto de esta invención, se une un péptido correspondiente a un epítipo de PAP promiscuo a un polipéptido heterólogo a través de un enlace covalente para formar un péptido de fusión, de modo que se potencie la capacidad del epítipo de PAP de inducir una respuesta de células T. Frecuentemente, este enlace covalente es un enlace peptídico y el epítipo de PAP y el polipéptido heterólogo forman un nuevo polipéptido. Este enlace peptídico puede ser un enlace peptídico directo entre el epítipo de PAP y el polipéptido heterólogo, o puede ser un enlace peptídico indirecto proporcionado mediante un enlazador peptídico entre el epítipo de PAP y el polipéptido heterólogo.

También son adecuados otros enlaces covalentes con el fin de fusionar el péptido PAP con el polipéptido heterólogo. Por ejemplo, un grupo funcional (tal como un grupo amina no terminal, un grupo ácido carboxílico no

terminal, un grupo hidroxilo y un grupo sulfhidrilo) de un péptido puede reaccionar fácilmente con un grupo funcional del otro péptido y establecer un enlace covalente, diferente a un enlace peptídico, que conjuga los dos péptidos. Una conexión covalente entre un péptido y un epítipo de PAP promiscuo y un polipéptido heterólogo también puede proporcionarse mediante una molécula enlazadora con uno o más grupos funcionales adecuados. Dicha molécula enlazadora puede ser un enlazador peptídico o un enlazador no peptídico. Un enlazador puede derivatizarse para exponer o para unir grupos funcionales reactivos adicionales antes de la conjugación. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois.

VI. ENSAYOS FUNCIONALES

Un epítipo de PAP promiscuo de esta invención (o un péptido de fusión que comprende el péptido PAP y un polipéptido heterólogo) es útil por su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína PAP, cuando el epítipo se presenta por una célula presentadora de antígeno que puede tener uno de al menos 10 alelos HLA-DR diferentes, más preferiblemente al menos 12, 13, 14 o 15 alelos HLA-DR diferentes. Pueden usarse diversos ensayos funcionales para confirmar la capacidad de un epítipo de PAP promiscuo de inducir dicha respuesta inmunitaria de células T específica de PAP de un modo promiscuo con respecto a las células presentadoras de antígeno de diferentes alelos HLA-DR, incluyendo ensayo de proliferación y ensayos de citometría de flujo que detectan la unión entre un receptor de células T y un epítipo peptídico o la producción de citoquinas por células T.

El sistema de ensayo funcional usado en los ejemplos de esta solicitud es particularmente adecuado para este propósito. En resumen, se emplea un panel de al menos 10, preferiblemente al menos 12, 13, 14, 15 o más líneas de células presentadoras de antígeno, cada una homocigótica para un alelo HLA-DR diferente, para presentar un péptido derivado de PAP a un clon de células T CD4+ (por ejemplo, clon PAPc66) que es específicamente sensible a la proteína PAP (por ejemplo, por producción de citoquinas tales como IFN γ o granzima B). El péptido correspondiente a los restos 257-271 de la proteína PAP humana (es decir, la SEQ ID NO: 1) se usa como control positivo. Un péptido derivado de PAP irrelevante, ausencia de péptido y cada línea de célula presentadora de antígeno en solitario se usan como controles negativos para los ensayos. Los ensayos se configuran en placas de cultivo celular de múltiples pocillos en medio apropiado con células presentadoras de antígeno y células T CD4+ en cada pocillo. Los péptidos se diluyen hasta una concentración adecuada y se añaden a cada pocillo. Después de incubación durante un periodo de tiempo apropiado, los sobrenadantes se recogen de los pocillos y se analizan para la producción de citoquinas, que puede medirse por ELISA basándose en la absorbancia a 492 nm. Normalmente, el efecto de un epítipo promiscuo de clase II de PAP descrito en este documento que induce a una respuesta de células T CD4+ específica de PAP es al menos el 25 % del efecto del epítipo de PAP 257-271 (que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en al SEQ ID NO: 1) en las mismas condiciones de ensayo, por ejemplo, a la misma concentración molar y presentado por células presentadoras de antígeno del mismo alelo HLA-DR individual. Más preferiblemente, dicho efecto es al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más del mostrado por el epítipo de PAP 257-271 en las mismas condiciones.

VII. COMPOSICIONES Y ADMINISTRACIÓN

La presente descripción también proporciona composiciones que comprenden una cantidad eficaz de (1) un péptido PAP promiscuo; o (2) un péptido de fusión que comprende un péptido PAP y un polipéptido heterólogo; o (3) una célula presentadora de antígeno (APC) con el péptido de (1) o (2) formando un complejo con una molécula MHC sobre la superficie celular para inducir una respuesta inmunitaria de células T específica contra una proteína PAP en aplicaciones tanto profilácticas como terapéuticas. Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento son adecuadas para su uso en diversos sistemas de suministro de fármacos. Las formulaciones adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17.^a ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos para el suministro de fármacos, véase, Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las células presentadoras de antígeno (APC) pueden generarse para la carga de péptidos por diversos métodos. La materia prima de partida es sangre periférica o una leucófresis con o sin movilización. Las APC pueden aislarse por múltiples métodos, por ejemplo, centrifugación por densidad flotante, elutriación, perlas magnéticas y adherencia a plástico usados en solitario o en combinación. Después del aislamiento, las APC se cultivan durante 1-14 días con o sin la presencia de citoquinas, factores de crecimiento, agentes de activación y agentes de maduración. Las APC se cargan con péptido por la adición del péptido al cultivo en concentraciones de 1 μ g a 1 mg/ml durante 6-48 horas. Las APC después se recogen, se lavan y se resuspenden en una formulación adecuada para su infusión. Las APC pueden suministrarse frescas o pueden mantenerse en almacenamiento congelado para su suministro en un momento posterior.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Las vías preferidas de administración de las composiciones farmacéuticas son subcutánea o intradérmica a dosis bisemanales de aproximadamente 1 μ g a 1 mg preferiblemente 50 μ g-1 mg, de un péptido de esta invención para un adulto humano

de 70 kg. La dosis apropiada puede administrarse a intervalos semanales, bisemanales o mensuales.

Las APC pulsadas con péptido pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal. Las APC pulsadas con péptido se suministran a intervalos semanales, bisemanales o mensuales a dosis de 1 millón a 10 billones de células.

Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un péptido de la presente invención, se usan excipientes o vehículos inertes y farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones, suspensiones y emulsiones adecuadas para administración intradérmica, subcutánea, parenteral o intravenosa. Las soluciones acuosas estériles del componente activo (por ejemplo, un péptido PAP promiscuo o péptido de fusión) o soluciones estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, agua tamponada, solución salina, PBS, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tal como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares.

Las soluciones estériles pueden prepararse disolviendo el componente activo (por ejemplo, un péptido PAP promiscuo o péptido de fusión) en el sistema disolvente deseado, y después pasando la solución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarla o, como alternativa, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de su administración. El pH de las preparaciones normalmente estará entre 3 y 11, más preferiblemente de 5 a 9 y mucho más preferiblemente de 7 a 8.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un péptido PAP o péptido de fusión pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una afección que puede exacerbarse por la proliferación de células tumorales que sobreexpresan la proteína PAP en una cantidad suficiente para prevenir, curar, revertir o al menos ralentizar o detener parcialmente los síntomas de la afección y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y el peso y estado general del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg del péptido PAP o péptido de fusión bisemanalmente para un paciente de 70 kg, usándose más comúnmente dosificaciones de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 1 mg del péptido bisemanalmente para un paciente de 70 kg. La dosis apropiada puede administrarse a intervalos semanales, bisemanales o mensuales.

Pueden realizarse administraciones únicas o múltiples de las composiciones con niveles de dosis y patrones que se seleccionan por el médico asistente. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de un péptido PAP o péptido de fusión de esta invención suficiente para inhibir de forma eficaz la proliferación de células tumorales que expresan PAP en el paciente con fines terapéuticos.

VIII. MÉTODO PARA DETECTAR UNA RESPUESTA DE CÉLULAS T ESPECÍFICA PARA PAP

La presente invención proporciona adicionalmente un método para detectar si una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína PAP está presente en un paciente. Este método incluye las siguientes etapas: primera, los linfocitos incluyendo al menos una célula T y una célula presentadora de antígeno se obtienen de un paciente. Las muestras adecuadas que producen dichos linfocitos incluyen sangre, infiltrado tumoral y ganglios linfáticos o fluidos linfáticos. Segunda, la célula T y células presentadoras de antígeno se exponen a un péptido PAP promiscuo (o un péptido de fusión que comprende el péptido PAP y un péptido heterólogo) de esta invención en condiciones que permitiría la presentación apropiada de un epítipo de células T por la célula presentadora de antígeno a la célula T. Tercera, se miden los signos de una respuesta de células T *in vitro* por medios bien conocidos en la técnica tales como ELISPOT, ensayo de proliferación o citometría de flujo. Cuando se detecta una respuesta de células T por cualquiera de estos métodos, puede concluirse que existe una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína PAP en el paciente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente y no a modo de limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente diversos parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. PA2024 es una proteína de fusión recombinante patentada que

contiene secuencias de PAP y GM-CSF fabricada por Dendreon Corporation para la inmunoterapia celular de investigación sipuleucel-T. PA2024 se expresa en un sistema de baculovirus. CHOPA2024 y hPAPGM son idénticos en secuencia a PA2024, pero se expresan en sistemas de mamífero usando células de ovario de hámster chino (CHO) y 293 Ebna, respectivamente. iPAP es una proteína recombinante producida en un sistema de expresión de baculovirus y CHOPAP es una proteína recombinante producida en células de mamífero, ambas producidas y purificadas por Dendreon Corporation. Para definir las respuestas inmunitarias específicas de PAP *in vitro*, se generaron 94 péptidos a partir de la secuencia de la proteína PAP. Estos péptidos eran de 15 aminoácidos de longitud, solapando en 11 aminoácidos (Genemed Synthesis, South San Francisco, CA). Todos los péptidos PAP se secuenciaron y determinaron en >95 % puros por HPLC analítica y espectroscopia de masas.

Recogida de muestras de sujetos y donantes sanos. Todas las muestras de sujetos y donantes sanos se recogieron de acuerdo con los protocolos patrocinados por el investigador aprobados por la Junta de Revisión de Investigación apropiada. Después del consentimiento informado, se cogieron muestras de sangre completa por venopunción en tubos vacutainer heparinizados o jeringas y se prepararon para su transporte y/o procesamiento. Después de recibir las muestras de sangre por el laboratorio, se recogieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en condiciones estériles por centrifugación en gradiente de densidad y se prepararon para su uso en los ensayos especificados.

Líneas celulares. Se adquirieron líneas HLA-DRβ1 EBV-LcL de la European Collection of Cell Cultures originaria del 12.º International Histocompatibility Workshop (IHW) mantenido en Estrasburgo, Francia. Las células linfoblastoides HLA-DR transformadas con EBV eran homocigóticas para el alelo HLA-DRβ1 (Tabla I). EBV-LcL también se generó a partir de varias PBMC de los sujetos usando el sobrenadante de la línea celular B95-8 (ATCC, Manassas, VA) para la expansión y ensayo de clones de células T autólogas.

Generación *in vitro* de clones de células T específicos de PAP. Las PBMC de un sujeto que recibió sipuleucel-T se estimularon en un matraz de cultivo tisular T-25 con 10 µg/ml de CHOPA2024 durante una noche en RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM, 50 U/ml de Penicilina, 50 µg/ml de Estreptomina y tampón HEPES 20 mM con suero AB humano al 10 % (Gemini BioProducts, Calabasas, CA) (cRPMI+HS al 10 %). Al día siguiente, se aislaron las células que secretaban IFNγ del cultivo de PBMC usando el kit de enriquecimiento y detección de células del ensayo de secreción de IFNγ (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). La población enriquecida en IFNγ se sembró por clonación en placas de fondo redondo de 96 pocillos a aproximadamente 1-50 células por pocillo con 10 U/ml de IL-2 humana recombinante (Invitrogen). Las células que no secretaban IFNγ se irradiaron (3000 rad) y se usaron como células de alimentación. Las placas se incubaron durante siete días a 37 °C con CO₂ al 5 %. En el día 7 de la clonación, las células que secretaban IFNγ se expandieron de forma no específica en placas de 96 pocillos como se describe previamente (Yee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, 99: 16168-16173). En resumen, se añadieron 100 µl de medio cRPMI+HA al 10 % con 25 U/ml de IL-2 humana recombinante y 10 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 humana (BD Pharmingen, San Diego, CA) a cada pocillo con 1x10⁴/pocillo de EBV-LcL autólogos irradiados y 1x10⁵/pocillo de PBMC alogénicas irradiadas. Las placas se incubaron durante 14 días a 37 °C con CO₂ al 5 % y después se inspeccionaron visualmente para el crecimiento positivo. Los clones positivos para el crecimiento se transfirieron a placas de 24 pocillos y se expandieron usando rIL-2, anti-CD3 y células accesorias como anteriormente, ajustando las cantidades de células para el volumen aumentado.

Especificidad de antígeno de clones de células T. Todos los ensayos se configuraron por triplicado en placas de fondo redondo de 96 pocillos con antígeno o péptido en cRPMI 1640+FBS al 10 % (suero bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, CA)), clones de células T a 1x10⁵ células/pocillo y células presentadoras de antígeno a 2x10⁵ células/pocillo. Se usaron EBV-LcL autólogos para células presentadoras de antígeno en ensayos de especificidad y se realizaron ensayos para mostrar la promiscuidad del péptido usando los HLA-DRB1 EBV-LcL. Todos los ensayos se incubaron durante 48 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 48 horas, los sobrenadantes se recogieron para ensayar la producción de citoquinas. Los ensayos de bloqueo de MHC de clase II se configuraron como anteriormente con EBV-LcL autólogos y la adición de los siguientes anticuerpos (25 µg/ml-0,1 µg/ml) al ensayo: mAb anti-HLA-DR (Dendreon Corporation and Research Diagnostics, Inc. Flanders, NJ), mAb HLA-DQ 1a3 y mAb HLA-DP B7/21 (Leinco Technologies, St. Louis, MS). El mAb Anti-HLA-A2 (HB-82, ATCC, Manassas, VA) se usó como control en ensayos de bloqueo.

ELISA de IFNγ y granzima B. Se midió la producción de IFNγ usando pares de anticuerpos anti-IFNγ humana para ELISA (BD Pharmingen, San Diego, CA). En resumen, se recubrieron placas Immulon 4 (Thermo Labsystems/ VWR, Brisbane, CA) durante una noche con 100 µl de anticuerpo anti-IFNγ humana a 3 µg/ml. Las placas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 4 % (Sigma, St. Louis, MO) en PBS (Invitrogen) durante 2 horas a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS+Tween 20 al 0,05 % y se añadieron 100 µl de muestras del sobrenadante procedentes de la estimulación específica de antígeno a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,25-2 horas. Las placas se lavaron y se diluyó el anticuerpo anti-IFNγ humana biotinilado en BSA al 1 % en PBS (1 µg/ml) y se añadió a las placas en 100 µl durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, se diluyó 1:1000 estreptavidina HRP (BD Pharmingen) en PBST y se añadió a los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se incubaron con Sigma Fast OPD durante 15 minutos en la oscuridad. Se añadió HCl 2 M para detener la reacción y las placas se leyeron para la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro. Se usó el kit de ELISA de granzima B (Cat. n.º 3485-1H-20, Mabtech, Nacka Strand, Suecia) para medir la producción

de granzima B. El anticuerpo de recubrimiento (GB10), el anticuerpo de detección biotinilado (GB11) y estreptavidina HRP se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante según el protocolo descrito anteriormente.

Resultados

5 Los resultados experimentales mostrados en las Figuras 1-3 demuestran que el péptido PAP₂₅₇₋₂₇₁ es un epítipo promiscuo restringido a MHC de clase II procesado de forma natural de la fosfatasa ácida prostática (PAP). Este péptido tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (RLQGGVLVNEILNHM), es capaz de
10 inducir activación de células T cuando se presenta por líneas celulares linfoblastoides que representan 9 familias serológicas diferentes de HLA-DR (cadena β; DR1, DR4, DR7, DR8, DR11, DR12, DR13, DR14, y DR15) que tienen más de 15 alelos HLA-DRβ1 diferentes.

15 El clon de células T CD4+, PAPc66 se aisló de un sujeto que participaba en un ensayo clínico en fase 3 en curso para el tratamiento de cáncer de próstata usando sipuleucel-T, que es un producto de inmunoterapia celular activa autóloga de investigación diseñado para estimular las respuestas inmunitarias de células T contra PAP humano. Después de una estimulación durante una noche de las células mononucleares de sangre periférica del sujeto con una proteína de fusión de PAP y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos humano (PA2024), se aisló PAPc66 usando secreción de IFNγ como marcador para la selección. El sujeto del ensayo clínico del que se
20 aisló este clon se tipó como HLA-DRB 1*0404, 1501. Este clon también ha demostrado producir IFNγ y granzima B tras la activación con PAP₂₅₇₋₂₇₁ presentado apropiadamente.

25 Este novedoso epítipo promiscuo proporciona una herramienta para investigar los mecanismos inmunitarios potenciales que se producen como consecuencia del tratamiento con inmunoterapia celular activa específica de PAP. Adicionalmente, este péptido contribuye a estrategias dirigidas más universales para potenciar las futuras inmunoterapias contra el cáncer.

Tabla I. Líneas celulares EBV-LCL de HLA definido.

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

30 Las líneas celulares se obtuvieron de la ECACC European Collection of Cell Cultures y se enumeran en el directorio de células IMGT/HLA (sitio web ebi.ac.uk/imgt/hla/cell_query.html).

Lista de secuencias

ES 2 620 740 T3

SEQ ID NO: 1 (restos 257-271 de la proteína PAP humana) RLQGGVLVNEILNHM

SEQ ID NO: 2 (restos 254-274 de la proteína PAP humana) EKSRLQGGVLVNEILNHMKRA

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado que consiste en 15 a 18 aminoácidos y que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde el péptido activa las células T cuando es presentado por células presentadoras de antígeno que expresan HLA-DR1, células presentadoras de antígeno que expresan DR4, células presentadoras de antígeno que expresan DR7, células presentadoras de antígeno que expresan DR8, células presentadoras de antígeno que expresan DR11, células presentadoras de antígeno que expresan DR12, células presentadoras de antígeno que expresan DR13, células presentadoras de antígeno que expresan DR14 y células presentadoras de antígeno que expresan DR15.
- 10 2. Un péptido de fusión que comprende el péptido de la reivindicación 1 fusionado a un polipéptido heterólogo.
- 15 3. El péptido de fusión de la reivindicación 2, en donde el péptido de la reivindicación 1 se fusiona a un polipéptido heterólogo a través de un enlace peptídico.
- 20 4. El péptido de las reivindicaciones 1 o 2, que induce una respuesta inmunitaria de células T específica para la proteína fosfatasa ácida prostática (PAP) humana cuando es presentado por una célula presentadora de antígeno de al menos 10 alelos HLA-DR diferentes.
- 25 5. El péptido de la reivindicación 4, que induce una respuesta inmunitaria de células T específica para una proteína PAP cuando es presentado por una célula presentadora de antígeno de al menos 15 alelos HLA-DR diferentes.
6. El péptido de la reivindicación 4, en el que los alelos HLA-DR se seleccionan del grupo que consiste en 0101, 0102, 0103, 1503, 160201, 0301, 0302, 0401, 0402, 040301, 040501, 1101, 1102, 1103, 1104, 110401, 1201, 1301, 1302, 1401, 1402, 0701, 080101, 080201 y 0901.
- 30 7. El péptido de la reivindicación 1, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
8. El péptido de la reivindicación 2, en donde el polipéptido heterólogo es un factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).
- 35 9. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el péptido de la reivindicación 3.
- 40 10. Un casete de expresión, opcionalmente en forma de un vector vírico recombinante, que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 45 11. Una célula hospedadora que comprende el casete de expresión de la reivindicación 10.
12. Una composición que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un excipiente fisiológicamente aceptable.
13. La composición de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente una célula presentadora de antígeno, formando el péptido de la reivindicación 1 un complejo con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre la superficie de la célula.
- 50 14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en un método para inducir en un paciente una respuesta inmunitaria de células T específica para la proteína fosfatasa ácida prostática (PAP) humana.
- 55 15. Un método *in vitro* para detectar en un paciente una respuesta inmunitaria de células T específica para la proteína fosfatasa ácida prostática (PAP) humana usando una muestra del paciente que comprende una célula presentadora de antígeno y una célula T, comprendiendo el método las etapas de (a) poner en contacto la célula presentadora de antígeno y la célula T con el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y (b) detectar una respuesta de células T, en el que la detección de una respuesta de células T indica la presencia de una respuesta inmunitaria de células T específica para la proteína PAP en el paciente.
16. El método de la reivindicación 15, en el que la etapa (b) se realiza por ELISPOT, ensayo de proliferación o citometría de flujo.

FIG. 1A

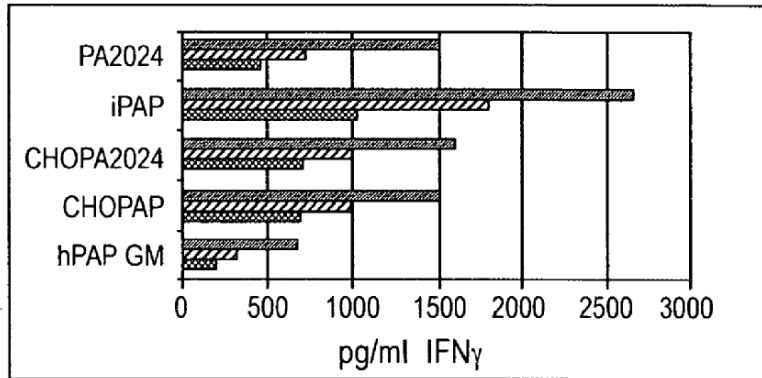


FIG. 1B

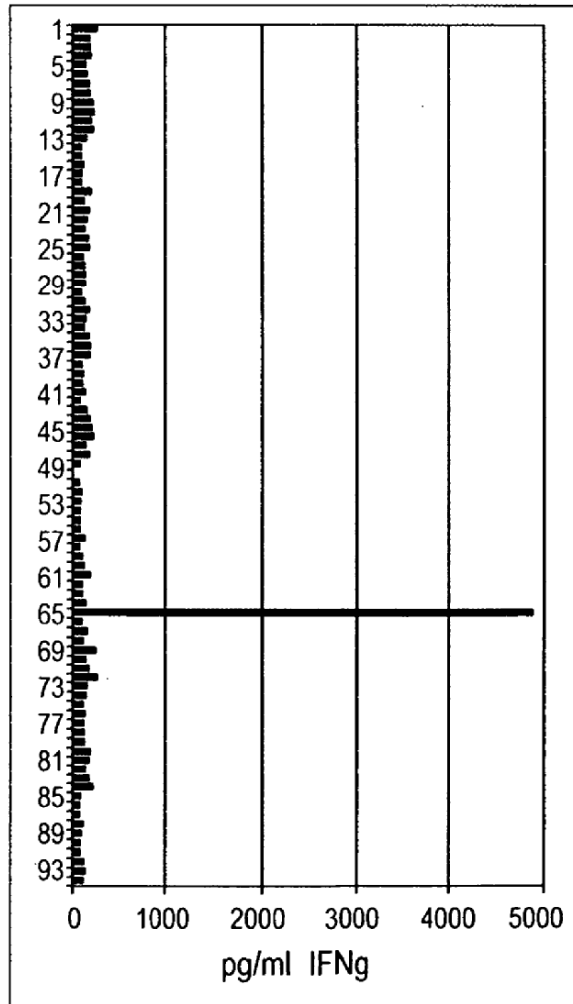


FIG. 1C

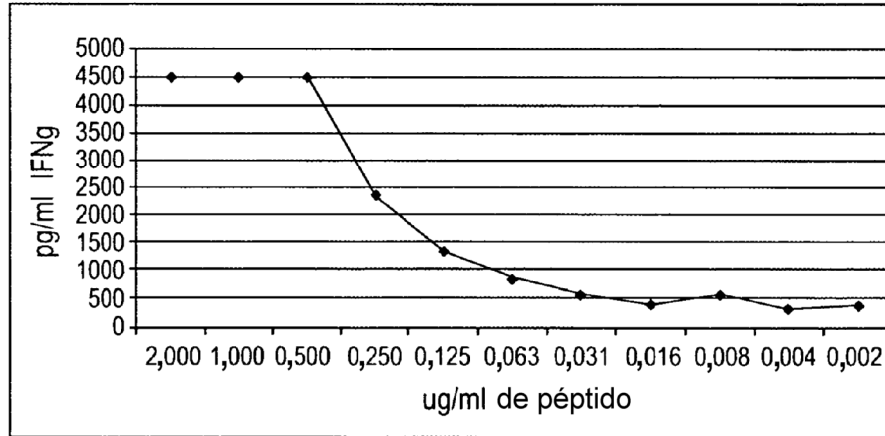
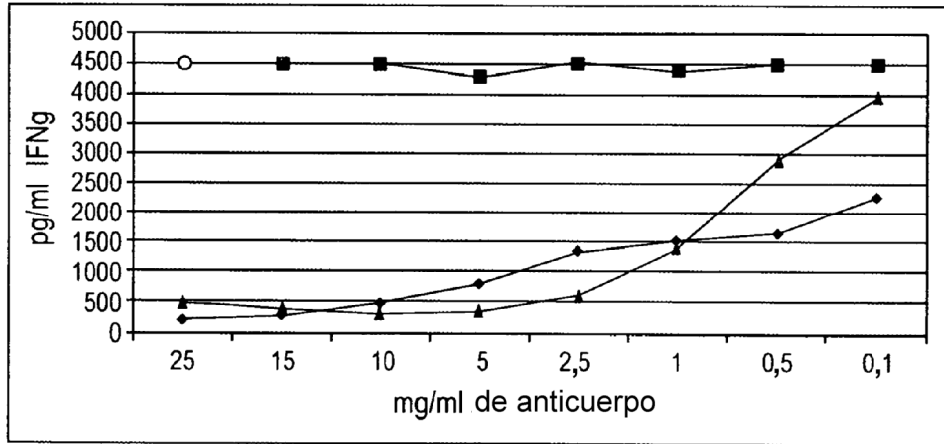


FIG. 2



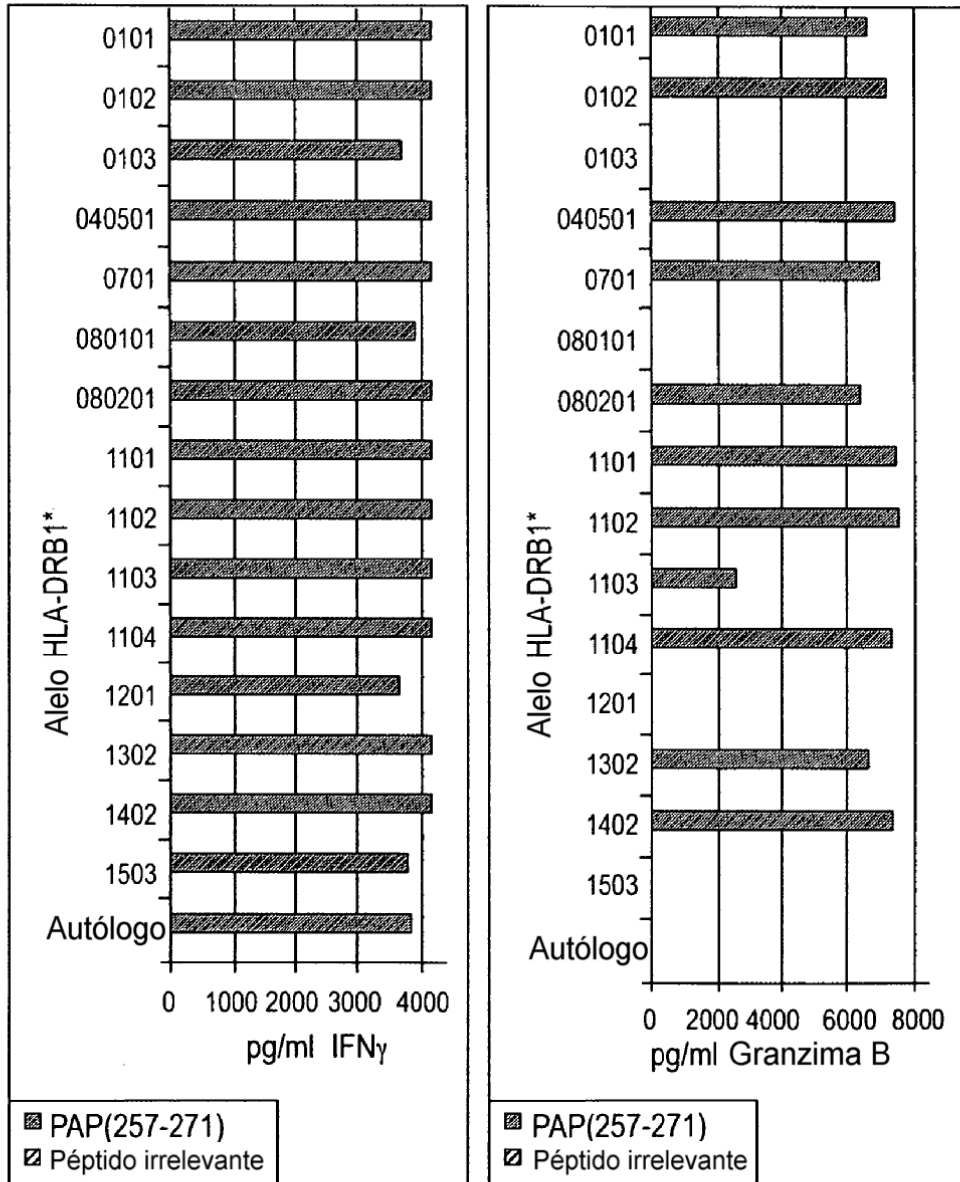


FIG. 3A

FIG. 3B