

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 308**

51 Int. Cl.:

G06F 7/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2006 PCT/US2006/035171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2007 WO07030771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2006 E 06824918 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 1934608**

54 Título: **Identificación selectiva de péptidos inmunogénicos**

30 Prioridad:

08.09.2005 US 714865 P

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**PONNIAH, SATHIBALAN;
PEOPLES, GEORGE, E.;
STORRER, CATHERINE, E. y
FLORA, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 628 308 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

Identificación selectiva de péptidos inmunogénicos

5 Referencia a solicitudes relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos nº 60/714.865 titulada "*Identificación selectiva de péptidos inmunogénicos*" presentada el 8 de septiembre de 2005.

10 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

[0002] Esta invención, en el campo de la inmunología/inmunoterapia, el descubrimiento y el desarrollo de vacunas, se refiere en general a la identificación de péptidos inmunogénicos de regiones de proteínas y moléculas que están implicadas en interacciones de unión con anticuerpos policlonales y monoclonales. La presente invención está dirigida a procedimientos para la identificación y uso de los péptidos para prevenir, suprimir y tratar enfermedades inmunorrelacionadas. Específicamente, la invención proporciona una terapia que da como resultado la mejora clínica de pacientes de cáncer.

2. Descripción de los antecedentes

[0003] Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por un ataque indeseado e injustificado por el sistema inmunitario a los tejidos del hospedador. Aunque el mecanismo para la progresión de estas enfermedades no es bien comprendido, son conocidos al menos algunos de los detalles con respecto a la presentación de antígeno. Se cree que los antígenos, incluyendo autoantígenos, se procesan mediante células presentadoras de antígeno (APC) y los fragmentos resultantes se asocian entonces con una de las proteínas de superficie celular codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Como resultado, se dice que el reconocimiento de un antígeno peptídico está "restringido" a MHC. Cuando se une el complejo de MHC/fragmento de antígeno a un receptor de linfocitos T complementario (TCR) sobre la superficie de un linfocito T, da como resultado la activación y proliferación del clon o subpoblación de linfocitos T portadores de ese TCR particular. Una vez activados, los linfocitos T tienen la capacidad de regular otras células del sistema inmunitario que exhiben el antígeno procesado y de destruir las células o tejidos que portan epítomos del antígeno reconocido.

[0004] Las terapias de anticuerpo en que se dirigen anticuerpo a moléculas de MHC y moléculas de CD4 han sido generalmente exitosas en varios modelos animales de autoinmunidad. Sin embargo, estos enfoques pueden ser demasiado no específicos y potencialmente abiertamente supresores. Esto puede ser porque un 70 % de los linfocitos T portan el marcador CD4 y porque todas las respuestas mediadas por linfocitos T y la mayoría de respuestas de anticuerpo requieren la presentación de antígeno asociada a MHC.

[0005] Una gran dificultad con los presentes enfoques es que requieren el uso de preparaciones biológicas complejas que no comprenden agentes terapéuticos bien definidos. Dichas preparaciones soportan una producción compleja y requisitos de mantenimiento (p.ej., la necesidad de esterilidad y grandes cantidades de medio para producir un gran número de linfocitos T "de vacuna") y carecen de reproducibilidad de lote a lote. Para ser útiles en seres humanos, las preparaciones de "vacuna" de linfocitos T deben ser tanto autólogas como individualmente específicas. Esto significa que deben estar adaptadas únicamente para cada paciente. Además, la presencia de antígenos adicionales sobre la superficie de tales linfocitos T puede dar como resultado una respuesta inmunitaria más amplia, posiblemente perjudicial, no limitada a los clones de linfocitos T deseados (Offner y col., J. Neuroimmunol. 21:13-22 (1989)).

[0006] Kono y col. (Clin Cancer Res 10, 2538) divulga que el trastuzumab potencia la actividad citotóxica de los CTL contra tumores que sobreexpresan HER2.

[0007] Por lo tanto, existe la necesidad de agentes y composiciones farmacéuticas que tengan las propiedades de especificidad por la respuesta inmunitaria selectiva. Estos agentes y composiciones deberían tener también predecibilidad en su selección, conveniencia y reproducibilidad de preparación, y suficiente definición para permitir un control preciso de la dosificación.

[0008] Una vacuna efectiva es capaz de generar una inmunidad de larga duración siendo relativamente

inocua para el receptor. Se han usado tradicionalmente como vacunas organismos atenuados y antígenos purificados de organismos. Sin embargo, tales agentes producen a menudo efectos secundarios nocivos o no consiguen proteger frente a exposiciones posteriores. Debido a las dificultades inherentes en el crecimiento de organismos patogénicos y la producción de vacunas eficaces a partir de ellos, muchas enfermedades víricas, bacterianas y parasitarias no tienen vacuna eficaz.

[0009] Una dificultad adicional con el uso de péptidos como vacunas es que, en la mayoría de casos, los péptidos solos no son buenos inmunógenos. Es un fenómeno bien conocido que la mayoría de respuestas inmunitarias a los antígenos peptídicos son dependientes de linfocitos T. Por consiguiente, se han ligado moléculas "portadoras" a los antígenos peptídicos que se unen, por ejemplo, a inmunoglobulina de superficie de linfocitos B para generar una respuesta de IgG de alta afinidad. En otras palabras, la falta de sensibilidad ante antígenos peptídicos puede superarse a veces ligando otro péptido que induce actividad de linfocitos T auxiliares.

[0010] En general, los péptidos que inducen la actividad de linfocitos T auxiliares se generan por linfocitos B mediante digestión enzimática de proteínas nativas internalizadas mediante un receptor de anticuerpo. Estos péptidos estimulantes de linfocitos T se presentan entonces sobre la superficie del linfocito B en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. De forma similar, los péptidos que inducen actividad de linfocitos T citotóxicos pueden generarse por células accesorias, incluyendo linfocitos B. Estos péptidos se presentan sobre la superficie celular de células accesorias en asociación con moléculas de MHC de clase I. Como se usa en la presente memoria, el término "péptido estimulante de linfocitos T" significa cualquier péptido que active o estimule linfocitos T, incluyendo (pero sin limitación), linfocitos T auxiliares y/o linfocitos T citotóxicos.

[0011] Los péptidos representan un enfoque prometedor para la producción y diseño de vacunas. Sin embargo, las dificultades en la elaboración de péptidos que inducen la respuesta inmunitaria deseada han obstaculizado su éxito. Esto incluye las dificultades inherentes a la elaboración de péptidos que imiten estrechamente la estructura nativa de determinantes antigénicos.

[0012] Estos determinantes antigénicos, o epítopos, de un antígeno proteico representan los sitios que se reconocen como sitios de unión por ciertos componentes inmunitarios tales como anticuerpos o células inmunocompetentes. Aunque los epítopos se definen solo en un sentido funcional, concretamente por su capacidad de unirse a anticuerpos o células inmunocompetentes, hay una base estructural para su actividad inmunológica.

[0013] Los epítopos se clasifican como continuos y discontinuos. Los epítopos continuos están compuestos por secuencias de aminoácidos a lo largo de un antígeno y se basan en la estructura terciaria o plegamiento de la proteína para juntar las secuencias y formar el epítopo. En contraposición, los epítopos continuos son fragmentos peptídicos lineales del antígeno que son capaces de unirse a anticuerpos creados contra el antígeno intacto.

[0014] Se han estudiado muchos antígenos como posibles marcadores séricos para diferentes tipos de cáncer porque la concentración sérica del antígeno específico puede ser indicación de la etapa del cáncer en una persona no tratada. Como tal, sería ventajoso desarrollar reactivos inmunológicos que reaccionen con el antígeno. Más específicamente, sería ventajoso desarrollar reactivos inmunológicos que reaccionen con los epítopos del antígeno proteico.

[0015] Se han intentado procedimientos convencionales que usan propiedades bioquímicas y biofísicas para determinar la localización de epítopos peptídicos probables. Estos procedimientos incluyen un cuidadoso cribado de la estructura primaria de una proteína, la búsqueda de giros críticos, hélices e incluso el plegamiento de la proteína en la estructura terciaria. Los epítopos continuos son estructuralmente menos complicados y por lo tanto pueden ser más fáciles de localizar. Sin embargo, la capacidad de predecir la localización, longitud y potencia del sitio es limitada.

[0016] Se han usado diversos otros procedimientos para identificar y predecir la localización de epítopos continuos en proteínas mediante el análisis de ciertos rasgos de su estructura primaria. Por ejemplo, parámetros tales como hidrofilia, accesibilidad y movilidad de fragmentos cortos de cadenas polipeptídicas se han correlacionado con la localización de epítopos.

[0017] La hidrofilia se ha usado como base para determinar epítopos proteicos mediante el análisis de una secuencia aminoacídica para encontrar el punto de mayor hidrofilia local. Como se discute en la patente de EE.UU. nº 4.554.101, se asigna a cada aminoácido un valor numérico de hidrofilia relativo que se promedia entonces según la hidrofilia local, de modo que las localizaciones de los valores de hidrofilia media local máximos representan las

localizaciones de los epítomos continuos. Sin embargo, este procedimiento no proporciona información de la longitud óptima del epítomo continuo. De forma similar, la patente de EE.UU. nº 6.780.598 B1 determina la inmunopotencia de un epítomo proporcionando un sistema de graduación que distingue entre epítomos dominantes y subdominantes.

5 **[0018]** Se han ideado algoritmos informatizados para aprovechar las propiedades bioquímicas de los aminoácidos en una secuencia proteica mediante la ordenación de la información para buscar epítomos de linfocitos T. Estos algoritmos se han usado para buscar en la secuencia aminoacídica de una proteína dada las características conocidas por ser comunes a péptidos inmunogénicos. Pueden localizar a menudo regiones que es probable que induzcan una respuesta inmunitaria celular *in vitro*. Los algoritmos informatizados pueden identificar regiones de
10 proteínas que contienen epítomos que son menos variables entre aislamientos geográficos, o regiones de proteínas más variables de cada aislamiento geográfico, o efectuarse como herramienta preliminar para evaluar la evolución de la respuesta inmunitaria a una cuasi-especie propia del individuo.

[0019] Los péptidos presentados junto con moléculas de MHC de clase I derivan de antígenos extraños o de
15 autoproteínas que se han sintetizado en el citoplasma. Los péptidos presentados con moléculas de MHC de clase II derivan habitualmente de antígenos de proteínas exógenas. Los péptidos que se unen a moléculas de clase I son habitualmente más cortos (de aproximadamente 8-10 residuos aminoacídicos) que aquellos que se unen a moléculas de clase II (de 8 a más de 20 residuos).

20 **[0020]** La identificación de epítomos de linfocitos T en antígenos de proteína se ha logrado tradicionalmente usando una variedad de procedimientos. Estos incluyen el uso de proteína antigénica nativa o recombinante entera y fragmentada, así como el procedimiento de "péptido superpuesto" más comúnmente empleado para la identificación de epítomos de linfocitos T en antígenos de proteína, que implica la síntesis de péptidos superpuestos que cubren toda la secuencia de una proteína dada. Se ensaya entonces en los péptidos su capacidad de estimular las
25 respuestas citotóxicas de linfocitos T o de proliferación *in vitro*.

[0021] El procedimiento de péptido superpuesto es tanto costoso como trabajoso. Por ejemplo, para efectuar un ensayo que usa péptidos de 15 aminoácidos de largo superponiendo 5 aminoácidos que cubren un antígeno dado de longitud n (un pequeño subconjunto de los posibles pentadecámeros que cubren la proteína), se necesitaría
30 construir y ensayar $(n/5)-1$ péptidos. Para la mayoría de tipos de análisis, este número sería prohibitivo.

[0022] Por consiguiente, se necesita un procedimiento sencillo para identificar péptidos inmunogénicos de regiones de autoproteínas y otras proteínas y moléculas implicadas en interacciones de unión con anticuerpos policlonales y monoclonales.
35

Resumen de la invención

[0023] La invención supera los problemas y desventajas asociados a los procedimientos actuales y proporciona herramientas y procedimientos de generación de una respuesta inmunitaria en un paciente necesitado
40 de ello como se caracteriza en las reivindicaciones.

[0024] Una realización del procedimiento de la invención incluye sintetizar un péptido inmunogénico a partir de una autoproteína, que comprende las etapas de identificar una o más secuencias peptídicas de una autoproteína que están directa o indirectamente implicadas con la unión a anticuerpo, someter la una o más secuencias
45 peptídicas a un algoritmo que identifica las secuencias sospechosas de ser inmunogénicas, cribar todos los fragmentos peptídicos de una o más secuencias peptídicas e identificar un péptido inmunogénico del fragmento proteico en el que la interacción de unión a anticuerpo sea policlonal o monoclonal. Además, un paciente puede tratarse con el péptido inmunogénico generando una respuesta inmunitaria.

50 **[0025]** Otra realización del procedimiento de la invención incluye identificar un tratamiento de vacuna que comprende las etapas de unir un anticuerpo a la autoproteína formando un complejo, someter el complejo a digestión de proteosoma, obtener los productos de digestión que comprenden péptidos e identificar una secuencia peptídica inmunogénica a partir de los productos de digestión.

55 **[0026]** La presente solicitud divulga también un procedimiento de identificación de un tratamiento específico de paciente que comprende las etapas de obtener un precursor inmunorreactivo preexistente de dichos AGIE/ABIE del paciente, cultivar células tumorales obtenidas a partir de dicho paciente, incubar las células tumorales cultivadas que sean reactivas contra anticuerpos generados, examinar las respuestas del conjunto de datos en presencia y ausencia de los anticuerpos generados e identificar los epítomos inmunogénicos específicos de paciente. Este

procedimiento puede incluir la generación de anticuerpos que son reactivos contra autoantígenos, la generación de anticuerpos que son reactivos contra antígenos extraños y/o la generación de anticuerpos que, una vez administrados a dicho paciente, son terapéuticos o profilácticos.

- 5 **[0027]** Se exponen a continuación otras realizaciones y ventajas técnicas de la invención que pueden ser evidentes a partir de los dibujos y la descripción de la invención siguiente, o pueden aprenderse por la práctica de la invención.

Descripción de la invención y ejemplos

10

[0028] Los tratamientos de enfermedades complejas que implican el sistema inmunitario y las respuestas inmunitarias causadas por autoantígenos endógenos y/o antígeno extraños que están implicadas en la producción de anticuerpo autoinmunitario son extremadamente difíciles de descubrir. Los antígenos implicados en dichas enfermedades son tanto antígenos extraños como autoantígenos (o ambos). La administración de antígenos
15 extraños para inmunización pasiva puede dar como resultado enfermedades del complejo inmune similares a la enfermedad de suero. También se eliminan o procesan y destruyen típicamente linfocitos T reactivos capaces de reconocer autopéptidos. Estos péptidos, generados y exhibidos bajo condiciones normales y constitutivas, se degradan mediante la maquinaria de degradación de proteínas celulares, dando como resultado la ausencia de una respuesta inmunitaria.

20

[0029] Se ha descubierto sorprendentemente un procedimiento sencillo para la identificación de regiones inmunogénicas de autoproteínas y otras proteínas y moléculas implicadas en las interacciones de unión con anticuerpos policlonales y monoclonales. A partir de este procedimiento, se generan epítopos nuevos y únicos que se presentan en presencia de anticuerpos unidos. Una vez se identifican estas regiones inmunogénicas, pueden
25 prepararse vacunas que comprenden el antígeno, modificaciones del antígeno o anticuerpos específicamente reactivos con el antígeno o antígeno modificado. Por tanto, la presente invención hace manejable el descubrimiento de péptidos de vacuna y permite la generación específica de péptidos inmunogénicos únicos a partir de autoproteínas asociadas a tumores, que pueden inducirse o generarse para expresión específica en presencia del anticuerpo, permitiendo una vacuna y/o terapia de combinación novedosa.

30

[0030] La invención se caracteriza en las reivindicaciones y se describe más completamente en la presente memoria y hace referencia a muchas realizaciones preferidas. Esta invención, sin embargo, no debería considerarse limitada a esas realizaciones.

35 **[0031]**

El proteosoma es un complejo de múltiples subunidades con actividades de escisión proteolítica que da como resultado la generación de una amplia variedad de péptidos a partir de proteínas. La susceptibilidad de una proteína dada a las actividades proteolíticas del proteosoma depende de diversas modificaciones estructurales primarias, secundarias y terciarias y postraduccionales que tienen lugar en el proteosoma. Estas actividades exponen ciertas secuencias o regiones de la proteína y no otras al sistema.

40

[0032] En una realización del procedimiento de la invención, se inducen las células cancerosas a expresar péptidos inmunogénicos a partir de antígenos únicos o autoantígenos específicos de tumor para estimular respuestas inmunitarias antitumorales para inmunoterapia. Normalmente, estos péptidos no se generan a partir de autoproteínas. La unión de anticuerpos (u otras moléculas) a los sitios normalmente accesibles y procesados por
45 proteosomas altera el patrón de accesibilidad y el patrón de escisión proteolítica resultante por el proteosoma. Dicha alteración del sitio da como resultado la generación de péptidos novedosos que pueden ser intrínsecamente inmunogénicos porque no se han expresado y exhibido anteriormente por la delección de los linfocitos T inmunorreactivos.

50 **[0033]**

En una realización preferida, se identificó una región inmunogénica única de HER-2/neu. HER-2/neu es una proteína oncogénica sobreexpresada. Las estrategias de vacuna convencionales, normalmente eficaces para inmunizar pacientes, no funcionaban con una "autoproteína" tal como HER-2/neu. La tolerancia a las autoproteínas puede dirigirse solo a epítopos dominantes de la proteína y no a la proteína entera. Por lo tanto, la inmunización ante solo un fragmento proteico específico, y no la proteína entera, alivia este problema. Este fragmento proteico
55 específico está localizado dentro de la secuencia directamente implicada con la unión a anticuerpo o en la proximidad de esa región.

[0034] Después de identificar esta secuencia peptídica más corta restringida, se somete la secuencia a algoritmos para identificar secuencias o regiones probablemente funcionalmente activas o diana. Ejecutar algoritmos

en este segmento, en contraposición al segmento completo, proporciona un conjunto manejable de péptidos para ensayar como candidatos al desarrollo de vacuna. En el pasado, se han ejecutado pruebas informatizadas en la secuencia entera, consumiendo mucho tiempo, dinero y esfuerzo. Los algoritmos buscaban la secuencia aminoacídica que proporcionaba una respuesta inmunitaria característica *in vitro*. Las regiones de las proteínas que se identifica que contienen epítomos puede ser útiles como vacuna.

[0035] A continuación, se efectuó el tratamiento de las células tumorales con el anticuerpo contra la secuencia peptídica identificada. La inducibilidad del recambio alterado y la posterior generación de los péptidos recién identificados solo en las células tumorales y solo en presencia del anticuerpo daba un rasgo selectivo y desencadenable específico que era controlable. Puede procurarse un refuerzo de anticuerpo para aumentar la respuesta de linfocitos T citotóxicos específica de péptido. En casos en que ya existía el anticuerpo, el descubrimiento del péptido solo era suficiente para desencadenar la respuesta inmunitaria específica.

[0036] El procedimiento para generar epítomos nuevos y únicos incluía la identificación de péptidos inmunogénicos de regiones de proteínas y moléculas implicadas en interacciones de unión con la mayoría de ligandos, en particular anticuerpos policlonales y monoclonales. Estos nuevos epítomos se presentaban a células procesadoras de antígeno en presencia de ligando unido. En ciertos casos, la unión protegía al epítomo o una porción del epítomo, revelando la porción inmunogénica del antígeno. Estas regiones inmunogénicas se vuelven dianas nuevas y potenciadas únicamente para el reconocimiento por el sistema inmunitario y para uso en la modulación de respuestas inmunitarias para el tratamiento de estados patológicos e inmunoterapia por sí mismas, como vacunas de anticuerpo o cuando se usan en combinación con anticuerpos. Estos epítomos inmunogénicos generados por anticuerpo (AGIE)/epítomos inmunogénicos unidos a anticuerpos (ABIE) eran útiles para estimular la respuesta inmunitaria en cáncer y enfermedades infecciosas. Pueden suprimir también las respuestas inmunitarias en enfermedades autoinmunitarias y trasplantes basándose en la actividad del anticuerpo en la modulación de la respuesta inmunitaria en la dirección de regulación positiva o regulación negativa.

[0037] Los péptidos de longitud variable incluyendo polipéptidos de unión a antígeno monocatenarios pueden interaccionar específicamente, proteger y/o modular cualquier epítomo dado de tal modo que dé como resultado específicamente la protección y/o potenciación de la conservación y presentación del epítomo cuando se somete a las diversas actividades proteolíticas de la maquinaria de procesamiento de antígeno de las subunidades y complejos de proteosoma e inmunoproteosoma.

[0038] Otra realización de esta invención comprende una combinación de anticuerpos y/o tratamientos específicos con otras moléculas que implican las mismas regiones de las secuencias peptídicas y es selectiva de poblaciones únicas de células. Esta tecnología permite el desarrollo de vacunas novedosas compuestas por anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno Fab o fragmentos F(ab)'₂ unidos a péptidos de longitud específica que contienen un epítomo o epítomos inmunogénicos de interés que se procesan y presentan específicamente.

[0039] Pueden protegerse epítomos específicos de proteínas, tanto intracelulares como extracelulares, que se destruyen normalmente por la maquinaria de procesamiento de antígeno de proteosomas e inmunoproteosomas, por anticuerpos monocatenarios y/o péptidos que pueden unirse específicamente a secuencias de sitio seleccionadas de modo que estos epítomos se vuelvan dianas novedosas que se desarrollan como vacunas únicas para el reconocimiento específico de células cancerosas. Las HSP que se liberan durante los procesos inflamatorios efectúan actividades similares y potencian las respuestas inmunitarias porque se elaboraron para unirse a muchas secuencias peptídicas diferentes no covalentemente.

[0040] El procedimiento de la invención incluye la identificación de péptidos altamente inmunogénicos. Estos péptidos se usan para potenciar o suprimir las respuestas inmunitarias de proteínas celulares normales que no se procesan y presentan naturalmente debido a la destrucción constitutiva de estos epítomos por las actividades normales de los complejos de proteosoma e inmunoproteosoma. Estos péptidos se usan para la generación de anticuerpos específicos que se unen a y generan la presentación novedosa de estos epítomos para reconocimiento por el sistema inmunitario.

[0041] En un ejemplo preferido, están presentes o pueden generarse un gran conjunto de linfocitos T inmunorreactivos que son capaces de reaccionar con estos epítomos inertes/naturalmente no existentes, pero no se utilizan y se consideran "malgastados" porque estos epítomos no se generan normalmente. Esto permite el acceso a conjuntos de linfocitos T no usados para beneficios terapéuticos dirigidos específicamente. De nuevo, se ejecutan algoritmos informatizados. Tras la identificación de las secuencias peptídicas implicadas con la interacción de unión a anticuerpo, se usan estos péptidos para inmunizar animales y/o pacientes para generar anticuerpos específicos

que se unen a la proteína y generan estos péptidos novedosos para reconocimiento y respuesta inmunitaria posteriores.

[0042] En otra realización de la invención, el procedimiento incluye unir un anticuerpo o anticuerpos a las moléculas de proteínas y/o regiones de polipéptido y someter estos complejos unidos y no unidos/nativos *ex vivo* o *in vitro* a todas las formas de la maquinaria de proteosoma. Se obtienen productos de digestión o escisión proteolítica para observar el rendimiento diferencial de los péptidos para uso en el desarrollo de vacunas. Sin embargo, hay un inconveniente en este procedimiento porque no es totalmente representativo de todos los "mecanismos y actividades proteolíticas" que pueden aparecer *in vivo* en la célula misma, limitando así la aplicación. Sin embargo, dicho enfoque es útil para la prueba de concepto en sistemas donde proporciona resultados limpios reproducibles y predecibles, p.ej. usando diversos componentes individuales de proteosomas y combinaciones de los mismos y observando entonces los patrones peptídicos mediante análisis de espectroscopia de masas. También es útil para la definición de patrones peptídicos generados en presencia y/o ausencia de inhibidores de proteosoma con y sin anticuerpo o anticuerpos unidos.

[0043] Otra realización del procedimiento de la presente invención implica la aplicación de este enfoque para la identificación de un tratamiento específico de paciente. Se hacen las elecciones óptimas de anticuerpo para el paciente basándose en los precursores inmunorreactivos preexistentes personales del paciente de AGIE/ABIE. En primer lugar, se obtienen PBMC (células mononucleares de sangre periférica) del paciente y se cultivan en presencia o ausencia de citocinas (p.ej. IL-2, IL-7 e IL-15) en presencia de FCS (suero fetal de ternero) o suero autólogo. Después de un cultivo óptimo y expansión durante un número establecido de días, se ensayan las células en ensayos de citotoxicidad contra líneas celulares tumorales que se han preincubado en presencia y ausencia de anticuerpos o combinaciones de anticuerpos específicos. Se señalan los conjuntos de datos de respuestas en que se observa específicamente la presencia de anticuerpos y aquellos donde los anticuerpos individuales no procuran una respuesta, pero la combinación sí. Se ensayan en los epítomos/péptidos de vacuna predichos o definidos por los sitios de unión de los anticuerpos las reactividades finas en la determinación de cuáles vacunas usar en pacientes.

[0044] Otra realización del procedimiento de la invención incluye identificar antígenos que no se expresan sobre la superficie celular o partes de proteína que son siempre citoplasmáticas o proteínas que son completamente intracelulares/intranucleares o citoplasmáticas (p.ej., p53, telomerasa, etc.). Procedimientos para expresar el anticuerpo o anticuerpos "moduladores" como proteínas endógenas, de modo que sean capaces de unirse a estas proteínas de forma intracelular y modular su procesamiento y presentación en las mismas. Los procedimientos de expresión endógena incluían sistemas de expresión de ADN recombinante así como sistemas de suministro y de expresión de vectores víricos/bacterianos.

[0045] Para "lanzadera", los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno monocatenario pueden estar encapsulados en diversos sistemas de suministro que incluyen liposomas, micelas, nanopartículas y otros.

[0046] La generación de preparaciones de anticuerpo "protectoras" o "supresoras", o una combinación que puede administrarse pasivamente para el tratamiento de una enfermedad de modo similar a las inyecciones de gamma-globulina, se generaron como preparaciones policlonales o como combinaciones específicas de anticuerpos seleccionados contra uno o más antígenos tumorales o específicos de tejido para esa enfermedad o afección particular.

[0047] La presente invención no está restringida a péptidos de HLA-A2 o de clase I porque pueden usarse uno o más péptidos de mayor longitud de una región o secuencia conocida para la generación de AGIE/ABIE por el anticuerpo o anticuerpos en cuestión. El beneficio es no tener que estar restringido solo a tipos de HLA específicos o limitados (clase I y II) en términos de pacientes que pueden tratarse. Además, aunque la mayoría de los péptidos de clase I y clase II derivan del procesamiento de proteínas endógenas y exógenas, respectivamente, los mecanismos bien descritos y aceptados de "presentación cruzada" permiten la presentación de todas las fuentes o péptidos sobre ambas clases de moléculas de MHC.

[0048] En otra realización de la invención, se usa el procedimiento para identificar respuestas de vacuna inducibles mediante el "descubrimiento" de los AMc que generarán AGIE/ABIE. Esto se consigue cribando en primer lugar los decámeros o eicosámeros consecutivos o superpuestos del antígeno de las respuestas de linfocitos T precursoras máximas presentes en individuos con cáncer y/o normales. Estos péptidos "ultraimmunogénicos" se usan entonces para la generación de AMc en ratones. Se ensaya entonces en estos AMc la capacidad de generar respuestas específicas de AGIE/ABIE en dianas tratadas con AMc. Los AMc que son prometedores se humanizan entonces con fines terapéuticos. Para asegurar la implicación de respuestas inmunitarias específicas de linfocitos T,

se usan en primer lugar los fragmentos Fab' prometedores para eliminar la actividad puramente mediada por citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0049] Otro modo de identificar específicamente péptidos capaces de generar anticuerpos que inducen 5 AGIE/ABIE que son los más protectores es mediante el procedimiento de cribado de muestra sérica de individuos con alto riesgo de cáncer (aquellos con historial familiar de cáncer, p.ej. fumadores que tienen y no cáncer de pulmón, pacientes que están "curados") que desarrollan y no cáncer (o de progresores frente a no progresores en el caso del SIDA) para buscar respuestas de Ac contra los péptidos superpuestos de antígenos tumorales bien 10 caracterizados o definidos específicos (HER2/neu, antígeno específico de próstata o PSA, antígeno de membrana específico de próstata o PSMA, tirosinasa, Ag de melanoma, etc.) que están presentes en individuos protegidos o se presentan en pacientes de cáncer totalmente recuperados/curados. Basándose en las respuestas de Ac específicas que se encuentra que están únicamente presentes o predominantemente presentes en los individuos "protegidos", se seleccionan los péptidos para la generación o "descubrimiento" de AMc que generaban AGIE/ABIE. Todas las 15 descripciones en la presente memoria se realizaron para ambas clases I y II de epítomos y respuestas.

[0050] La presente invención proporciona una actividad lítica potenciada de células tumorales tratadas con anticuerpo por vacunas identificadas por los sitios de unión de estos anticuerpos. La presente invención proporciona también una indicación novedosa para anticuerpos ya en uso clínico para el tratamiento del cáncer como terapia de combinación para el desarrollo adicional del descubrimiento del tratamiento de vacuna.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de una región inmunogénica de una autoproteína asociada a tumor para uso en la modulación de la respuesta inmunitaria para el tratamiento del cáncer en combinación con un anticuerpo, que comprende las etapas de:
- 5 identificar una o más secuencias peptídicas de una autoproteína asociada a tumor que están implicadas en la unión al anticuerpo;
someter la una o más secuencias peptídicas a un algoritmo que identifica las secuencias sospechosas de ser inmunogénicas;
- 10 cribar todos los fragmentos peptídicos de una o más secuencias peptídicas; e
identificar un péptido inmunogénico del fragmento de proteína, en el que el péptido inmunogénico es para uso en el tratamiento del cáncer en combinación con el anticuerpo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la unión a anticuerpo comprende la unión a anticuerpo policlonal.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la unión a anticuerpo comprende la unión a anticuerpo monoclonal.
- 20 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la autoproteína es una proteína HER-2/neu.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de identificación de una o más secuencias peptídicas de una autoproteína que están implicadas en la unión a anticuerpo comprende:
- 25 unir un anticuerpo con la autoproteína formando un complejo;
someter el complejo a digestión con proteosoma;
y
obtener los productos de digestión que comprenden una o más secuencias peptídicas.