(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 657 963**

(51) Int. CI.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2009 PCT/DK2009/000095**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO09143843**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 09753556 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2280721**

(54) Título: **Inmunoterapia basada en indolamina 2,3-dioxigenasa**

(30) Prioridad:

17.04.2008 DK 200800565

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2018

(73) Titular/es:

IO BIOTECH APS (100.0%)
c/o COBIS, Ole Maaløes Vej 3
2200 Copenhagen N, DK

(72) Inventor/es:

ANDERSEN, MADS, HALD y
STRATEN, PER, THOR

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

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

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

Inmunoterapia basada en indolamina 2,3-dioxigenasa

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la profilaxis y terapia del cáncer. En particular, se proporcionan fragmentos peptídicos de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que son capaces de provocar respuestas inmunitarias contra el cáncer.

Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario tiene la capacidad de reconocer y destruir las células neoplásicas; sin embargo, a pesar del hecho de que la transformación neoplásica está asociada a la expresión de antígenos inmunogénicos, el sistema inmunitario a menudo no responde de manera eficaz a estos antígenos. El sistema inmunitario obviamente se vuelve tolerante hacia estos antígenos[1]. Cuando esto sucede, las células neoplásicas proliferan de una manera incontrolada, lo que lleva a la formación de cánceres malignos con un mal pronóstico para las personas afectadas. El estado adquirido de tolerancia debe superarse para que la inmunoterapia del cáncer tenga éxito.

La indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es un componente principal en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario que, sin embargo, también contribuye a la tolerancia inducida por el tumor. La expresión y activación de IDO crea un medio tolerogénico en el tumor y en los ganglios linfáticos (GL) que drenan los tumores, ya sea a través de la supresión directa de las células T por degradación del aminoácido esencial triptófano o a través de la mejora de la inmunosupresión local mediada por Treg (células T reguladoras activadas). Con respecto a la primera, algunos de los efectos biológicos de IDO están mediados a través del agotamiento local de triptófano, mientras que otros están mediados a través de metabolitos de triptófano inmunomoduladores[3,4]. Recientemente, se identificó un sistema de señalización sensible a IDO en las células T, que comprende la quinasa de estrés GCN2[5]. La GCN2 responde a las elevaciones en ARNt sin carga, como ocurriría si las células T se privaran de triptófano, y las células T que carecen de GCN2 son resistentes a la supresión mediada por IDO y a la inducción de anergia[6].

Las células tumorales, así como también las células estromales tumorales, pueden expresar IDO dentro del tumor, donde inhibe la fase efectora de las respuestas inmunitarias. Además, las células presentadoras de antígeno (CPA) que expresan IDO están presentes en los ganglios linfáticos que drenan tumores, donde se cree que crean un microambiente tolerogénico. De hecho, las células dendríticas (CD) plasmacitoides $CD19^+$ que expresan IDO, aisladas del ganglio linfático que drena el tumor, actúan como mediadoras en la inmunosupresión profunda y en la anergia de las células T *in vivo* [7,8]; las CD plasmacitoides de los ganglios linfáticos normales y el bazo no expresan IDO. Muy pocas células expresan IDO de manera constitutiva en el tejido linfoide normal excepto en el intestino. Esto implica que las CD en los ganglios linfáticos que drenan tumores, que expresan Ido de manera constitutiva, deben recibir un estímulo que esté relacionado con la presencia del tumor. Se cree que este estímulo es suministrado por células T reguladoras activadas (Tregs) que migran del tumor al ganglio linfático de drenaje. Se ha demostrado que las Tregs inducen IDO a través de la expresión en la superficie celular de CTLA-4 [9]. La inducción de IDO transforma los ganglios linfáticos que drenan tumores desde un medio inmunizante a un medio tolerizante. De hecho, cuando se inyectan *in vivo* CD IDO^+, crean supresión y anergia en células T específicas de antígeno en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de inyección[10]. Además de su expresión en células inmunocompetentes, IDO se expresa con frecuencia en el microambiente tumoral, ya sea en las propias células tumorales o en diferentes células estromales. En este contexto, se cree que IDO inhibe la fase efectora de la respuesta inmunitaria [11,12]. En la clínica, se ha observado varias veces, que la expresión de IDO en células tumorales se asocia a un pronóstico insuficiente[13,14].

Por lo tanto, la expresión de IDO y la inmunosupresión concomitante del cancer inducida por IDO plantea un problema en el tratamiento del cáncer.

Resumen de la invención

La presente invención resuelve el problema de inmunosupresión del cáncer, que se basa en el hallazgo sorprendente de los inventores de respuestas inmunitarias citotóxicas espontáneas contra células que expresan IDO en pacientes con cáncer. Estos hallazgos abren el camino a nuevos enfoques terapéuticos y de diagnóstico que pueden ser generalmente aplicables en el control de las enfermedades del cáncer.

La presente invención se dirige a la enfermedad del cáncer, destruyendo directamente a las células cancerosas que expresan IDO y destruyendo a las CPA/CD inductoras de anergia que expresan IDO. Esto se realiza permitiendo que las células T reconozcan a las células que expresan IDO. Por lo tanto, la expresión de la enzima inmunosupresora IDO en células cancerosas y en CPA es positiva junto con la aplicación del método de la presente invención, que se dirige a estas células que expresan IDO. Este enfoque, especialmente porque conlleva la destrucción de las CPA/CD, va en contra de la opinión común en el campo, donde generalmente se intenta regular por disminución/inhibir a IDO para eliminar el medio tolerizante alrededor de las CPA/CD conservando estas células,

que se consideran necesarias para desencadenar una respuesta inmunitaria eficaz

Además, el hallazgo de respuestas inmunitarias citotóxicas espontáneas contra células que expresan IDO es particularmente sorprendente ya que las células que expresan IDO antagonizan los efectos deseados de otros enfoques inmunoterapéuticos. Por lo tanto, una combinación de inmunoterapias dirigidas a tumores y a IDO resulta ser muy sinérgica.

La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende:

a) un fragmento peptídico inmunogénicamente activo de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO; SEQ ID NO: 1) que consiste en hasta 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6; y
b) un adyuvante

para su uso como medicamento.
La presente invención también proporciona un péptido aislado de hasta 25 restos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

Dicha composición y dicho péptido pueden ser para su uso en un método para el tratamiento o prevención del cáncer, opcionalmente en combinación con un tratamiento adicional contra el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1	Respuestas de células T restringidas a HLA-A2 frente a IDO
Figura 2a	Unión del péptido de control positivo restringido a HLA-A2
Figura 2b	Células T CD8 específicas de IDO5 en CSP (células de sangre periférica) de un paciente con carcinoma de células renales
Figura 2c-f	Análisis tetramérico de células T específicas de IDO5.
Figura 3	Especificidad y capacidad funcional de un clon de células T específico de IDO5
Figura 4	Histogramas que muestran tinciones de IDO intracelular
Figura 5	Capacidad funcional de un clon de células T específico de IDO5 (RBS35) para destruir líneas celulares de cáncer de mama tratadas con IFN-γ
Figura 6	Capacidad funcional de un clon de células T específico de IDO5 (RBS35) para destruir CD (células dendríticas)
Figura 7	Especificidad y capacidad funcional de las células T específicas de IDO5 analizadas mediante análisis de liberación de ^{51}Cr
Figura 8	Alineación múltiple de secuencias IDO, IDOA, IDOB e IDOC
Figura 9	Alineamiento por pares de IDO e IDOLIKE

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende un fragmento polipeptídico inmunológicamente activo de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) para su uso como medicamento en la prevención, reducción del riesgo o tratamiento del cáncer.

Definiciones

Adyuvante: Cualquier sustancia cuya mezcla administrada con un determinante inmunogénico / antígeno / construcción de ácido nucleico aumenta o modifica de otro modo la respuesta inmunitaria de dicho determinante.
Aminoácido: cualquier ácido amino carboxílico sintético o de origen natural, incluyendo cualquier aminoácido que se produce en péptidos y polipéptidos incluyendo proteínas y enzimas sintetizadas *in vivo* incluyendo por tanto modificaciones de los aminoácidos. El término aminoácido se utiliza en este documento como sinónimo de la expresión "resto de aminoácido" que se entiende que incluye aminoácidos como se ha indicado, que se han hecho reaccionar con al menos uno de otra especie, tal como de 2, por ejemplo de 3, tal como de más de 3 especies distintas. El término genérico aminoácido comprende aminoácidos tanto naturales como no naturales, pudiendo estar cualquiera de ellos en una forma "D" o "L" isómera.
Anticuerpo: moléculas de inmunoglobulina y partes activas de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos son, por ejemplo, moléculas de inmunoglobulina intactas o fragmentos de las mismas, que conservan la actividad inmunológica.
Antígeno: cualquier sustancia que pueda unirse a un receptor inmunitario distribuido clonalmente (receptor de células T o de células B). Usualmente un péptido, polipéptido o un polipéptido multimérico. Los antígenos son preferentemente capaces de provocar una respuesta inmunitaria.
CPA: célula presentadora de antígeno. Una CPA es una célula que muestra un antígeno extraño formando complejo con el complejo principal de histocompatibilidad MHC (*major histocompatibility complex*) en su superficie. Las células T pueden reconocer a este complejo utilizando su receptor de células T (RCT). Las CPA se dividen en dos categorías: profesionales (de las cuales existen tres tipos: células dendríticas, macrófagos y

células B) o no profesionales (no expresan de manera constitutiva las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad requeridas para la interacción con células T vírgenes; se expresan solo después de la estimulación de las CPA no profesionales por determinada citocinas tales como IFN-γ).

Refuerzo: Reforzar mediante una dosis o inyección de refuerzo es administrar una dosis adicional de un agente inmunizante, tal como una vacuna, administrada en un momento posterior a la dosis inicial para mantener la respuesta inmunitaria provocada por la dosis previa del mismo agente.

Cáncer: En el presente documento, cualquier enfermedad pre neoplásica o neoplásica, benigna o maligna, refiriéndose el término "neoplásica" a una proliferación anómala de células.

Portador: Entidad o compuesto a la cual/al cual se acoplan los antígenos para ayudar en la inducción de una respuesta inmunitaria.

Proteína quimérica: proteína modificada por ingeniería genética, que está codificada por una secuencia de nucleótidos formada por un corte y empalme de dos o más genes completos o parciales o una serie de ácidos nucleicos (no) al azar.

Afección clínica: una afección que requiere atención médica, en este caso especialmente las afecciones asociadas con la expresión de IDO. Como ejemplos de dichas afecciones se incluyen: cánceres e infecciones.

Complemento: una serie compleja de proteínas sanguíneas cuya acción "complementa" el trabajo de los anticuerpos. El complemento destruye bacterias, produce inflamación y regula las reacciones inmunológicas.

LTC: linfocito T citotóxico. Un subgrupo de células T que expresan CD8 junto con el receptor de células T y, por lo tanto, pueden responder a antígenos presentados por moléculas de clase I.

Citocina: Modulador de crecimiento o diferenciación, utilizado no determinante en este documento, y no debe limitar la interpretación de la presente invención y las reivindicaciones. Además de las citocinas, las moléculas de adhesión o accesorias, o cualquier combinación de las mismas, se pueden emplear solas o en combinación con las citocinas.

Vehículo de suministro: una entidad mediante la cual una secuencia de nucleótidos o polipéptido o ambos pueden transportarse desde al menos un medio a otro.

CD: célula dendrítica. Las CD son células inmunitarias y forman parte del sistema inmunitario de los mamíferos. Su función principal es procesar material antigénico y presentarlo en la superficie a otras células del sistema inmunitario, funcionando así como células presentadoras de antígeno (CPA).

Fragmento: se utiliza para indicar una parte de longitud no completa de un ácido nucleico o polipéptido. Por lo tanto, un fragmento es en sí mismo también un ácido nucleico o polipéptido, respectivamente.

Homólogo funcional: un homólogo funcional puede ser cualquier ácido nucleico / proteína / polipéptido que exhibe al menos alguna identidad de secuencia con una versión / secuencia de tipo silvestre de un gen / producto génico / proteína / polipéptido dado y que ha conservado al menos un aspecto de la funcionalidad de las secuencias originales. En este caso, un homólogo funcional de IDO tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria a células que expresan IDO.

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa. Identificada en las SEQ ID NO: (1, 13, 14, 15 y 16).

Individuo: generalmente cualquier especie o subespecie de ave, mamífero, pez, anfibio o reptil, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

Infección: en el presente documento, el término "infección" se refiere a cualquier tipo de afección clínica que da lugar a una respuesta inmunitaria y, por lo tanto, incluye infecciones, infecciones crónicas, afecciones autoinmunitarias e inflamaciones alérgicas.

Aislado: utilizado en relación con ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos descritos en la presente memoria "aislado" se refiere a que estos se han identificado y separado y / o recuperado de un componente de su entorno natural, típicamente celular. Los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos de la invención se aíslan preferentemente, y las vacunas y otras composiciones de la invención preferentemente comprenden ácidos nucleicos aislados, polipéptidos o anticuerpos aislados.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad, existen dos subclases principales del MHC, la Clase I y la Clase II.

Ácido nucleico: una cadena o secuencia de nucleótidos que lleva información genética. Con respecto a la presente invención, el ácido nucleico es un ácido desoxirribonucleico (ADN).

Construcción de ácido nucleico: un ácido nucleico modificado por ingeniería genética. Normalmente comprende varios elementos tales como genes o fragmentos de los mismos, promotores, potenciadores, terminadores, colas poliA, enlazadores, polienlazadores, enlazadores operativos, sitios de clonación múltiple (SCM), marcadores, codones de terminación (STOP), otros elementos reguladores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Sites*) u otros elementos.

Enlazador operativo: una secuencia de nucleótidos o restos de aminoácidos que unen entre sí dos partes de una construcción de ácido nucleico o polipéptido (quimérico) de una manera que asegura el procesamiento biológico del ácido nucleico o polipéptido.

Patógeno: un agente causante específico de enfermedad, especialmente un agente biológico tal como un virus, bacteria, prión o parásito que puede causar enfermedad a su hospedador, también conocido como agente infeccioso.

CSP: las células de sangre periférica son los componentes celulares de la sangre, que consisten en glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, que se encuentran en el conjunto de sangre circulante y que no están secuestradas en el sistema linfático, el bazo, el hígado o la médula ósea.

CMSP: una célula mononuclear de sangre periférica (CMSP) es una célula sanguínea que tiene un núcleo redondo, tal como un linfocito o un monocito. Estas células sanguíneas son un componente crítico en el sistema

inmunitario para combatir las infecciones y adaptarse a los intrusos. La población de linfocitos consiste en células T (positivas para CD4 y CD8 ~ 75%), células B y células NK (~25% combinadas).

Péptido: Pluralidad de restos de aminoácidos ligados por enlace covalente que definen una secuencia y se ligan por enlaces amida. El término se utiliza de manera análoga a oligopéptido y polipéptido. Los aminoácidos naturales y / o no naturales pueden estar ligados por enlaces peptídicos o por enlaces no peptídicos. El término péptido también abarca modificaciones postraduccionales introducidas por reacciones químicas o catalizadas por enzimas, como se conoce en la técnica. El término puede referirse a una variante o fragmento de un polipéptido.

Los vehículos farmacéuticos: también denominados excipientes, o estabilizantes, no son tóxicos para la célula o el individuo que se expone a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada con pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y / o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Pluralidad: al menos dos.

Promotor: un sitio de unión en una cadena de ADN al que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción del ARN mensajero por uno o más genes estructurales cercanos.

Péptido señal: una secuencia corta de aminoácidos que determina la ubicación final de una proteína en la célula, también conocida como péptido de clasificación.

Tensioactivo: un agente activo de superficie capaz de reducir la tensión superficial de un líquido en el que se disuelve. Un tensioactivo es un compuesto que contiene un grupo polar que es hidrófilo y un grupo no polar que es hidrófobo y a menudo está compuesto de una cadena grasa.

Treg: linfocitos T reguladores / linfocitos T

Vacuna: Una sustancia o composición capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal. También se conoce como una composición inmunogénica en el presente texto. Una respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria (humoral / de anticuerpo y / o celular) que induce memoria en un organismo, dando como resultado el agente infeccioso, encontrándose con una respuesta secundaria en lugar de primaria, reduciendo así su impacto sobre el organismo hospedador. Una vacuna de la presente invención se puede administrar como medicamento profiláctico y/o terapéutico. La composición puede comprender uno o más de los siguientes: antígeno(s), construcciones de ácido nucleico, que comprenden uno o más antígenos ligados operativamente a portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticos.

Variante: una "variante" de un ácido nucleico o polipéptido de referencia determinado, se refiere a un ácido nucleico o polipéptido que muestra un cierto grado de homología / identidad de secuencia con dicho ácido nucleico o polipéptido de referencia, pero que no es idéntico a dicho ácido nucleico o polipéptido de referencia.

Indolamina 2,3-dioxigenasa

La indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es una enzima que cataliza la conversión de L-triptófano en N-formilquinurenina y, por lo tanto, es la primera enzima y limitante de la tasa del catabolismo del triptófano a través de la ruta de la quinurenina. El catabolismo del triptófano causa un agotamiento del triptófano que suprime las respuestas de las células T y promueve la inmunotolerancia en el embarazo de mamíferos, la resistencia tumoral, la infección crónica, la autoinmunidad y la inflamación alérgica. Por lo tanto, no solo el cáncer, sino las infecciones en general y las infecciones, especialmente las infecciones crónicas, en particular, la autoinmunidad y las inflamaciones alérgicas son todas las afecciones clínicas relevantes de la presente invención.

La IDO está presente en seres humanos en cinco formas: IDO, IDOA, IDOB, IDOC e IDOLIKE (también conocida en la bibliografía como IDO2). IDO es un polipéptido de 403 restos de aminoácidos de longitud, como se desvela en la SEQ ID NO: 1, y es la IDO preferida en el presente texto junto con la IDOLIKE de SEQ ID NO: 16). Las otras IDO también son relevantes para la presente invención, aunque se sabe poco sobre ellas; en el presente documento se identifican como IDOA: SEQ ID NO: 13, IDOB: SEQ ID NO: 14, e IDOC: SEQ ID NO 15. IDOLIKE no se expresa tan ampliamente como IDO, pero al igual que su pariente también se expresa en células dendríticas presentadoras de antígeno donde el catabolismo del triptófano conduce la inmunotolerancia. Al igual que IDO, IDOLIKE cataboliza el triptófano, desencadena la fosforilación del factor de iniciación de la traducción, eIF2alfa y moviliza la traducción del LIP, una isoforma inhibidora del factor de transcripción inmunoregulador NF-IL6 (Popov y Schultze, 2008). En el presente documento, el término IDO generalmente se refiere a todas las IDO anteriormente mencionadas y sus secuencias correspondientes.

La IDO se ha sido identifica como una importante molécula reguladora del sistema inmunitario, que es parte de varios mecanismos de retroalimentación negativa mediante los cuales las respuestas inmunitarias se mantienen bajo control. De esta manera, la IDO también ejerce una función inmunosupresora crítica en el cáncer. En el estudio que subyace a la presente invención, se examinó si la propia IDO podía servir como diana para las respuestas inmunitarias, que puede aprovecharse para la terapia inmunitaria, particularmente para el tratamiento del cáncer. Siguiendo un enfoque de "inmunología inversa", se identificaron péptidos HLA-A2 dentro de la proteína IDO

en los que se detectó reactividad espontánea de células T en pacientes que padecían tipos de tumores no relacionados, es decir, melanoma, carcinoma de células renales y cáncer de mama. Estas respuestas de células T de origen natural se visualizaron fácilmente mediante citometría de flujo utilizando tetrámeros de HLA / péptido después de la estimulación *in vitro*, pero también en análisis directos realizados *ex vivo*. Además, se confirmó de forma inequívoca que las células T reactivas a IDO son, de hecho, células efectoras citotóxicas específicas de péptido. En otras palabras: las células T específicas de IDO causan, de un modo eficaz, la lisis de líneas celulares de cáncer IDO+ de diferente origen, tales como de melanoma, carcinoma de colon, cáncer de mama así como directamente de blastos de LMA (leucemia mieloide aguda) enriquecidos directamente *ex vivo*. La presencia de respuestas de LTC espontáneas contra epítopos peptídicos derivados de IDO en CSP de pacientes que padecen tipos de cánceres no relacionados, así como la destrucción de células cancerosas de diferente origen por células T específicas de IDO, ponen de manifiesto el potencial inmunoterapéutico de IDO. Aún más característico es el descubrimiento de que los LTC específicos de IDO reconocen y destruyen CD IDO+ maduras; por lo tanto, las células T específicas de IDO pueden destruir CD inmunocompetentes. Informes recientes han demostrado que IDO se regula por aumento en CD humanas después de la maduración[23,24]. Además, la expresión de IDO también se observa en CD destinadas a la vacunación en pacientes con cáncer y la expresión se mantiene *in situ* después de inyección s.c. (subcutánea)[25]. La expresión de IDO en vacunas terapéuticas basadas en CD posee relevancia clínica crítica a través de la atracción o inducción de Tregs FoxP3(+).

Las dobles funciones para la inhibición de IDO tanto de la fase inicial como de las fases efectoras de la respuesta inmunitaria, no son mutuamente excluyentes; de hecho, es probable que ambas actúen en un tumor determinado. Existe una función adicional por la cual IDO puede ser muy relevante para el resultado de la inmunoterapia del cáncer: como un mecanismo contrarregulador inducido por inflamación. Las respuestas contrarreguladoras son importantes en el sistema inmunitario, ya que ayudan a limitar la intensidad y el alcance de las respuestas inmunitarias, que de lo contrario podrían causar daños peligrosos al hospedador. Sin embargo, con respecto a la inmunoterapia contra el cáncer, las respuestas contrarreguladoras antagonizan la capacidad de crear una respuesta inmunitaria intensa contra el tumor. La contrarregulación difiere de la tolerancia en el sentido de que la contrarregulación es un acontecimiento secundario, provocado solo en respuesta a la activación inmunitaria[26,27]. En particular, es aquí donde se demuestra que la susceptibilidad de las células tumorales a la destrucción por las células T reactivas a IDO, aumenta por la preincubación con IFN-γ. Del mismo modo, se ha informado que el ligamiento sistémico de la molécula coestimuladora 4-1BB (CD137) induce la IDO[28]. Por definición, la mayoría de las estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer, independientemente de sus dianas moleculares, apuntan a la inducción de una activación inmunológica e inflamación (por ejemplo, en el sitio de una vacuna o dentro del tumor). Prácticamente, dentro de los límites de toxicidad aceptable, el objetivo es la mayor activación inmunitaria posible; por lo tanto, la contrarregulación no es la opción deseada. En este sentido, tanto en pacientes con melanoma como en pacientes con carcinoma de células renales tratados con bloqueo de CTLA-4, es decir anticuerpos dirigidos contra CTLA-4, se ha informado una asociación entre enterocolitis y regresión tumoral[29]. Por lo tanto, las reacciones autoinmunitarias se correlacionan claramente con la eficacia clínica[30,31]. Se cree que el bloqueo de CTLA-4 actúa como mediador en sus efectos antitumorales e inductores de IRAE al reducir la tolerancia periférica a autoantígenos y el aumento de la activación de las células T al inhibir la función de Tregs.

Dado que las células que expresan IDO antagonizan los efectos deseados de otros enfoques inmunoterapéuticos, dirigiéndose a células que expresan IDO, por ejemplo, mediante vacunación, transferencia de células T adoptivas o agentes inmunoestimuladores, todos los cuales son aspectos de la presente invención, en consecuencia son muy sinérgicos en acción con inmunoterapia contra el cáncer En la presente descripción, se demuestra que los epítopos de IDO definidos por LTC son ampliamente aplicables en vacunaciones terapéuticas y, por lo tanto, tienen un valor inmunoterapéutico sustancial.

Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención proporcionar una composición de vacuna que comprende un fragmento polipeptídico inmunológicamente activo de IDO para su uso como un medicamento para prevenir, reducir el riesgo de o tratar el cáncer. Otro aspecto se refiere al uso de la composición de vacuna de la presente invención en combinación con otros medicamentos tales como medicamentos inmunoterapéuticos y/o agentes quimioterapéuticos. En el presente documento también se describe el uso de dicha composición de vacuna para el tratamiento de enfermedades de origen vírico y/o microbiano y además el uso de dicha vacuna en combinación con otros medicamentos, tales como medicamentos inmunoterapéuticos y/o antibióticos y/o agentes antivíricos.

Secuencias

La IDO humana de tipo silvestre, es decir, la versión no mutada de la proteína que se produce de forma natural, se identifica en la SEQ ID NO: 1. La presente invención incluye composiciones de vacuna que comprenden fragmentos peptídicos inmunológicamente activos de IDO. La expresión fragmento polipeptídico se utiliza en el presente documento para definir cualquier cadena de restos de aminoácidos no completa (en comparación con la SEQ ID NO: 1) que deriva directamente de IDO, o se sintetiza para ser idéntica a IDO, tal como se identifica en la SEQ ID NO: 1.

Un fragmento peptídico inmunogénicamente activo puede consistir en 50 restos de aminoácidos, por ejemplo a lo sumo 45 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 40 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 35 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 30 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 25 restos de aminoácidos, tal

como de 18 a 25 aminoácidos consecutivos de IDO como se identifica en SEQ ID NO: 1.

Un fragmento peptídico inmunogénicamente activo puede consistir a lo sumo en 25 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 24 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 23 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 22 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 21 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 20 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 19 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 18 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 17 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 16 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 15 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 14 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 13 restos de aminoácidos, tal como a lo sumo 12 restos de aminoácidos, por ejemplo, a lo sumo 11 aminoácidos consecutivos de IDO de SEQ ID no 1.

Algunos péptidos descritos en el presente documento son nonapéptidos (péptidos que comprenden 9 restos de aminoácidos), y algunos son decapéptidos (que comprenden 10 restos) y estos pueden seleccionarse del grupo no limitante de (primero el nombre del primer, después la secuencia, puesta en secuencia de IDO y SEQ ID NO.): IDO1: QLR E R V E K L (54-62) (SEQ ID NO: 2); IDO2: F L V S L L E E (164-172) (SEQ ID NO: 3); IDO3: T L L K A L L E I (195-203) (SEQ ID NO: 4); IDO4: F I A K H L P D L (41 - 49) (SEQ ID NO: 5); IDO5: A L L E I A S C L (199-207) (SEQ ID NO: 6); IDO6: V L S K G D A G L (320-328) (SEQ ID NO: 7); IDO7: D L M N F L K T V (383-391) (SEQ ID NO: 8); IDO8: VLLGIQQTA (275-283) (SEC ID NO: 9); IDO9: K V L P R N I A V (101-109) (SEQ ID NO: 10); IDO10: K L N M L S I D H L (61-70) (SEQ ID NO: 11); IDO11: S L R S Y H L Q I V (341-350) (SEQ ID NO: 12). Preferentemente, el péptido de la presente invención es IDO5: A L L E I A S C L (199-207) (SEQ ID NO: 6); IDO2: F L V S L L V E I (164-172) (SEQ ID NO: 3); y/o IDO6: V L S K G D A G L (320-328) (SEQ ID NO: 7). Más preferentemente, la composición de vacuna de la presente invención comprende al menos un péptido de IDO5: A L L E I A S C L (199-207) (SEQ ID NO: 6).

Otros péptidos descritos en el presente documento comprenden (o más preferentemente consisten en) entre 4 y 120, preferentemente entre 8 y 100, más preferentemente entre 10 y 75, aún más preferentemente entre 12 y 60, incluso más preferentemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de IDO de SEQ ID NO: 1

MHC

Hay dos tipos de moléculas MHC; las moléculas MHC de clase I y las moléculas MHC de clase II. Las moléculas MHC de clase I son reconocidas por las células T CD8, que son las principales células efectoras de la respuesta inmunoadaptativa. Las moléculas MHC de clase II se expresan principalmente en la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA), siendo las células dendríticas las que parecen ser las más importantes. Las CPA estimulan a células T vírgenes, así como a otras células del sistema inmunitario. Estimulan a células T tanto CD8 como CD4.

En el presente documento se desvelan nuevos fragmentos peptídicos restringidos al MHC de Clase I que consisten en 8-10 aminoácidos de IDO de SEQ ID NO: 1, que se caracterizan por tener al menos una de las diversas características, siendo una de ellas capaz de unirse a la molécula HLA de Clase I a la que está restringida con una afinidad medida por la cantidad de péptido que es capaz de recuperar la máxima mitad de la molécula HLA de Clase I (valor C_{50}) que es a lo sumo de 50 µM, como lo determina el ensayo de unión de ensamblaje descrito en este documento. Este ensayo de ensamblaje se basa en la estabilización de la molécula HLA después de cargar el péptido en la línea celular T2 carente de portador peptídico. Posteriormente, las cadenas pesadas de HLA estables, correctamente plegadas, se inmunoprecipitan utilizando anticuerpos dependientes de conformación y se cuantifica la unión del péptido. Los péptidos de esta realización comprenden (o más preferentemente consisten en) a lo sumo 200, preferentemente a lo sumo 100, más preferentemente a lo sumo 50, aún más preferentemente a lo sumo 25, incluso más preferentemente a lo sumo 20, pero aún más preferentemente a lo sumo 15, tal como a lo sumo 10, por ejemplo, en el intervalo de 8 a 10 aminoácidos contiguos de IDO de SEQ ID NO.

Este ensayo proporciona un medio sencillo de exploración de péptidos candidatos con respecto a su capacidad para unirse a una molécula de alelo HLA determinada con la afinidad anterior. En realizaciones preferidas, el fragmento peptídico de la invención es uno que tiene un valor de C_{50} que es a lo sumo de 30 µM, tal como un valor de C_{50} que es a lo sumo de 20 µM, incluyendo valores de C_{50} de a lo sumo 10 µM, a lo sumo 5 µM y a lo sumo 2 µM.

También se desvelan nuevos fragmentos peptídicos restringidos a MHC de Clase II de IDO de SEQ ID NO 1, (denominados también en el presente documento "péptidos"), que se caracterizan por tener al menos una de las diversas características descritas a continuación en este documento. Los péptidos de esta realización comprenden (o más preferentemente consisten en) entre 4 y 120, preferentemente entre 8 y 100, más preferentemente entre 10 y 75, aún más preferentemente entre 12 y 60, incluso más preferentemente entre 15 y 40, tal como entre 18 y 25 aminoácidos contiguos de IDO de SEQ ID NO 1.

Por lo tanto, en el presente documento se desvelan nuevos fragmentos peptídicos restringidos a MHC de Clase I, de 8-10 aminoácidos o nuevos fragmentos peptídicos restringidos a MHC de Clase II, de 18-25 aminoácidos de IDO de SEQ ID NO 1, que se caracterizan por tener al menos una de las diversas características descritas a continuación, siendo una de ellas la capacidad de unirse a la molécula HLA de Clase I o de Clase II a la que está restringida.

En realizaciones particulares desveladas en el presente documento, se proporciona un fragmento peptídico, que es un péptido restringido por MHC de Clase I o un péptido restringido por MHC de Clase II que tiene al menos una de las siguientes características:

(i) tiene la capacidad de provocar células productoras de INF-γ en una población de CSP de un paciente con cáncer a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 CSP, según lo determinado por un ensayo ELISPOT, y/o
(ii) tiene la capacidad de detectar *in situ,* en un tejido tumoral, los LTC que son reactivos con el péptido epitópico.
(iii) tiene la capacidad de inducir el crecimiento *in vitro* de células T específicas de IDO.

Los péptidos más preferidos de acuerdo con la presente invención son péptidos capaces de generar una respuesta de células T específica, determinada mediante un ensayo ELISPOT, por ejemplo, el ensayo ELISPOT descrito más adelante en el Ejemplo 1. Aunque algunos péptidos no se unen al MHC de clase I o de clase II con alta afinidad, todavía pueden generar una respuesta de células T según determinado por ensayo ELISPOT. Otros péptidos capaces de unirse al MHC de clase I o de clase II con alta afinidad, también generan una respuesta de células T según determinado por ensayo ELISPOT. Ambos tipos de péptidos son péptidos preferidos.

Por lo tanto, los péptidos preferidos son péptidos capaces de generar una respuesta de células T específica, medida por un ensayo ELISPOT, en el que se miden más de 50 puntos específicos de péptido por 10^8 células, más preferentemente por 10^7, incluso más preferentemente por 10^6, aún más preferentemente por 10^5 células, tal como por 10^4 células.

Los péptidos más preferidos son péptidos que son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria celular en un individuo que padece una afección clínica caracterizada por la expresión de IDO, siendo la afección clínica preferentemente un cáncer o una infección, y lo más preferentemente un cáncer.

Como se describió anteriormente, el sistema HLA representa el sistema de histocompatibilidad principal humano (MHC). En general, los sistemas de MHC controlan una serie de características: antígenos contra trasplante, respuestas inmunitarias dependientes del timo, ciertos factores del complemento y predisposición a determinadas enfermedades. Más específicamente, el MHC codifica tres tipos diferentes de moléculas, es decir, moléculas de Clase I, II y III, que determinan las características más generales del MHC. De estas moléculas, las moléculas de Clase I son las denominadas moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C que se presentan en la superficie de la mayoría de las células nucleadas y trombocitos.

Los péptidos desvelados en la presente invención se caracterizan por su capacidad de unirse a (estar restringidos por) una molécula de HLA de Clase I particular. Por lo tanto, en una realización, el péptido es uno que está restringido por una molécula HLA-A de MHC de Clase I que incluye HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A9, HLA-A10, HLA-A11, HLA-Aw19, HLA-A23 (9), HLA-A24 (9), HLA-A25 (10), HLA-A26 (10), HLA-A28, HLA-A29 (w19), HLA-A30 (w19), HLA-A31 (w19), HLA-A32 (w19), HLA-Aw33 (w19), HLA-Aw34 (10), HLA-Aw36, HLA-Aw43, HLA-Aw66 (10), HLA-Aw68 (28), HLA-A69 (28). En la bibliografía también se utilizan las nomenclaturas más sencillas, donde solo se utiliza la nomenclatura numérica primaria, por ejemplo, HLA-A19 o HLA-A24 en lugar de HLA-Aw19 y HLA-A24 (49), respectivamente. En realizaciones específicas, el péptido está restringido a una especie de HLA de MHC de Clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 y HLA-A24. En una realización específica, el péptido está restringido a la especie HLA-A2 o HLA-A3 de HLA de MHC de Clase I.

En realizaciones útiles adicionales, el péptido está restringido por una molécula HLA-B de MHC de Clase I que incluye cualquiera de las siguientes: HLA-B5, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B12, HLA- B13, HLA-B14, HLA-B15, HLA-B16, HLA-B17, HLA-B18, HLA-B21, HLA-Bw22, HLA-B27, HLA-B35, HLA-B37, HLA-B38, HLA-B39, HLA-B40, HLA-Bw41, HLA-Bw42, HLA-B44, HLA-B45, HLA-Bw46 y HLA-Bw47. En realizaciones específicas, la especie HLA-B del MHC de Clase I a la que se puede unir el péptido se selecciona de HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA -B27 y HLA-B51.

En realizaciones útiles adicionales, el péptido está restringido por una molécula HLA-C de MHC de Clase I que incluye, pero no se limita a, cualquiera de las siguientes: HLA-Cw1, HLA-Cw2, HLA-Cw3, HLA- Cw4, HLA-Cw5, HLA-Cw6, HLA-Cw7 y HLA-Cw1.

En realizaciones útiles adicionales, el péptido de la invención está restringido por una molécula HLA de MHC de Clase II que incluye, pero no se limita a, cualquiera de las siguientes: HLA-DPA-1, HLA-DPB-1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB y todos los alelos en estos grupos y HLA-DM, HLA-DO.

La selección de péptidos que tienen potencialmente la capacidad de unirse a una molécula de HLA particular, puede realizarse mediante la alineación de secuencias conocidas que se unen a una molécula de HLA particular determinada, para revelar así el predominio de algunos aminoácidos relacionados en posiciones particulares en los péptidos. Dichos restos de aminoácidos predominantes también se denominan en la presente memoria "restos de anclaje" o "motivos de restos de anclaje". Siguiendo dicho procedimiento relativamente sencillo basado en datos de secuencia conocidos que se pueden encontrar en bases de datos accesibles, pueden obtenerse péptidos de IDO, que probablemente se unen a una molécula de HLA específica. En la siguiente tabla se ofrecen ejemplos

representativos de dichos análisis para una serie de moléculas de HLA:

Tabla 2

Alelo de HLA	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 5	Posición 6	Posición 7	C-terminal
HLA-A1		T,S	D,E			L	Y
HLA-A2		L, M			V		L,V
HLA-A3		L,V,M	F,Y				K, Y, F
HLA-A11		V,I,F,Y	M,L,F,Y,I				K, R
HLA-A23		I,Y					W,I
HLA-A24		Y		I,V	F		I,L,F
HLA-A25		M,A,T	I				W
HLA-A26	E,D	V,T,I,L,F			I,L,V		Y,F
HLA-A28	E,D	V,A,L					A,R
HLA-A29		E					Y,L
HLA-A30		Y,L,F,V					Y
HLA-A31			L,M,F,Y				R
HLA-A32		I,L					W
HLA-A33		Y,I,L,V					R
HLA-A34		V,L					R
HLA-A66	E,D	T,V					R,K
HLA-A68	E,D	T,V					R,K
HLA-A69		V,T,A					V,L
HLA-A74		T					V,L
HLA-B5		A,P	F,Y				I,L
HLA-B7	*	P					L,F
HLA-B8			K	K,R			L
HLA-B14		R,K					L,V
HLA-B15 (B62)		Q,L,K,P, H,V,I,M, S ,T					F,Y,W
HLA-B17							L,V
HLA-B27		R					Y, K,F,L
HLA-B35		P					I, L, M, Y
HLA-B37		D,E					I,L,M
HLA-B38		H	D,E				F,L
HLA-B39		R,H					L,F
HLA-B40		E	F,I,V				L,V,A,W, M,T,
(B60,61)							R
HLA-B42		L,P					Y,L
HLA-B44		E					F,Y,W
HLA-B46		M,I,L,V					Y,
HLA-B48		Q,K					L
HLA-B51		A,P,G					F,Y,I,V
HLA-B52		Q	F,Y				I,V
HLA-B53		P					W,F,L
HLA-B54		P					
HLA-B55		P					A,V
HLA-B56		P					A,V
HLA-B57		A,T,S					F,W,Y
HLA-B58		A,T,S					F,W,Y
HLA-B67		P					L

Alelo de HLA	Posición 1	Posición 2	Posición 3	Posición 5	Posición 6	Posición 7	C-terminal
HLA-B73		R					P
HLA-Cw1		A,L					L
HLA-Cw2		A,L					F,Y
HLA-Cw3		A,L					L,M
HLA-Cw4		Y,P,F					L,M,F,Y
HLA-Cw6							L,I,V,Y
HLA-Cw6		Y					L,Y,F
HLA-Cw8		Y					L,I,
HLA-Cw16		A,L					L,V
* En una realización no hay resto de anclaje específico para esta posición, sin embargo, en una realización preferida, el resto de anclaje es R o A.							

Por lo tanto, como ejemplo, los nonapéptidos que posiblemente tienen la capacidad de unirse a HLA-A3 tendrían una de las siguientes secuencias: Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K, Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa -Xaa-Xaa-Y; Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xa o Xaa-V-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K (indicando Xaa cualquier resto de aminoácido). De manera similar, se pueden diseñar secuencias que posiblemente tengan la capacidad de unirse a cualquier otra molécula de HLA. Se apreciará que el experto en la técnica podrá identificar "motivos de restos de anclaje" adicionales para una molécula de HLA determinada.

El péptido puede tener una secuencia que sea una secuencia nativa de la IDO de la que se obtiene. Sin embargo, los péptidos que tienen una afinidad más alta por cualquier molécula de HLA determinada, pueden obtenerse de dicha secuencia nativa modificando la secuencia, sustituyendo, delecionando o añadiendo al menos un resto de aminoácido, por ejemplo, en base al procedimiento descrito anteriormente, mediante el cual se identifican los motivos de restos de anclaje con respecto a la molécula de HLA determinada.

Por lo tanto, en realizaciones útiles, los polipéptidos desvelados incluyen péptidos, cuyas secuencias comprenden, para cada uno de los alelos HLA específicos enumerados en la tabla, cualquiera de los restos de aminoácidos como se indica en la tabla.

Por lo tanto, los péptidos pueden ser cualquiera de los péptidos mencionados anteriormente que comprenden secuencias contiguas de IDO, en donde en el intervalo de 1 a 10, preferentemente en el intervalo de 1 a 5, más preferentemente en el intervalo de 1 a 3, incluso más preferentemente en el intervalo de 1 a 2, aún más preferentemente 1 aminoácido, se ha intercambiado por otro aminoácido, preferentemente de manera que el péptido comprenda uno o más, preferentemente todos los restos de anclaje de un péptido específico de HLA-A determinado como se indica en la tabla anterior.

Como ejemplos de especies de HLA preferentes se incluyen aquellas cuyos péptidos preferidos están restringidos que incluyen: una especie de HLA de MHC de Clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11 y HLA-A24, más preferentemente, el péptido está restringido por HLA-A3 o HLA-A2. Como alternativa, una especie de HLA preferida incluye una especie de HLA-B del MHC de Clase I seleccionada del grupo que consiste en HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-B8, HLA-B15, HLA-B27 y HLA-B51.

Un enfoque para identificar polipéptidos incluye las siguientes etapas: seleccionar una molécula de HLA particular, por ejemplo, una que se produzca a una velocidad elevada en una población determinada, llevando a cabo un análisis de alineamiento como se describió anteriormente para identificar "motivos de restos de anclaje" en la proteína IDO, aislar o construir péptidos de un tamaño adecuado que comprendan uno o más de los restos de anclaje identificados y someter a ensayo los péptidos resultantes para determinar la capacidad de los péptidos de provocar células productoras de INF-γ en una población de células de sangre periférica, CSP, de un paciente con cáncer, a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 CSP, como se determina mediante un ensayo ELISPOT como se describe en el Ejemplo 1.

En un aspecto, se proporcionan péptidos derivados de IDO de más de 8 a 10 restos de aminoácidos. Los polipéptidos de más de 8 a 10 aminoácidos son procesados por el proteasoma a una longitud más corta para unirse a las moléculas de HLA. De este modo, cuando se administra un polipéptido de más de 8 a 10 restos de aminoácidos de longitud, el polipéptido / proteína / fragmento de proteína / variante "largo" de IDO se procesa en una serie de péptidos más pequeños en el citosol por el proteasoma. Una ventaja de utilizar un polipéptido más largo que puede ser procesado por el proteasoma en una variedad de diferentes péptidos más cortos es que se pueden dirigir más clases de HLA con un péptido que con un péptido de 8 a 10 aminoácidos que se restringe a una clase de HLA particular.

Sorprendentemente, algunos de los péptidos desvelados en el presente documento se unen a moléculas de MHC con una afinidad suficientemente alta para hacer innecesarias las sustituciones (véase la figura 2) y están listos para su uso como antígenos tal y como se presentan en este documento. Preferentemente, la composición de vacuna de la presente invención comprende péptidos contiguos de IDO. Más preferentemente, la composición de vacuna comprende cualquiera de las secuencias enumeradas en el listado de secuencias de la presente divulgación. Muy preferentemente, la composición de vacuna comprende los péptidos IDO5 (SEQ ID NO: 6), IDO2 (SEQ ID NO: 3) y/o IDO6 (SEQ ID NO: 7).

Una característica significativa de un péptido como se desvela en el presente documento, es su capacidad de reconocer o provocar células T respondedoras productoras de INF-γ, es decir, células T citotóxicas (CTL) que reconocen específicamente el péptido particular en una población de CSP, en una CPA o en células tumorales/neoplásicas de un individuo que padece un cáncer y / o una infección (células diana). Esta actividad se determina fácilmente sometiendo las CSP, las CPA o las células tumorales de un individuo a un ensayo ELISPOT. Antes del ensayo, puede ser ventajoso estimular las células a ensayar poniendo en contacto las células con el péptido a analizar. Preferentemente, el péptido es capaz de provocar o reconocer células T productoras de INF-γ a una frecuencia de al menos 1 por 10^4 CSP según se determina mediante un ensayo ELISPOT como se utiliza en el presente documento. Más preferentemente, la frecuencia es de al menos 5 por 10^4 CSP, lo más preferentemente es de al menos 10 por 10^4 CSP, tal como al menos de 50 o 100 por 10^4 CSP.

El ensayo ELISPOT representa una herramienta sólida para controlar las respuestas de células T específicas de péptido IDO. Una implicación principal de los hallazgos del presente documento es que los péptidos se expresan y forman complejo con moléculas de HLA en células cancerosas y/o CPA que expresan IDO. Esto hace que estas células cancerosas sean susceptibles a la destrucción por LTC y enfatiza la posible utilidad de la inmunización con IDO para combatir el cáncer y las infecciones. La presencia de respuestas de LTC espontáneas en CSP de pacientes con melanoma contra epítopos peptídicos derivados de IDO restringidos a HLA, muestra el potencial inmunoterapéutico de los péptidos inmunogénicos de IDO.

En una realización, el péptido es capaz de provocar células productoras de INF-γ en una población de CSP de un individuo que padece una afección clínica en el que se expresa IDO de SEQ ID NO: (1, 13, 14, 15, y/o 16), o un homólogo funcional de la misma, que tiene una identidad de al menos 70% con la SEC ID Nº 1. La afección clínica es preferentemente un cáncer o una infección y más preferentemente un cáncer.

Origen

Como se mencionó anteriormente, los péptidos desvelados en el presente documento proceden de IDO de SEQ ID NO: 1, 13, 14, 15 y / o 16 o de un fragmento de las mismas, más preferentemente, los péptidos proceden de IDO de SEQ ID NO: 1 y/o 16; y lo más preferentemente, los péptidos proceden de IDO de SEQ ID NO: 1. La proteína a partir de la cual puede proceder el péptido puede ser cualquier IDO de cualquier especie animal en la que se expresa la proteína. En realizaciones preferidas, la proteína de partida es de una especie de mamífero que incluye una especie de roedor, un conejo y una especie de primate tal como de ser humano. En función de la secuencia de la proteína seleccionada, el péptido se obtiene mediante cualquier tratamiento químico o enzimático apropiado del material de partida proteico que da como resultado un péptido de un tamaño adecuado como se indicó anteriormente, o puede sintetizarse mediante cualquier procedimiento de síntesis de péptidos convencional con el que el experto con conocimientos habituales en la técnica esté familiarizado. Más preferentemente, la proteína IDO, fragmento de proteína, péptido, variante, y/u homólogos funcionales de cualquiera de estos, se obtienen de IDO ya que la secuencia de la proteína se expresa en seres humanos.

Individuo

El individuo a tratar con la composición de vacuna desvelada en el presente documento, es un individuo que padece una afección clínica. El individuo es preferentemente uno de una especie de mamífero y más preferentemente es un ser humano. El individuo puede tener de cualquier edad, puede ser joven o anciano, y puede ser un hombre o una mujer. La afección clínica que padece el individuo puede ser una enfermedad neoplásica, tal como un cáncer, o una infección, tal como una infección microbiana o vírica, por ejemplo, VIH.

Una realización de la presente invención proporciona una vacuna para el tratamiento, reducción del riesgo, estabilización o prevención de un cáncer. También se desvela una vacuna para el tratamiento, reducción del riesgo, estabilización o prevención de una enfermedad que proviene de una infección, tal como una infección microbiana o vírica.

Una realización adicional se refiere a una composición de vacuna que comprende un fragmento peptídico inmunológicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de IDO de SEC ID NO: 1; y un adyuvante, para el tratamiento de una afección clínica caracterizada por la expresión de IDO.

Cáncer

La composición de vacuna de la presente invención puede utilizarse para prevenir, reducir el riesgo de, o tratar una afección clínica. Preferentemente, la afección clínica está asociado a, o se caracteriza por, la expresión de IDO. IDO puede ser IDO como se identifica en cualquiera de las SEQ ID NO: (1, 13, 14, 15 y / o 16) y puede ser un homólogo que comparte una identidad de secuencia de al menos 70% con cualquiera de estas en sus formas de tipo silvestre, pero no necesita ser funcional. Por lo tanto, se entiende que el nivel de expresión de IDO (siendo la expresión, expresión de ARNhn, ARNm, proteína precursora, proteína completamente procesada, etc.) es igual o mayor que el de un individuo que no padece una afección clínica. En una realización preferida de la invención, la afección clínica es cáncer. El cáncer (neoplasma maligno) es una clase de enfermedades en las que un grupo de células muestra los rasgos de crecimiento incontrolado (crecimiento y división más allá de los límites normales), invasión (intrusión en, y destrucción de, tejidos adyacentes) y, a veces, metástasis (propagación a otros lugares en el organismo a través de la linfa o sangre). Estas tres propiedades malignas de los cánceres las diferencian de los tumores benignos, que son autolimitados, no invaden ni metastatizan. La mayoría de los cánceres forman un tumor, pero algunos, como la leucemia, no. El término "cáncer", como se utiliza en el presente documento, pretende abarcar cualquier enfermedad cancerosa, neoplásica y preneoplásica.

Un grupo no limitante de cánceres que se proporcionan como ejemplos de cánceres que pueden tratarse, controlarse y/o prevenirse mediante la administración de la vacuna de la presente invención incluyen: carcinoma de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de próstata, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, sarcoma linfangioendotelial, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioblastomas, neurinoma, craneofaringioma, schwannoma, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma , neuroblastoma, retinoblastoma, leucemias y linfomas, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda, policitemia vera, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y enfermedad de la cadena pesada, leucemias no linfocíticas agudas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, cáncer de recto, cánceres urinarios, cánceres uterinos, cánceres orales, cánceres de piel, cáncer de estómago, tumores cerebrales, cáncer de hígado, cáncer de laringe, cáncer de esófago, tumores mamarios, leucemia linfoide aguda (LLA) no común en niños, LLA tímica, LLA de células B, leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica, leucemia megacariocítica aguda, linfoma de Burkitt, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica y leucemia de células T, carcinoma microcítico y no microcítico de pulmón, leucemia granulocítica aguda, tumores de células germinales, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfoide crónica, tricoleucemia y cáncer de tiroides.

En una realización preferida, la composición de vacuna de acuerdo con la composición de vacuna de la invención es capaz de provocar una respuesta clínica en un sujeto, pudiendo caracterizarse la respuesta clínica por una enfermedad estable, en una realización preferida la respuesta clínica puede caracterizarse por una respuesta parcial o preferentemente, la respuesta clínica puede caracterizarse por la remisión completa de un cáncer. Preferentemente, el cáncer se selecciona del grupo de; melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cánceres hematológicos (tales como leucemias), cánceres de colon y de células renales.

En un aspecto de la invención, la composición de vacuna es capaz de provocar una respuesta clínica en un individuo. En una realización, la respuesta clínica puede caracterizarse por una enfermedad estable (sin empeoramiento o progresión), en una realización preferida la respuesta clínica puede caracterizarse por una respuesta parcial o preferentemente la respuesta clínica puede caracterizarse por la remisión completa de un cáncer o infecciones. La respuesta clínica puede determinarse como se describe a continuación en el presente documento.

En otro aspecto de la invención, la composición de vacuna es capaz de provocar una respuesta clínica en el sujeto, caracterizándose la respuesta clínica por una disminución en la suma del diámetro más largo de la lesión diana más grande. La disminución puede determinarse como se describe a continuación en el presente documento.

Todas las lesiones medibles hasta un máximo de cinco lesiones por órgano y 10 lesiones en total, representativas de todos los órganos implicados, deben identificarse como lesiones diana y registrarse y medirse al inicio.

- Las lesiones diana deben seleccionarse en función de su tamaño (lesiones con el diámetro más largo) y su idoneidad para mediciones repetidas precisas (ya sea mediante técnicas de formación de imágenes o clínicamente).
- Se calculará una suma del diámetro más largo (DL) de todas las lesiones diana y se presentará como la suma de DL inicial. La suma de DL inicial se utilizará como referencia para caracterizar el tumor diana.

- Las demás lesiones (o sitios de enfermedad) deben identificarse como lesiones no diana y también se deben registrar al inicio. No se requieren mediciones de estas lesiones, pero la presencia o la ausencia de cada una de ellas debe observarse a lo largo del seguimiento.

Evaluación de las lesiones diana

- Respuesta completa (RC): Desaparición de todas las lesiones diana
- Respuesta parcial (RP): al menos un 30% de disminución en la suma del DL de las lesiones diana, tomando como referencia la suma inicial del DL
- Enfermedad progresiva (EP): Aumento de al menos un 20% en la suma del DL de las lesiones diana, tomando como referencia la suma más pequeña del DL registrada desde que comenzó el tratamiento o desde la aparición de una o más lesiones nuevas
- Enfermedad estable (EE): ni contracción suficiente para cualificar una RP ni aumento suficiente para cualificar una EP, tomando como referencia la suma más pequeña del DL desde que comenzó el tratamiento

Evaluación de lesiones no diana

- Respuesta completa (RC): desaparición de todas las lesiones no diana y normalización del nivel del marcador tumoral

- Respuesta incompleta / enfermedad estable (EE): persistencia de una o más lesiones no diana y/o mantenimiento del nivel del marcador tumoral por encima de los límites normales

- Enfermedad progresiva (EP): Aparición de una o más lesiones nuevas y/o progresión inequívoca de lesiones no diana existentes

En una realización de la presente invención, la composición de vacuna que comprende cualquiera de las proteínas y/o polipéptidos mencionados en el presente documento, es capaz de provocar una respuesta clínica en un sujeto, en la que la respuesta clínica se caracteriza por una disminución en la suma del diámetro más largo de la lesión diana más grande.

Se contempla que la composición de vacuna de la invención sea capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un cáncer que expresa IDO de SEQ ID NO: 1 o un homólogo funcional de la misma, que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO: 1, cuando se administra a un individuo que padece un cáncer que expresa IDO. En un individuo vacunado, la composición de vacuna de la invención puede provocar la producción de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico contra las células cancerosas, CPA que expresan IDO y/o induciendo la infiltración de células T específicas de antígeno en el estroma tumoral en un sujeto.

Además de su capacidad para provocar respuestas inmunitarias en poblaciones de CSP (células de sangre periférica), también se contempla que los péptidos de la invención sean capaces de provocar respuestas inmunitarias citolíticas *in situ*, es decir, en tejidos tumorales sólidos. Esto puede demostrarse, por ejemplo, proporcionando complejos de HLA-péptido, por ejemplo, multimerizándose y proporcionándose un marcador detectable, y utilizando dichos complejos para tinciones de inmunohistoquímica para detectar linfocitos T citolíticos, LTC, en un tejido tumoral, que son reactivos con el péptido epitópico de la invención. Por consiguiente, otra característica importante del péptido de la invención es que es capaz de detectar *in situ*, en un tejido tumoral, linfocitos T citotóxicos, LTC, que son reactivos con el péptido epitópico.

También se contempla que los péptidos de la invención, además de su capacidad para unirse a moléculas de HLA que dan como resultado la presentación de complejos de HLA y péptidos en superficies celulares, cuyos complejos actúan a su vez como epítopos o dianas para linfocitos T citotóxicos, pueden provocar otros tipos de respuestas inmunitarias, tales como respuestas de células B que dan como resultado la producción de anticuerpos contra los complejos y/o una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR). El último tipo de respuesta inmunitaria se define como un enrojecimiento y un endurecimiento palpable en el sitio de inyección del péptido de la invención.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de vacuna que comprende un fragmento peptídico inmunogénicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de IDO de SEC ID NO: 1; y un adyuvante, para la prevención, reducción del riesgo o tratamiento del cáncer.

Tratamiento combinado para el cáncer

En algunos casos, será apropiado combinar el método de tratamiento de la invención con un tratamiento adicional, convencional, para el cáncer, tal como quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimuladoras, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento utilizando células dendríticas.

Dado que la expresión elevada de IDO en las células tumorales conduce a la inhibición del sistema inmunitario, la

combinación de una inmunoterapia basada en IDO como la desvelada en la presente invención, con quimioterapia citotóxica y / u otro tratamiento inmunoterapéutico contra el cáncer, es un enfoque eficaz para tratar el cáncer. En el presente documento, estos remedios también reciben el nombre de "principios activos secundarios".

Como ejemplos de agentes quimioterapéuticos que son relevantes con respecto a la administración conjunta (secuencial o simultáneamente) con la composición de vacuna de la presente invención se incluyen, pero sin limitación: ácido todo trans retinoico, actimida, azacitidina, azatioprina, bleomicina, carboplatino, capecitabina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, citarabina, daunorrubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorrubicina, epirrubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, irinotecán, lenalidomida, leucovorina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, revlimid, temozolomida, tenipósido, tioguanina, valrrubicina, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorrelbina. En una realización, un agente quimioterapéutico para uso en la combinación del presente agente puede ser, en sí mismo, una combinación de diferentes agentes quimioterapéuticos. Las combinaciones adecuadas incluyen FOLFOX e IFL. FOLFOX es una combinación que incluye 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina y oxaliplatino. El tratamiento con IFL incluye irinotecán, 5-FU y leucovorina.

Otro principio activo secundario puede ser un inhibidor de quinasas, para el uso por separado, simultáneo o combinado en el tratamiento de tumores. Los inhibidores de quinasas adecuados incluyen aquellos que han demostrado poseer actividad antitumoral (tal como gefitinib (Iressa) y erlotinib (Tarceva)) y estos podrían utilizarse en combinación con los péptidos. Los inhibidores de tirosina quinasas receptoras, tales como el malato de Sunitinib y Sorafenib, que han demostrado ser eficaces en el tratamiento del carcinoma de células renales, también son adecuados para utilizarse como principios activos secundarios.

Otros ejemplos de principios activos secundarios son sustancias inmunoestimuladoras, por ejemplo, citocinas y anticuerpos. Dichas citocinas pueden seleccionarse del grupo que consiste, pero sin limitación, en: GM-CSF, IFN de tipo I, interleucina 21, interleucina 2, interleucina 12 e interleucina 15. El anticuerpo es preferentemente un anticuerpo inmunoestimulador, tal como anticuerpos dirigidos contra CD40 o contra CTLA-4. La sustancia inmunoestimuladora también puede ser una sustancia capaz de agotar células inmunitarias inhibidoras (por ejemplo, células T reguladoras) o factores, dicha sustancia puede ser, por ejemplo, ubiquitín ligasas E3. Las ubiquitín ligasas E3 (las proteínas HECT, RING y U-box) han surgido como reguladores moleculares clave de la función de las células inmunitarias, y cada una puede estar involucrada en la regulación de las respuestas inmunitarias durante la infección dirigiendo moléculas inhibidoras específicas para la destrucción proteolítica. Diversas proteínas E3, HECT y RING, también se han relacionado ahora con la inducción y el mantenimiento de la autotolerancia inmunitaria: c-Cbl, Cbl-b, GRAIL, Itch y Nedd4, regulando por disminución cada una de ellas la producción y proliferación del factor de crecimiento de células T.

En una realización, la composición de vacuna de la presente invención, que comprende un polipéptido derivado de IDO, se administra en combinación con un principio activo secundario, tal como una sustancia inmunoestimuladora. La sustancia inmunoestimuladora es preferentemente una interleucina tal como IL-21 o IL-2 o un agente quimioterapéutico.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas capaces de tratar, reducir el riesgo y / o prevenir un trastorno clínico asociado a la expresión de IDO en un individuo; en otras palabras, las expresiones términos vacuna y composición farmacéutica se utilizan indistintamente en este documento. Las composiciones de vacunas / farmacéuticas de la presente invención pueden ser composiciones de vacunas "tradicionales" que comprenden antígenos tales como proteínas, polipéptidos y / o moléculas de ácidos nucleicos. También pueden estar en forma de composiciones que comprenden células, tales como células modificadas que se originan en el individuo y posteriormente se procesan, o en composiciones que comprenden moléculas complejas, tales como anticuerpos o RCT (receptores de células T).

Generalmente, una vacuna es una sustancia o composición capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un individuo. La composición puede comprender uno o más de los siguientes: un "componente activo" tal como un antígeno(s) (por ejemplo, proteína, polipéptidos, péptidos, ácidos nucleicos y similares), construcciones de ácido nucleico que comprenden uno o más antígenos entre otros elementos, células, (por ejemplo, CPA cargadas, células T para transferencia celular adoptiva), moléculas complejas (anticuerpos, complejos de RLT y MHC y más), portadores, adyuvantes y vehículos farmacéuticos. A continuación, se describen con más detalle los diversos componentes de una composición de vacuna según la presente invención.

La composición de vacuna de la invención es capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un cáncer, CD o CPA que expresa IDO de SEQ ID NO: 1 o un homólogo funcional de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO 1, cuando se administra a un individuo que padece cáncer y / o infección (lo que conduce a la expresión de IDO). En una realización preferida, la afección clínica es un cáncer. La composición de vacuna de la invención es capaz de provocar, en un individuo vacunado, la producción de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico contra células cancerosas, CPA y DC que expresan IDO y / o inducir la infiltración de

células T específicas de antígeno en el estroma tumoral en un sujeto.

Antígenos y otros componentes activos

Composiciones de vacunas basadas en proteínas/polipéptidos

Los péptidos de la presente invención se unen con una afinidad sorprendentemente alta (véase la figura 2) y están listos para su uso como antígenos tal y como se presentan en este documento. Preferentemente, la composición de vacuna de la presente invención comprende uno o más péptidos contiguos de IDO (SEC ID Nº: 1). Más preferentemente, la composición de vacuna comprende cualquiera de las secuencias enumeradas en el listado de secuencias de la presente divulgación. Muy preferentemente, la composición de vacuna comprende los péptidos IDO5 (SEQ ID NO: 6), IDO2 (SEQ ID NO: 3) y/o IDO6 (SEQ ID NO: 7).

La elección del antígeno en la composición de vacuna de la invención dependerá de parámetros determinables por el experto en la técnica. Como se ha mencionado, cada uno de los diferentes péptidos de la invención se presenta en las superficies de las células mediante una molécula de HLA particular. Como tal, si un sujeto a tratar se tipifica con respecto al fenotipo de HLA, se selecciona un péptido/péptidos que se sabe que se une/unen a esa molécula de HLA particular. Como alternativa, el antígeno de interés se selecciona en función de la frecuencia de los diversos fenotipos de HLA en una población determinada. Como ejemplo, el fenotipo HLA-A2 es el más prevalente en la población caucásica, y por lo tanto, una composición que contiene un péptido que se une a HLA-A2 estará activa en una gran proporción de esa población. Además, los antígenos / péptidos pueden modificarse de acuerdo con los motivos de restos de anclaje presentados en la Tabla 2, para potenciar la unión con moléculas de HLA particulares.

La composición desvelada en el presente documento también puede contener una combinación de dos o más péptidos derivados de IDO, cada uno de ellos interaccionando específicamente con una molécula de HLA diferente para cubrir una mayor proporción de la población diana. Por tanto, como ejemplos, la composición farmacéutica puede contener una combinación de un péptido restringido por una molécula de HLA-A y un péptido restringido por una molécula de HLA-B, por ejemplo, incluyendo las moléculas de HLA-A y HLA-B que corresponden a la frecuencia de fenotipos HLA en la población diana, tales como, por ejemplo, HLA-A2 y HLA-B35. Adicionalmente, la composición puede comprender un péptido restringido por una molécula de HLA-C.

En el caso de las vacunas basadas en péptidos, los epítopos pueden administrarse en una forma 'lista para MHC', que permite la presentación a través de carga exógena independientemente de la captación de antígeno y del procesamiento por parte de las células presentadoras de antígeno del hospedador. Los péptidos de la presente invención comprenden péptidos en una forma corta 'lista para MHC' y en una forma más larga que requiere procesamiento por parte del proteasoma, proporcionando así una composición de vacuna más compleja que puede dirigirse a múltiples antígenos tumorales. Cuantos más grupos de HLA diferentes sean blanco de una vacuna, mayor será la probabilidad de que la vacuna funcione en diversas poblaciones.

La presente invención se refiere, en una realización preferida, a una composición de vacuna que comprende un fragmento peptídico inmunogénicamente activo que comprende una secuencia consecutiva de dicha indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) de SEQ ID NO: 1; en combinación con un adyuvante para uso como medicamento. La composición de vacuna puede administrarse para tratar, prevenir o reducir el riesgo asociado a una afección clínica en un individuo.

Adyuvantes y portadores

La composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende preferentemente un adyuvante y/o un portador. A continuación se ofrecen ejemplos de adyuvantes y portadores útiles en la presente memoria. De este modo, en una composición de la presente invención, el fragmento polipeptídico IDO o péptido derivado del presente documento, puede asociarse con un adyuvante y / o un portador.

Los adyuvantes son cualquier sustancia cuya mezcla en la composición de vacuna aumente o modifique de otra manera la respuesta inmunitaria a IDO o a su fragmento peptídico, véase más adelante en líneas posteriores. Los portadores son estructuras armazón, por ejemplo, un polipéptido o un polisacárido, al que la IDO o su fragmento peptídico puede asociarse y que ayuda especialmente en la presentación de los péptidos.

Muchos péptidos son moléculas relativamente pequeñas y, por lo tanto, en composiciones como se describe en este documento puede ser necesario combinar los péptidos con diversos materiales tales como adyuvantes y / o portadores, para producir vacunas, composiciones inmunogénicas, etc. Los adyuvantes, ampliamente definidos, son sustancias que promueven respuestas inmunitarias. Un análisis general acerca de adyuvantes se proporciona en Goding, Monoclonal Antibodies: Principles & Practice (2ª edición, 1986) en las páginas 61-63. Goding señala que cuando el antígeno de interés tiene bajo peso molecular o es poco inmunogénico, se recomienda el acoplamiento a un portador inmunogénico. Los ejemplos de dichas moléculas portadoras incluyen hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina e inmunoglobulina aviar. También se ha sugerido que diversos extractos de saponina son útiles como adyuvantes en composiciones inmunogénicas. Como adyuvante se ha propuesto utilizar el

factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), una citocina bien conocida (WO 97/28816).

Independientemente de si hay un adyuvante puede haber un portador. La función de un portador puede ser, por ejemplo, aumentar el peso molecular de fragmentos peptídicos particulares para aumentar su actividad o inmunogenicidad, conferir estabilidad, aumentar la actividad biológica o aumentar la semivida en suero. Además, un portador puede ayudar a presentar a las células T los fragmentos polipeptídicos de IDO. El portador puede ser cualquier portador adecuado conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, una proteína o una célula presentadora de antígeno. Una proteína transportadora podría ser, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana, proteínas séricas tales como transferrina, seroalbúmina bovina, seroalbúmina humana, tiroglobulina u ovoalbúmina, inmunoglobulinas u hormonas, tales como insulina o ácido palmítico. Para la inmunización de seres humanos, el portador debe ser un portador fisiológicamente aceptable e inocuo para los seres humanos. Sin embargo, en una realización de la invención, el toxoide tetánico y / o el toxoide diftérico son portadores adecuados. Como alternativa, el portador puede ser un dextrano, por ejemplo, sefarosa.

Por lo tanto, es un aspecto de la presente invención, que en la composición, el fragmento polipeptídico, o péptido de IDO, esté asociado a un vehículo, tal como, por ejemplo, una proteína de lo anterior o una célula presentadora de antígeno, tal como, por ejemplo, una célula dendrítica (CD).

Los adyuvantes podrían seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en: $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, sílice, alumbre, $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, caolín, carbono, hidróxido de aluminio, dipéptidos de muramilo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también conocida como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2- (1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, también conocida como MTP-PE), RIBI (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno/Tween-80® al 2%, lipopolisacáridos y sus diversos derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, poli IC y ácidos poli AU), cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum, Bordetella pertussis* y en miembros del género *Brucella*, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN (véanse los documentos US 58767 y 5.554.372), derivados de lípido A, derivados de la toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, matrices de péptidos sintéticos o GMDP, interleucina 1, interleucina 2, Montanide ISA-51 y QS-21. Los adyuvantes preferidos para utilizar con la invención incluyen adyuvantes basados en aceite/tensioactivo tales como los adyuvantes Montanide (disponibles en Seppic, Bélgica), preferentemente Montanide ISA-51. Otros adyuvantes preferidos son adyuvantes basados en ADN bacteriano, tales como los adyuvantes que incluyen secuencias de oligonucleótidos CpG. Otros adyuvantes aún preferidos son los adyuvantes basados en ARNbc de virus, tales como poli I:C. Las imidazoquinilinas son otro ejemplo más de adyuvante preferido. Los adyuvantes más preferidos son adyuvantes adecuados para su uso en seres humanos.

Los adyuvantes Montanide (todos ellos disponibles en Seppic, Bélgica), se pueden seleccionar del grupo que consiste en Montanide ISA-51, Montanide ISA-50, Montanide ISA-70, Montanide ISA-206, Montanide ISA-25, Montanide ISA-720, Montanide ISA-708, Montanide ISA-763A, Montanide ISA-207, Montanide ISA-264, Montanide ISA-27, Montanide ISA-35, Montanide ISA 51F, Montanide ISA 016D y Montanide IMS, preferentemente del grupo que consiste en Montanide ISA-51 , Montanide IMS y Montanide ISA-720, más preferentemente del grupo que consiste en Montanide ISA-51. Montanide ISA-51 (Seppic, Inc.) es un adyuvante basado en aceite/tensioactivo en el que se combinan diferentes tensioactivos con un aceite mineral no metabolizable, un aceite metabolizable o una mezcla de los dos. Estos adyuvantes se preparan para su uso como una emulsión con una solución acuosa que comprende IDO o un fragmento peptídico de la misma. El tensioactivo es oleato de manida. QS-21 (Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, MA) es una saponina hidrosoluble muy purificada que se manipula como una solución acuosa. Los adyuvantes QS-21 y Montanide ISA-51 se pueden proporcionar en viales estériles de un solo uso.

La archiconocida citocina GM-CSF, es otro adyuvante preferido de la presente invención. El GM-CSF se ha utilizado como adyuvante durante una década y puede ser, preferentemente, GM-CSF como se describe en el documento WO 97/28816.

En la siguiente tabla se enumeran las funcionalidades deseables de los adyuvantes que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención.

Tabla 2: Modos de acción del adyuvante

Acción	Tipo de adyuvante	Beneficio
1. Inmunomodulación	Generalmente moléculas o proteínas pequeñas que modifican la red de citocinas	Regulación por aumento de la respuesta inmunitaria. Selección de Th1 o Th2
2. Presentación	Generalmente moléculas anfipáticas o complejos que interaccionan con un inmunógeno en su conformación nativa	Aumento de la respuesta de anticuerpos neutralizantes. Mayor duración de la respuesta

Acción	Tipo de adyuvante	Beneficio
3. induction de LTC	• Partículas que pueden unir o contener un inmunógeno y que pueden fusionarse con las membranas celulares, o alterarlas • Emulsiones de agua en aceite para la conexión directa del péptido al MHC-1 de la superficie celular	Procesamiento citosólico de las proteínas produciendo péptidos restringidos de clase 1 correctos Proceso sencillo si se conoce el péptido o péptidos promiscuos
4. Direccionamiento	• Adyuvantes en partículas que se unen a un inmunógeno. Adyuvantes que saturan células de Kupffer	Uso eficaz de adyuvante y de inmunógeno
	• Adyuvantes de hidratos de carbono que dirigen receptores de lectina diana en macrófagos y CD	Como anteriormente. También se puede determinar el tipo de respuesta si el direccionamiento es selectivo
5. Generación de depósito	• Emulsión de agua en aceite a corto plazo de microesferas o a largo plazo de nanoesferas	Potencial de eficiencia de una vacuna de una sola dosis

Fuente: Cox, J.C. y Coulter, A.R. (1997). Vaccine 15, 248-56.

Una composición de vacuna de acuerdo con la presente invención puede comprender más de un adyuvante. Además, la invención incluye una composición terapéutica que adicionalmente comprende cualquier sustancia adyuvante y/o portadora que incluya cualquiera de lo expuesto anteriormente o sus combinaciones. También se contempla que los fragmentos peptídicos de IDO y el adyuvante, se puedan administrar por separado en cualquier secuencia apropiada. Preferentemente, las composiciones de vacuna de la presente invención comprenden un adyuvante Montanide tal como Montanide ISA 51 o Montanide ISA 720 o el adyuvante GM-CSF.

Por consiguiente, la invención incluye una composición terapéutica que comprende además una sustancia adyuvante que incluye cualquiera de lo expuesto anteriormente o sus combinaciones. También se contempla que el antígeno, es decir, el péptido y el adyuvante, se puedan administrar de manera simultánea o por separado en cualquier secuencia apropiada.

Dosis y administración

La cantidad del péptido inmunogénico de la invención en la composición farmacéutica puede variar, dependiendo de la aplicación particular. Sin embargo, una sola dosis de la composición peptídica está preferentemente en cualquier intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 5.000 µg, más preferentemente de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2.500 µg, tal como de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1000 µg. Los modos de administración incluyen administración intradérmica, subcutánea e intravenosa, implantación en forma de una formulación de liberación prolongada, etc. En el presente documento se incluyen todas y cada una de las formas de administración conocidas en la técnica. También se incluyen todas y cada una de las formas de dosificación convencionales que se conocen en la técnica, que son apropiadas para formular una composición peptídica inmunogénica inyectable, tales como formas y soluciones liofilizadas, suspensiones o formas de emulsión que contienen, si fuera necesario, portadores, diluyentes, conservantes, adyuvantes, componentes de tampón, etc.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse y administrarse utilizando cualquier protocolo convencional conocido por un experto en la materia. En los ejemplos 3-5 se ofrecen ejemplos no limitantes de preparación de una composición de vacuna según la invención, así como un ejemplo no limitante de administración de dicha vacuna. El experto en la materia apreciará que el protocolo puede adaptarse fácilmente a cualquiera de las composiciones de vacuna descritas en este documento. En una realización adicional de la invención, la composición farmacéutica de la invención es útil para tratar a un individuo que padece un cuadro clínico caracterizado por la expresión de IDO, tal como cáncer e infecciones.

El efecto inmunoprotector de la composición de la invención se puede determinar utilizando varios enfoques conocidos por los expertos en la materia. También puede determinarse Una respuesta inmunitaria satisfactoria por la aparición de reacciones de DTH después de la inmunización y/o la detección de anticuerpos que reconocen específicamente el (los) péptido (s) de la composición de vacuna.

Las composiciones de vacuna de acuerdo con la invención se pueden administrar a un individuo en cantidades terapéuticamente eficaces. La cantidad eficaz puede variar de acuerdo con una variedad de factores tales como la afección, el peso, el sexo y la edad del individuo. Otros factores incluyen el modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar al individuo mediante una variedad de vías tales como subcutánea, tópica, oral e intramuscular. La administración de las composiciones farmacéuticas se realiza por vía

oral o parenteral. Los métodos de suministro por vía parenteral incluyen administración tópica, intraarterial (directamente en el tejido), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La presente invención también tiene el objetivo de proporcionar formulaciones farmacéuticas tópicas, orales, sistémicas y parenterales adecuadas para su uso en los métodos de profilaxis y tratamiento con la composición de vacuna.

Por ejemplo, las composiciones de vacuna pueden administrarse en formas de dosificación oral tales como comprimidos, cápsulas (incluyendo cada una formulaciones de liberación temporizada y de liberación sostenida), píldoras, polvos, gránulos, elixires, tinturas, soluciones, suspensiones, jarabes y emulsiones, o por inyección. Asimismo, también pueden administrarse por vía intravenosa (tanto en bolo como en infusión), intraperitoneal, subcutánea, tópica con o sin oclusión, o de forma intramuscular, todas ellas utilizando formas bien conocidas por los expertos habituales en las técnicas farmacéuticas. Puede emplearse una cantidad eficaz pero no tóxica de la vacuna, que comprenda cualquiera de los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva, como un agente profiláctico o terapéutico. También se incluyen todas y cada una de las formas de dosificación convencionales que se sabe en la técnica que son apropiadas para formular la composición de péptido inmunogénico inyectable, tales como formas y soluciones liofilizadas, suspensiones o formas de emulsiones que contienen, si fuese necesario, portadores, diluyentes, conservantes, adyuvantes, componentes de tampón, etc., convencionales y farmacéuticamente aceptables.

Los modos preferidos de administración de la composición de vacuna de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, administración sistémica, tal como administración intravenosa o subcutánea, administración intradérmica, administración intramuscular, administración intranasal, administración oral, administración rectal, administración vaginal, administración pulmonar y generalmente cualquier forma de administración en la mucosa. Además, está incluido en el alcance de la presente invención, que los medios para cualquiera de las formas de administración mencionadas en el presente documento, estén incluidos en la presente invención.

Una vacuna de acuerdo con la presente invención puede administrarse una vez, o varias veces tal como dos, tres, cuatro o cinco veces. La administración de la vacuna más de una vez tiene el efecto de reforzar la respuesta inmunitaria resultante. La vacuna también puede reforzarse administrándola en una forma o en una parte del cuerpo diferente a la de la administración anterior. La dosis de refuerzo es una dosis de refuerzo homóloga o heteróloga. Una dosis de refuerzo homóloga es una en la que la primera vacunación y las siguientes comprenden las mismas construcciones y más específicamente el mismo vehículo de suministro, especialmente el mismo vector vírico. Una dosis de refuerzo heteróloga es cuando dentro de diferentes vectores víricos se incluyen construcciones que son idénticas.

Principio activo secundario

Es un aspecto de la presente invención que la composición de vacuna proporcionada en el presente documento se utilice en combinación con un principio activo secundario. La administración de la composición de vacuna y el principio activo secundario puede ser secuencial o combinada. Anteriormente se han dado ejemplos de principios activos secundarios tanto para cánceres como para infecciones. Es un aspecto adicional, que la composición de vacuna pueda utilizarse en combinación con otra terapia de relevancia para el cuadro clínico determinado que se va a tratar. Dicha terapia puede incluir cirugía, quimioterapia o terapia génica, sustancias inmunoestimuladoras o anticuerpos; un experto en la materia puede determinar el tratamiento de combinación apropiado para un escenario determinado.

En algunos casos, será apropiado combinar el método de tratamiento de la invención con un tratamiento médico adicional tal como quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimuladoras, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y / o antibióticos y tratamiento utilizando células dendríticas.

Control de la inmunización

En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica de la invención es una composición de vacuna. Por lo tanto, es de interés, controlar la inmunización en un individuo al que se administra la composición de vacuna de la presente invención. La composición farmacéutica puede ser por tanto una composición inmunogénica o vacuna capaz de provocar una respuesta inmunitaria contra un cáncer y/o una infección. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición inmunogénica o vacuna" se refiere a una composición que provoca al menos un tipo de respuesta inmunitaria dirigida contra células que expresan IDO, tales como células cancerosas, CPA o CD. Por tanto, dicha respuesta inmunitaria puede ser cualquiera de las siguientes: una respuesta de LTC en la que se generan LTC que son capaces de reconocer el complejo HLA/péptido presentado en las superficies celulares dando como resultado la lisis celular, es decir, la vacuna provoca en el sujeto vacunado la producción de células T efectoras que tienen un efecto citotóxico contra las células cancerosas; una respuesta de células B que da lugar a la producción de anticuerpos contra el cáncer; y/o un tipo de respuesta inmunitaria DTH. Es un objeto de la presente invención controlar la inmunización de un individuo controlando cualquiera de las reacciones anteriores después de administrar a dicho individuo la composición de la presente invención.

Por tanto, en el presente documento también se desvela un método para controlar la inmunización, comprendiendo dicho método las etapas de

i) proporcionar una muestra de sangre de un individuo
ii) proporcionar IDO o un fragmento peptídico de la misma, en el que dicha proteína o péptido puede ser cualquiera de las proteínas o de los péptidos descritos en el presente documento
iii) determinar si dicha muestra de sangre comprende anticuerpos o células T que comprenden receptores de células T que se unen específicamente a la proteína o al péptido
iv) determinar de ese modo si en dicho individuo se ha provocado una respuesta inmunitaria contra dicha proteína o péptido.

El individuo es preferentemente un ser humano, por ejemplo, un ser humano que se ha inmunizado con IDO o con un fragmento peptídico de la misma o con un ácido nucleico que codifica dicha proteína o péptido.

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1: Respuestas de células T restringidas a HLA-A2 contra IDO, medidas por ELISPOT para IFN-γ. Se analizaron CSP de 13 individuos sanos, de 4 pacientes con cáncer de mama, de 6 pacientes con melanoma y de 10 pacientes con carcinoma de células renales. Todos los individuos eran positivos a HLA-A2. Se examinaron los péptidos IDO2 (FLVSLLVEI) (SEQ ID NO: 3) (**a**), IDO6 (VLSKGDGL) (SEQ ID NO: 7) (**b**) e IDO5 (ALLEIASCL) (SEQ ID NO: 6) (**c**). Los linfocitos T se estimularon una vez con péptido antes de sembrarse en placas a 4×10^5 células por pocillo por duplicado, ya sea con o sin el péptido relevante. Se calculó el número promedio de manchas específicas de péptido (después de restar las manchas sin péptido añadido) de cada paciente, utilizando el Analizador ImmunoSpot de la Serie 2.0 (Analizador de LTC) (**d**) El número de células específicas de IDO5 en CMSP medido por ELISPOT para IFN-γ se correlaciona con la expresión de IDO en las CMSP medida por tinciones de IDO intracelular. Los pacientes se dividieron en dos grupos que presentaban: CMSP IDO- o CMSP IDO+. La expresión de IDO intracelular se obtuvo mediante una prueba unilateral de la T con dos muestras, que compara la IMF de IDO y la IMF de un control de isotipo, donde IMF es la intensidad media de fluorescencia. Se definieron valores de p <0,05 (nivel de significación) para CMSP IDO+. El triángulo blanco proporciona el número promedio de manchas específicas de IDO5 por 4×10^5 CMSP en cada grupo. Los triángulos negros indican el número promedio de manchas específicas de IDO5 en cada grupo (**e**) Ejemplo de una respuesta ELISPOT contra IDO5 en CMSP de un paciente con cáncer de mama.

Figura 2: Análisis tetramérico de células T específicas de IDO5. (a), La unión del péptido de control positivo restringido a HLA-A2, VIH-1 pol $_{476\text{-}484}$(ILKEPVHGV) se comparó con la del péptido IDO5 mediante un ensayo de ensamblaje. (**b**), Un ejemplo de células T CD8 específicas de IDO5 en CSP de un paciente con carcinoma de células renales observadas mediante tinción con citometría de flujo utilizando el complejo tetramérico HLA-A2 / IDO5-PE y CD8-aloficocianina. Como control negativo, CSP del mismo paciente se tiñeron con el complejo tetramérico HLA-A2 / HIV pol476-484-PE y CD8-aloficocianina. (**c**), las CSP de donantes sanos o de pacientes con cáncer de mama, cáncer de melanoma o carcinoma de células renales, se tiñeron con el complejo tetramérico HLA-A2 / IDO5 o HLA-A2 / HIV pol y se analizaron mediante citometría de flujo *ex vivo* o después de una estimulación peptídica *in vitro*. Las líneas de puntos ilustran que las células positivas al tetrámero de IDO5 son detectables tanto *ex vivo* como *in vitro* en los mismos pacientes. (**d**), Un ejemplo de análisis de fenotipo de CD45RA y CD28 de células seleccionadas de tetrámero IDO5/ CD8 a partir de CMSP enriquecidas en células T CD8 de un paciente con carcinoma de células renales observado *ex vivo* mediante citometría de flujo. Para la comparación, las células se tiñeron con controles del mismo isotipo (**e**), Un ejemplo de un cultivo de LIT (linfocitos infiltrantes de tumor) expandido con IL-2 de un paciente con melanoma observado mediante tinción con citometría de flujo utilizando el complejo tetramérico HLAA2 / IDO5-PE y CD8-CPA-Cy7. Como control negativo, los LIT se tiñeron con el complejo tetramérico HLA-A2 / VIH pol476-484-PE y CD8-CPA-Cy7. (**f**), Como un control positivo del tetrámero IDO5, un clon de células T específico de IDO5 se tiñó con los tetrámeros HLA-A2 / HIV-PE y HLA-A2 / IDO5-PE.

Figura 3: Especificidad y capacidad funcional de un clon de células T específico de IDO5. (RBS35) ensayado mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr. (**a**), Lisis de células T2 sin péptido o pulsadas con el péptido IDO5. (**b**), lisis específica de la línea celular de cáncer de colon IDO$^+$, HLA-A2$^+$, SW480, sin o con la adición del anticuerpo específico de HLA de clase I, W6/32, y lisis de la línea celular de cáncer de colon IDO$^-$, HLA-A2$^+$, HCT-116. (**c**), Lisis de la línea celular de melanoma IDO$^+$, HLA-A2$^+$, FM55M, sin y con la adición de células T2 frías pulsadas o no pulsadas con IDO5 (proporción entre inhibidor con respecto a diana = 20: 1) (**d**), Lisis de blastos de LMA enriquecidos de un paciente con LMA positivo a HLA-A2. Los blastos de LMA, las células B y las células T se agotaron de la médula ósea del paciente con LMA utilizando microesferas de CD19$^+$ y CD3$^+$, respectivamente. Los blastos de LMA altamente enriquecidos se utilizaron como células diana con o sin la adición del anticuerpo específico de HLA de clase I, W6/32. Todos los ensayos se realizaron a diferentes relaciones entre células (efectoras) E: D (diana). (**e**) Histogramas que

muestran la expresión de IDO intracelular en líneas de células cancerosas. Los datos son representativos de 3 experimentos. La expresión de IDO intracelular se obtuvo mediante una prueba unilateral de la T con dos muestras, que compara la IMF de IDO (histogramas oscuros) y la IMF de un control de isotipo (histogramas claros), donde IMF es la intensidad media de fluorescencia. *Izquierda*: HCT-116 (p = 0,300). *Derecha*: SW480 (p = 0,002).

Figura 4: Los histogramas muestran tinciones de IDO intracelular (histogramas oscuros). Los controles negativos eran tinciones con el anticuerpo secundario solo conjugado con fluorocromo (histogramas claros). La expresión de IDO se determinó utilizando el índice de tinción definido como $IMF_{positiva} - IMF_{de\ fondo} / 2 \times SD_{\ de\ fondo}$ donde IFM es la intensidad media de fluorescencia. Las células se definieron positivas a IDO si el índice de tinción era > 1[21]. (**a**), líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 (0,01) y SW480 (1,3) (**b**), línea celular de cáncer de mama CAMA-1 (1,3) y CAMA-1 + IFN-γ (1,8) y (**c**), CD inmaduras (0,2) y CD maduras (1,2).

Figura 5: Capacidad funcional de un clon de células T específico de IDO5 (RBS35) para destruir líneas celulares de cáncer de mama tratadas con IFN-γ analizada mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr. Lisis de las líneas celulares de cáncer de mama positivas a HLA-A2, CAMA-1 (**a**) y MDA-MB-231 (**b**) antes y después de tratamiento con IFN-γ. Todos los ensayos se realizaron en diferentes relaciones entre células E: D. (**c**), *Izquierda*: Histogramas que muestran la expresión de IDO intracelular en CAMA-1 antes y después del tratamiento con IFN-γ. Los datos son representativos de 3 experimentos. La expresión de IDO intracelular se obtuvo mediante una prueba unilateral de la T con dos muestras que compara la IMF de IDO (histogramas oscuros) y la IMF de control de isotipo (histogramas claros), donde IFM es la intensidad media de fluorescencia. *Parte superior*: CAMA-1 (p = 0,020 e IMF de IDO/ IMF de control de isotipo = 2,3). Parte inferior: CAMA-1 + tratamiento con IFN-γ (p = 0,004 e IMF de IDO / IMF de control de isotipo = 3,5). *Derecha*: Histogramas que muestran la expresión de HLA-A2 en CAMA-1 antes y después del tratamiento con IFN-γ. Los datos son representativos de 3 experimentos. La expresión de HLA-A2 se obtuvo mediante una prueba unilateral de la T con dos muestras que compara la IMF de HLA-A2 (histogramas oscuros) y la IMF de control de isotipo (histogramas claros). Parte superior: CAMA-1 (p = 0,004 e IFM de HLA-A2 / IMF de control isotipo = 43,7). Parte inferior: CAMA-1 + tratamiento con IFN-γ (p = 0,002 e IFM de IDO / IFM de HLA-A2 = 141,2). (**d**), Lisis de la línea celular de cáncer de colon SW480 transfectada con ARNhp de IDO para la regulación por disminución de la expresión de la proteína IDO mediante un cultivo masivo de células T específico de IDO5. Como control positivo, células SW480 transfectadas con ARNhp de control, se utilizaron como células diana. Todos los ensayos se realizaron en diferentes proporciones E: D. (**d**), Histogramas que muestran la expresión de IDO intracelular en células SW480 transfectadas con ARNhp de control (p = 0,001 e IFM de IDO/ IFM de control de isotipo = 4,8) (parte superior) y ARNhp de IDO (p = 0,040 e IFM de IDO/IFM de control de isotipo = 2,1) (parte inferior).

Figura 6: Capacidad funcional de un clon de células T específico de IDO5 (RBS35) para destruir CD, analizada mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr. (**a**), Lisis de CD autólogas inmaduras y maduras. (**b**), Lisis de CD HLA-A2+ alogénicas inmaduras y maduras. Todos los ensayos se realizaron en diferentes proporciones E:D. (**c**) Histogramas que muestran la expresión de IDO intracelular en CD. Los datos son representativos de 3 experimentos. La expresión de IDO intracelular se obtuvo mediante una prueba unilateral de la T con dos muestras que compara la IMF de IDO (histogramas oscuros) y la IMF de control de isotipo (histogramas claros), donde IFM es la intensidad media de fluorescencia. Parte izquierda: CD inmaduras *in vitro* (p = 0,100). Parte derecha: CD maduras *in vitro* (p = 0,001). (d), Lisis de monocitos CD14+ autólogos, células T CD3+ y células B CD19+ aisladas directamente *ex vivo* de CMSP IDO+. Como control, se utilizó CD inmaduras IDO- y CD maduras IDO+ autólogas generadas *in vitro*. (**e**), Ejemplos de respuestas de células T restringidas a HLA-A2 contra el VEB BMLF1280-288 (GLCTLVAML) medidas por ELISPOT en CMSP de un paciente con cáncer de mama. Los cultivos de CMSP se trataron con IFN-γ durante 5 días sin (izquierda) y con 26 células T específicas de IDO (a una proporción entre CMSP: células T específicas de IDO, de 3000: 1) (parte derecha) antes del análisis de reactividad contra el epítopo restringido a HLA-A2 del virus de Epstein-Barr VEB BMLF1 (GLCTLVAML). Se examinaron tres concentraciones diferentes de CMSP; $1,5 \times 10^5$ células, 5×10^4 células (dos filas superiores) y 10^4 células (dos filas inferiores).

Figura 7: Especificidad y capacidad funcional de células T específicas de IDO5 analizadas mediante ensayos de liberación de ^{51}C: (**a**), Lisis por RBS35 de la línea celular de melanoma HLA-A2+ / IDO+ FM55M sin y con la adición de células T2 frías pulsadas con péptido IDO5 o con un péptido irrelevante (HIV-1 pol1476-484) (proporción entre inhibidor con respecto a diana = 20: 1), y la actividad de células NK de RBS35 se examinó utilizando la línea celular citolítica natural K562 como células diana. (**b**), Lisis por RBS35 de blastos de LMA enriquecidos de un paciente con LMA HLA-A2+. Los blastos de LMA, las células B y las células T se agotaron de la médula ósea del paciente con LMA utilizando microesferas con CD19+ y CD3+, respectivamente. Los blastos de LMA altamente enriquecidos se utilizaron como células diana con o sin la adición de anticuerpo específico de HLA de clase I, W6/32. (**c**), Lisis de células T2 pulsadas con péptido IDO5 o con un péptido irrelevante (HIV-1 pol1476-484), y lisis de la línea celular de cáncer de colon HLAA2 + / IDO+ SW480 mediante un cultivo masivo de células T específicas de IDO5. (**d**), Lisis de la línea

celular de cáncer de colon HLA-A2 + / IDO + SW480 y de la línea celular de cáncer de colon HLA-A2+/ IDO- HCT-116 por tres clones de células T específicas de IDO5 diferentes (RBS26 (triángulo blanco), RBS31 (triángulo negro), RBS46 (triángulo gris)) analizado mediante ensayo de liberación de ^{51}Cr. Todos los ensayos se realizaron en diferentes proporciones de E: D.

Figura 8: Alineación múltiple de secuencias IDO por Clustal W

Figura 9: Alineación por pares de IDO e IDOLIKE por Clustal W

Ejemplos

Ejemplo 1

Pacientes / Individuos

Se recogieron CSP/CMSP de pacientes con cáncer (cáncer de mama, melanoma y carcinoma de células renales) y de controles sanos. Se extrajeron muestras de sangre al menos cuatro semanas después de finalizar cualquier tipo de terapia contra el cáncer. La mayoría de los pacientes con carcinoma de células renales se había tratado previamente con IL2 e IFN-α, la mayoría de los pacientes con melanoma habían recibido altas dosis de IL2 e IFN-α, mientras que todos los pacientes con cáncer de mama se trataron previamente con varios tipos de quimioterapia (por ejemplo, epirrubicina, docetaxel, cabecitabina), trastuzumab y / o terapia endocrina. Las CSP se aislaron utilizando separación con Lymphoprep, se tipificaron para HLA (Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario, Copenhague, Dinamarca) y se congelaron en FCS con DMSO al 10%. Se incluyeron un total de 20 pacientes HLA-A2 +, ninguno de estos recibió inmunoterapia antes del muestreo de sangre. Y antes de realizar cualquiera de estas mediciones se obtuvo la declaración de consentimiento informado de los pacientes.

Péptidos

Los epítopos de IDO se predijeron de acuerdo con el conocimiento sobre la longitud de péptido preferida, los restos de anclaje y los anclajes auxiliares del alelo HLA-A2. El escaneo de la proteína IDO se llevó a cabo utilizando la "Base de datos SYFPEITHIP"[32] en combinación con un examen manual de la secuencia de proteínas para los restos de anclaje del MHC de clase I. Los péptidos seleccionados se adquirieron en Genscript. Se produjeron 11 péptidos sintéticos de 9meros (nanoméricos) y de 10meros (decaméricos) : posiciones 54-62 (QLRERVEKL (SEQ ID NO: 2)) de IDO1, posiciones 164-172 (FLVSLLVEI (SEQ ID NO: 3)) de IDO2, posiciones 195-203 (TLLKALLEI (SEQ) ID NO: 4)) de IDO3, posiciones 41-49 (FIAKHLPDL (SEQ ID NO: 5)) de IDO4, posiciones 199-207 (ALLEIASCL (SEQ ID NO: 6)) de IDO5, posiciones 320-328 (VLSKGDGL (SEQ ID NO : 7)) de IDO6, posiciones 383-391 (DLMNFLKTV (SEQ ID NO: 8)) de IDO7, posiciones 275-283 (VLLGIQQTA (SEQ ID NO: 9)) de IDO8, posiciones 101-109 (KVLPRNIAV (SEQ ID NO: 10)) de IDO9, posiciones 61-70 (KLNMLSIDHL (SEQ ID NO: 11)) de IDO10 y posiciones 341-350 (SLRSYHLQIV (SEQ ID NO: 12)) de IDO11. Los péptidos se disolvieron en DMSO (concentración final 10 mM) o en agua destilada (concentración final 2 mM). Como control irrelevante se utilizó el epítopo de unión de alta afinidad por HLA-A2 VIH-1 pol1476-484 (ILKEPVHGV. Como control se utilizó el péptido EBVBMLF1280-288 (GLCTLVAML) del virus de Epstein-Barr restringido a HLA-A2.

Ensayo de ensamblaje para la unión de péptidos con moléculas MHC de clase I

La afinidad de unión de los péptidos sintéticos (Genscript) por las moléculas HLA-A2, marcadas metabólicamente con [35^{S} -metionina], se midió en el ensayo de ensamblaje, como se ha descrito previamente [33]. El ensayo se basa en la estabilización mediada por péptidos de moléculas HLA vacías liberadas tras la lisis celular, de la línea celular T2 carente de TAP. Las moléculas HLA plegables de forma estable se inmunoprecipitaron utilizando el Acm (anticuerpo monoclonal) dependiente de conformación, específico de HLA de clase I, W6/32 y se separaron por electroforesis en gel con isoelectroenfoque (IEF). Las bandas de las cadenas pesadas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se cuantificaron utilizando el programa ImageGauge Phosphoimager (FUJI Photo Film, Carrolton, TX). La intensidad de la banda está directamente relacionada con la cantidad de complejo MHC de clase I unido a péptido que se recupera durante el ensayo. La recuperación de HLA-A2 se midió en presencia de 100, 10, 1 y 0,1 µM del péptido relevante. El valor de C50 se calculó para cada péptido como la concentración de péptido suficiente para una estabilización máxima del 50 %.

Estimulación antigénica de CSP

Para ampliar la sensibilidad del ensayo por inmunoadsorción de manchas ligado a enzimas (ELISPOT), antes de realizar el análisis, CSP se estimularon una vez *in vitro* con péptido[34]. El día 0, las CSP se descongelaron y se sembraron en placas en 2 ml/pocillo a una concentración de $2x10^{6}$ células en placas de 24 pocillos (Nunc) en medio X-vivo (BioWhittaker) con suero humano termoinactivado al 5% en presencia de péptido 10 µM (GenScript). Un día después, se añadieron 40 UI/ml de interleucina 2 recombinante (IL-2) (PeproTech) a los cultivos. El día 8, las células cultivadas se analizaron en el ensayo ELISPOT para IFN-γ.

Ensayo ELISPOT para IFN-γ

El ensayo ELISPOT se utilizó para cuantificar células efectoras liberadoras de INF-γ específicas de epítopos peptídicos como se describe anteriormente[17]. En algunos experimentos, antes del análisis y para ampliar la sensibilidad del ensayo, las CMSP se estimularon una vez *in vitro* con péptido, como se describe en [(34)]. Resumiendo, placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (MultiScreen MAIP N45, Millipore) se recubrieron con Ac anti-IFN-γ (1-D1 K; Mabtech). Los pocillos se lavaron, se bloquearon con medio X-vivo y las células efectoras se añadieron por duplicado a diferentes concentraciones celulares, con o sin péptido 10 µM. Las placas se incubaron durante una noche. Al día siguiente, el medio se descartó y los pocillos se lavaron antes de la adición de Ac secundario biotinilado (7-B6-1-Biotina; Mabtech). Las placas se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 2 h, se lavaron y a cada pocillo se le añadió conjugado de enzima-avidina (AP-Avidina, Calbiochem/Invitrogen Life Technologies). Las placas se incubaron a TA durante 1 hora y a cada pocillo se le añadió el sustrato enzimático NBT/BCIP (Invitrogen Life Technologies) y se incubó a TA durante 5-10 minutos. Tras la aparición de manchas de color púrpura oscuro, la reacción finalizó mediante un lavado con agua corriente. Las manchas se contaron utilizando el Analizador ImmunoSpot de la Serie 2.0 (Analizador de LTC) y la frecuencia de LTC específicos de péptido se pudo calcular a partir del número de células formadoras de manchas.

Citometría de flujo

Para las tinciones de tetrámeros, las CSP de pacientes con cáncer y de donantes sanos, así como los LIT (linfocitos infiltrantes de tumor) de pacientes con cáncer, se estimularon una vez *in vitro* con péptido, o se analizaron directamente *ex vivo*. Las células CD8 se aislaron de las CSP utilizando el kit de aislamiento Dynal de CD8- (Dynal Biotech) el día 7. Los cultivos de células T resultantes se tiñeron con tetrámero acoplado a PE, seguido de tinción de anticuerpos con los Acm (anticuerpos monoclonales) acoplados a fluorocromo: CD8-aloficocianina / CPA - Cy7, CD3 - FITC, CD3 - FITC, CD45RO - FITC, CD45RA - PE - Cy5 y CD28-aloficocianina (BD Immunocytometry Systems). Las tinciones de tetrámeros se realizaron en PBS + FCS al 2%, durante 15 min, TA, en la oscuridad, mientras que las tinciones de los anticuerpos se realizaron en PBS + FCS al 2%, 4 ºC, en la oscuridad. Los complejos tetraméricos de MHC utilizados fueron: HLA-A2 / IDO5 (ALLEIASCL) y HLA-A2 / HIV-1 pol1476-484 (ILKEPVHGV). Las muestras se analizaron en el clasificador BD FACSAria™, utilizando el programa informático DIVA (BD Biosciences)

Las líneas celulares de cáncer y las CD se examinaron utilizando citometría de flujo para detectar la expresión de IDO. Después de la fijación y permeabilización (Cytofix / Cytoperm, BD), las células se tiñeron con anticuerpo anti-IDO de ratón (Millipore Corporation) seguido de anticuerpo secundario anti-ratón marcado con FITC (DAKO). Para todos los experimentos, se incluyó un control negativo solo teñido con el anticuerpo secundario acoplado a FITC, para determinar la fluorescencia de fondo del anticuerpo secundario falsamente conectado y la auto-fluorescencia. La expresión de IDO se determinó utilizando el índice de tinción, definido como $IMF_{positiva} - IMF_{de\ fondo} / 2 \times SD_{de\ fondo}$ donde IFM es la intensidad media de fluorescencia. Las células se definieron positivas a IDO si el índice de tinción era > 1[21].

Las células cancerosas se examinaron para detectar la expresión de HLA-A2 utilizando citometría de flujo. Las células se tiñeron con un Acm HLA-A2 acoplado a fluorocromo (BD Bioscience). Para la comparación, las células se tiñeron con un control del mismo isotipo. Las muestras se analizaron en el clasificador BD FACSAria™, utilizando el programa informático DIVA (BD Biosciences). Suponiendo la normalidad, la expresión de HLA-A2 se obtuvo mediante una prueba unilateral de la T con dos muestras que compara la IMF de HLA-A2 y la IMF de control de isotipo, donde MFI es la intensidad media de fluorescencia 9. Para valores de p <0,05 (nivel de significación), las células se definieron como HLA-A2 +. El factor de expresión se definió como IMF de HLA-A2 / IMF de control de isotipo.

Células dendríticas (CD)

A partir de CMSP se generaron CD por adherencia en placas de cultivo a 37 ºC durante 60 min en RPMI-1640 enriquecido con suero AB humano al 10%. Los monocitos adherentes se cultivaron en RPMI-1640 complementado con suero AB humano al 10% en presencia de IL-4 (1000 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) durante 6 días. Las CD maduraron mediante la adición de IL-1β (2 ng / ml), IL-6 (1000 U / ml), TNF-α (10 ng / ml) y PGE2 (1 µg / ml).

Establecimiento de clones y cultivos de células T específicos de antígeno

CSP (células de sangre periférica) de pacientes con cáncer se estimularon con CD autólogas irradiadas (25 Gy) cargadas con IDO5 (proporción entre CSP:CD = 3×10^6:3×10^5), con β2m 3 µg/ml, IL-12 20 U/ml (PeproTech) e IL-7 40 U/ml (PeproTech). Los cultivos se estimularon cada 10 días con CD autólogas irradiadas (2x) seguido de CSP irradiadas (2x). Después de cada estimulación con CD, se añadieron IL-12 20 U/ml (PeproTech) e IL-7 40 U/ml (PeproTech) y después de cada estimulación con CSP, se añadieron IL-2 40 U/ml (PeproTech). Después de un mes, se evaluó la especificidad de los cultivos en crecimiento para IDO5 en un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar. Las CSP de un cultivo específico se clonaron por dilución limitante en presencia de 106/ml de CPS irradiadas (25 Gy) cargadas con IDO5 e IL-2 120 U/ml (PeproTech). Cada 3-4 días, se añadían medio reciente 50 µl que contenía IL-2

a una concentración final de 120 U/ml. Utilizando CSP cargadas con IDO ($5x10^4$ células/pocillo) e IL-2 120 U/ml, se expandieron clones en crecimiento. Después de la expansión se ensayaron los clones para determinar la especificidad y el potencial citotóxico en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr.

Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad mediada por LTC, se realizaron ensayos convencionales de liberación de ^{51}Cr como se describe anteriormente[35]. Las células diana eran células T2, CD maduras e inmaduras autólogas generadas *in vitro*, CD maduras e inmaduras alogénicas positivas a HLA-A2, monocitos autólogos aislados *in vivo*, células T y células B (aisladas utilizando microesferas con CD14+, CD3+ o CD19+ (MACS, *Magnetic Activated Cell Sorting*, clasificación celular por activación magnética)), la línea celular diana citolítica natural K562, blastos de LMA positivos a HLA-A2 enriquecidos *ex vivo* (aislados de la médula ósea de un paciente con LMA utilizando microesferas con CD19 + y CD3 + (MACS)), las líneas celulares de cáncer de mama positivas a HLA-A2 CAMA-1 y MDA-MB-231, las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 y SW480 positivas a HLA-A2 (encontrándose todas ellas disponibles en la *American Type Culture Collection* (ATCC)), y la línea celular de melanoma FM55M positiva a HLA-A2 (de la base de datos IPD-ESTDAB, disponible en www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/estdab/[36]). La lisis se bloqueó utilizando el Acm W6/32 específico de HLA (2 µg/100 µl)[37]. En algunos ensayos, las células cancerosas se trataron con IFN-γ 100 U/ml durante 2 días.

Enriquecimiento de blastos de LMA (Leucemia Mieloide Aguda)

Utilizando microesferas con CD19+ y CD3+ (MACS), respectivamente, se agotaron células B y T de la médula ósea de un paciente con LMA. Los blastos de LMA altamente enriquecidos (CD3-, CD19-) se utilizaron como células diana en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr.

Regulación por disminución de IDO en células cancerosas

La línea celular SW480 humana se transfectó con plásmidos de ARN de horquilla pequeña (ARNhp) indicados obtenidos en SuperArray utilizando FuGene6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Las células se sometieron a lisis directamente en tampón LSB (Sigma). Los lisados de LSB se hirvieron durante 5 min. y se cargaron en geles de proteína prefabricados al 10% (BioRad). Las proteínas se electro transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore Corporation) mediante un método de transferencia semiseco y se exploraron con los anticuerpos indicados según las instrucciones del fabricante. Las transferencias se revelaron con el sistema ECL obtenido en Amersham y con una cámara CCD (LAS-1000, Fujifilm). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Cdk7 (MO-1) (Santa Cruz) y anti-IDO (Millipore Corporation).

Epitopos de células T restringidos a HLA-A2 derivados de IDO

Utilizando algoritmos basados en los principales restos de anclaje específicos de HLA-A2 se seleccionaron once péptidos derivados de IDO y posteriormente se sintetizaron[16]. Después, utilizando el ensayo de secreción de IFN-γ ELISPOT, se examinaron células T de sangre periférica de pacientes con cáncer y de individuos sanos para detectar la presencia de respuestas de células T específicas contra estos péptidos derivados de IDO. Este enfoque ha demostrado ser, con anterioridad, muy efectivo para identificar linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos de tumor en pacientes con cáncer[17-19]. Por lo tanto, los linfocitos de sangre periférica (LSP) de pacientes con cáncer en fase tardía positivos a HLA-A2 (cáncer de mama, melanoma y carcinoma de células renales) se estimularon una vez con los diferentes péptidos *in vitro* antes del examen con ELISPOT. Este procedimiento se eligió para extender la sensibilidad del ELISPOT como se describe en[17,20]. Las respuestas del ELISPOT se detectaron contra IDO2 (IDO164-172; FLVSLLVEI), IDO6 (IDO 320-328; VLSKGDGL) y especialmente IDO5 (IDO199-207; ALLEIASCL) (Figura 1) Como control, se examinaron LSP de individuos sanos para determinar la reactividad contra estos tres péptidos derivados de IDO. No se pudieron detectar respuestas espontáneas contra ninguno de los péptidos derivados de IDO en ninguno de los controles sanos. Una búsqueda BLAST de las secuencias de aminoácidos de estos péptidos, utilizando la "base de datos del NCBI, *National Center for Biotechnology Information*", mostró que estos motivos solo eran frecuentes en la proteína IDO.

Ejemplo 2

(Los materiales y métodos son como se describe en el Ejemplo 1)

Detección de células T restringidas a HLA-A2 reactivas a IDO en pacientes con cáncer

El péptido aparentemente más inmunogénico derivado de IDO, es decir, IDO5, se examinó con respecto a su afinidad de unión a HLA-A2 por comparación con un epítopo de control positivo de alta afinidad por HLA-A2, es decir, VIH4 pol476-484 (ILKEPVHGV), mediante el ensayo de ensamblaje (Fig. 2a). Cabe destacar que, IDO5 se unió a HLA-A2 incluso mejor que el epítopo de control de alta afinidad. La alta afinidad de unión de IDO5 a HLA-A2 nos permitió fabricar tetrámeros HLA-A2 / IDO5 estables, que se utilizaron para detectar LTC reactivos a IDO mediante citometría de flujo. Este análisis confirmó claramente la presencia de células T CD8 reactivas a IDO5 en la

sangre de pacientes con cáncer positivo a HLA-A2 (Fig. 2). La figura 2b ilustra un ejemplo de una respuesta de células T específicas de IDO5 después de la estimulación *in vitro* en un paciente con carcinoma de células renales con un complejo tetramérico de VIH utilizado como control. Mientras que la frecuencia de las células T reactivas a IDO aumentó notablemente con la estimulación *in vitro*, las células T reactivas a IDO fueron fácilmente detectables *ex vivo* en pacientes seleccionados (Fig. 2c): En los tres pacientes con respuestas más fuertes después de la estimulación *in vitro*, también se detectó una reactividad respectiva *ex vivo*. En general, se analizaron LSP de 7 individuos sanos positivos a HLA-A2 y de 11 pacientes positivos a HLA-A2, que revelaron una frecuencia promedio de 0,03 % de células reactivas a IDO del total de células T CD8 + después de la estimulación *in vitro* en pacientes con cáncer, en comparación con 0,001 % en donantes sanos (Fig.2c)

No pudieron detectarse células T reactivas a IDO en ninguno de los donantes sanos (Fig. 2b). Las tinciones *ex vivo* de las células T reactivas a IDO mostraron que las células T de origen natural, específicas de IDO5, tenían un fenotipo de memoria central/efectora CD45RA-CD28+ [(34)]. En la figura 2d se muestra un ejemplo de dicho fenotipo tiñendo *ex vivo* células seleccionadas con tetrámero IDO5. Como comparación, la muestra se tiñó con controles del mismo isotipo. A continuación, se examinó la presencia de células T específicas de IDO5 en cultivos de LIT (linfocitos infiltrantes de tumor) tratados con IL-2 de pacientes con melanoma y con cáncer de cabeza y cuello HLA-A2+ mediante tinciones de tetrámero. Como se ilustra en la figura 2e, las células T específicas de IDO5 podían detectarse fácilmente entre los LIT. En general, 4 de los 5 pacientes analizados tenían células T específicas de IDO5 detectables. Del mismo modo, las células T específicas de IDO5 en cultivos de LIT de pacientes con melanoma y con cáncer de cabeza y cuello podían detectarse en un ensayo ELISPOT (datos no mostrados). Para controlar la especificidad del tetrámero HLA-A2 / IDO5, se tiñó un clon de células T específico de IDO5. El tetrámero HLA-A2 / IDO5 tiñó eficazmente el clon de células T específico de IDO5, mientras que el clon de células T no se tiñó con el tetrámero de control HLAA2 / VIH (Fig. 2f).

Ejemplo 3

(Los materiales y métodos son como se describe en el Ejemplo 1)

Capacidad funcional de células T específicas de IDO

Habiendo identificado pacientes que presentaban respuestas contra el péptido IDO5, se utilizaron LSP de dichos pacientes para generar cultivos masivos de LTC contra este péptido *in vitro*. Los LSP fueron estimulados por CD autólogas pulsadas con IDO5. Después de cuatro rondas de estimulación, la especificidad del péptido se analizó en ensayos estándar de liberación de ^{51}Cr. Las células de estos cultivos masivos produjeron la lisis de células T2 deficientes en TAP pulsadas con péptidos IDO5. Para analizar la capacidad lítica de las células T específicas de IDO con más detalle, se establecieron clones de LTC a partir de estos cultivos masivos limitando la clonación por dilución. Después de un corto período de expansión, la especificidad de los clones en crecimiento se analizó en ensayos estándar de liberación de ^{51}Cr. De treinta y tres clones de células T que presentaban una capacidad lítica específica de IDO, se seleccionaron cuatro clones para una expansión adicional debido a una tasa de crecimiento superior. En la figura 3a se muestra un clon representativo de células T: el clon de células T RBS35 destruyó de manera eficaz las células T2 pulsadas con IDO5 mientras que no se produjo la lisis de las células T2 sin péptido (FIG. 3a)

Ejemplo 4

(Los materiales y métodos son como se describe en el Ejemplo 1)

Destrucción de dianas tumorales por células T específicas de IDO

La expresión de IDO se examinó en diversas líneas celulares de cáncer y CD mediante tinción de proteína intracelular seguido de análisis FACS (*Fluorescence-activated cell sorting,* clasificación de células activadas por fluorescencia)[21]. Para este fin, la línea celular de cáncer de colon SW480, la línea celular de melanoma FM55M, las líneas celulares de cáncer de mama CAMA-1 y MDA-MB231, los blastos de LMA enriquecidos directamente y las CD maduras eran positivos a IDO. Solo la línea celular de cáncer de colon HCT-116 y las CD inmaduras eran negativas a IDO. Además, el tratamiento con IFN-γ de las líneas celulares de cáncer aumentó la expresión de IDO.

En los histogramas de la figura 4 se ilustran ejemplos representativos de tinciones de IDO.

Es importante destacar que, el clon de células T RBS35 no solo destruyó las células T2 pulsadas con péptido sino también la línea celular de cáncer de colon HLA-A2 +, IDO+ SW480 (Fig. 3b) con alta eficacia. Por el contrario, el clon RBS35 no produjo la lisis de la línea celular de cáncer de colon HLA-A2+/IDO- HCT-116 (Fig. 3b). La restricción de RBS35 a HLA se confirmó bloqueando HLA-clase I utilizando el Acm W6/32 específico de HLA, lo que anuló por completo la lisis de las células diana SW480 (Fig. 3b). De manera similar, el clon RBS35 destruyó la línea celular de melanoma HLA-A2+/IDO+ FM55M (Fig. 3c). Los ensayos de inhibición dirigida realizados con frio, utilizando células T2 no marcadas pulsadas con el péptido IDO5 (10 μM) confirmaron la especificidad de la destrucción de HLA-A2/péptido: La adición de células T2 pulsadas con IDO5 en frío (sin marcar) anuló completamente la destrucción de

células de melanoma FM55M, mientras que la adición de células T2 en frio sin péptido no tuvo ningún efecto sobre la destrucción de FM55M (Fig. 3c). Tampoco tuvo ningún efecto la adición de células T2 en frio pulsadas con un péptido irrelevante (HIV-1 pol1476-484) sobre la destrucción del clon FM55M (Fig. 7a). No se observó citotoxicidad contra la línea celular diana de células NK, K562 (Fig. 7a).

Además, se analizó la capacidad de RBS35 para producir la lisis de blastos de LMA HLA-A2+ humanos enriquecidos directamente *ex vivo* de la médula ósea de pacientes con LMA. Para este propósito, se agotaron células T (CD3+) y células B (CD19+) de la médula ósea de pacientes con LMA HLA-A2+; los blastos de LMA altamente enriquecidos (CD3, CD19) se utilizaron posteriormente como células diana en un ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr. Como se muestra en la figura 3d; RBS35 producía eficazmente la lisis de las células de leucemia de una manera dependiente de HLA. Se enriquecieron blastos de LMA de seis pacientes (5 pacientes con HLA-A2 + y 1 paciente con HLA-A2) y todos estos expresaron IDO (datos no mostrados). RBS35 producía eficazmente la lisis de las células de leucemia HLA-A2+ de una manera dependiente de HLA, mientras que no se produjo la lisis de las células de leucemia HLA-A2 (Fig. 7b).

Para ilustrar la destrucción representativa de dianas tumorales por RBS35, en las figuras 7c y 7d se muestra la destrucción de SW480 por un cultivo masivo específico de IDO5 policlonal, así como de otros tres clones de células T (RBS26, RBS31, RBS46). De manera similar a RBS35, ninguno de estos clones (RBS26, RBS31, RBS46) produjo la lisis de la línea celular de cáncer de colon HLA-A2+/IDO-, HCT-116 (Fig. 7d)

Finalmente, se examinó la destrucción de las líneas celulares de cáncer de mama HLA-A2, CAMA-1 y MDA-MB-231. La línea celular CAMA-1 fue destruida por el clon RBS35 (Fig. 5a), mientras que dicho clon no reconoció la línea celular MDA-MB-231 (Fig. 5b). El tratamiento con INF-γ aumentó la expresión de IDO en ambas líneas celulares. De acuerdo con esto, el tratamiento con INF-γ aumentó la destrucción de CAMA-1 por RBS35 e introdujo la destrucción de las células MDA-MB-231 (Fig. 5)

Además, se mostró que la destrucción por un cultivo masivo específico de IDO5 policlonal y el clon RBS35 eran realmente específicos de IDO. Por lo tanto, utilizando ARNhp de IDO se regula por disminución la expresión de la proteína IDO en la línea celular de cáncer de colon SW480 humana y de ese modo estas células tumorales se rescatan de la destrucción (Fig. 5d). Esta regulación por disminución se visualizó mediante tinciones de proteína intracelular. Estas tinciones confirmaron que el uso de ARNhp de IDO reducía el nivel de expresión de la proteína IDO en las células (Fig. 5e). Posteriormente, las células transfectadas se utilizaron como células diana en un ensayo de liberación de ^{51}Cr. Las células cancerosas transfectadas con ARNhp de IDO no fueron reconocidas por el cultivo masivo específico de IDO policlonal, mientras que, como se ilustra en la figura 5c, las células transfectadas con ARNhp de control irrelevante se destruyeron.

Ejemplo 5

(Los materiales y métodos son como se describe en el Ejemplo 1)

Eliminación de células inmunitarias competentes por células T específicas de IDO

La expresión de IDO no está restringida a tumor y a células tumorales del estroma, sino que también puede inducirse en células inmunitarias. Por lo tanto, como siguiente etapa e incluso como etapa más importante se abordó la cuestión de si las CD que expresaban IDO también serían susceptibles de destruirse por LTC reactivos a IDO. Para ensayar esta idea, se generaron CD autólogas de los mismos donantes de los que se habían generado los clones de LTC; las DC maduraron mediante la adición de un cóctel de maduración estándar que consiste en IL-113, IL-6, TNF-α y PGE2[22]. RBS35 eliminó eficazmente las CD maduras. Por el contrario, las CD IDO- inmaduras autólogas no se destruyeron con RBS35 (Fig. 6a). Por otra parte, se examinó el reconocimiento de CD maduras IDO+, así como el de CD inmaduras IDO- de un donante de HLA-A2+ por RBS35. Las CD maduras alogénicas fueron destruidas por RBS35 ya que las CD inmaduras IDO- procedían del mismo donante (Fig.6b)

En la figura 6c se ilustra que las CDm expresan IDO a diferencia de las CDi. A continuación, se ensayó la capacidad de RBS35 para producir la lisis de monocitos autólogos, células T y células B. Para este propósito, se aislaron monocitos CD14+, células T CD3+ y células B CD19+ directamente *ex vivo* de CMSP IDO+. Las células aisladas se utilizaron después como células diana en un ensayo de liberación de ^{51}Cr. RBS35 no causó la lisis de monocitos CD14+ autólogos, células T CD3+ y células B CD19+ (Figura 6d).

Finalmente, se creó un modelo *in vitro* para examinar si las células T específicas de IDO potenciaban las respuestas inmunitarias al agotar las células supresoras que expresaban IDO. Por lo tanto, se trataron cultivos de CMSP con IFN-γ para aumentar la actividad inmunitaria así como la expresión de IDO en los cultivos con y sin células T específicas de IDO autólogas. Al cabo de cinco días, la reactividad inmunitaria contra el epítopo inmunodominante restringido a HLA-A2 del VEB BMLF1280-288 (GLCTLVAML) se examinó en los cultivos. Aunque el número total de células fue el mismo en los cultivos, la reactividad contra el péptido del VEB fue mayor en los cultivos con células T específicas de IDO (FIG. 6E). A continuación, se examinó detenidamente si la adición de células T específicas de IDO aumentaba la inmunorreactividad a un grado que permitía la detección de respuestas del VEB en un ELISPOT

solo con 104 CMSP muy por debajo del límite de detección normal. De hecho, se podría detectar una clara respuesta del VEB incluso a esta baja concentración de CMSP (FIG. 6e). Como era de esperar, no fue posible detectar ninguna respuesta del VEB a esta baja concentración de células en el cultivo sin células T específicas de IDO (Fig. 6e).

Listado de Referencias

Popov & Schultze; J Mol Med. 2008 Feb;86(2):145-60. Epub 2007 Sep 18

Nicolette CA, Healey D, Tcherepanova I, Whelton P, Monesmith T, Coombs L, Finke LH, Whiteside T, Miesowicz F, (2007). Dendritic cells for active immunotherapy: optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products. Vaccine, Sep 27;25 Suppl 2:B47-60. Epub 2007

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. N Engl J Med. 1995 Oct 19;333(16): 1038-44

Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science. 2006 Oct 6;314(5796):126-9. Epub 2006 Aug 31.

Schaft N, Dörrie J, Müller I, Beck V, Baumann S, Schunder T, Kämpgen E, Schuler G. A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. Cancer Immunol Immunother. 2006 Sep;55(9):1132-41. Epub 2005 Dec 13

1. Morris E, Hart D, Gao L, et al: Generation of tumor-specific T-cell therapies. Blood Rev 20:61-69, 2006

3. Platten M, Ho PP, Youssef S, et al: Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. Science 310:850-855, 2005

4. Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, et al: Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. Transpl Int 18:95-100, 2005

7. Sharma MD, Baban B, Chandler P, et al: Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. J Clin Invest 117:2570-2582, 2007

8. Munn DH, Sharma MD, Hou D, et al: Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. J Clin Invest 114:280-290, 2004

9. Thebault P, Condamine T, Heslan M, et al: Role of IFNgamma in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. Am J Transplant 7:2472-2482, 2007

10. Baban B, Hansen AM, Chandler PR, et al: A minor population of splenic dendritic cells expressing CD19 mediates IDO-dependent T cell suppression via type I IFN signaling following B7 ligation. Int Immunol 17:909-919, 2005

11. Zou W: Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. Nat Rev Cancer 5:263-274, 2005

12. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, et al: Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. Nat Med 9:1269-1274, 2003

13. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, et al: Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. Clin Cancer Res 11:6030-6039, 2005

14. Weinlich G, Murr C, Richardsen L, et al: Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. Dermatology 214:8-14, 2007

15. Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, et al: Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. Blood.: 2007

16. Andersen MH, Tan L, Sondergaard I, et al: Poor correspondence between predicted and experimental binding of peptides to class I MHC molecules. Tissue Antigens 55:519-531,2000

17. Andersen MH, Pedersen LO, Becker JC, et al: Identification of a Cytotoxic T Lymphocyte Response to the

Apoptose Inhibitor Protein Survivin in Cancer Patients. Cancer Res 61:869-872, 2001

18. Scheibenbogen C, Sun Y, Keilholz U, et al: Identification of known and novel immunogenic T-cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cells from patients responding to IL-2-based treatment. Int J Cancer 20;98:409-414, 2002

19. Herr W, Ranieri E, Gambotto A, et al: Identification of naturally processed and HLA-presented Epstein-Barr virus peptides recognized by CD4(+) or CD8(+) T lymphocytes from human blood. Proc Natl Acad Sci U S A 96:12033-12038, 1999

20. Keilholz U, Weber J, Finke JH, et al: Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy. J Immunother 25:97-138, 2002

21. Maecker HT, Frey T, Nomura LE, et al: Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. Cytometry A 62:169-173, 2004

22. Nguyen XD, Eichler H, Sucker A, et al: Collection of autologous monocytes for dendritic cell vaccination therapy in metastatic melanoma patients. Transfusion 42:428-432,2002

23. Hwang SL, Chung NP, Chan JK, et al: Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. Cell Res 15:167-175, 2005

24. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, et al: HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. Blood 109:3351-3359,2007

25. Wobser M, Voigt H, Houben R, et al: Dendritic cell based antitumor vaccination: impact of functional indoleamine 2,3-dioxygenase expression. Cancer Immunol Immunother 56:1017-1024, 2007

26. Popov A, Schultze JL: IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. J Mol Med .: 2007

27. Scheler M, Wenzel J, Tuting T, et al: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): the antagonist of type I interferon-driven skin inflammation? Am J Pathol 171:1936-1943, 2007

28. Choi BK, Kim YH, Kang WJ, et al: Mechanisms involved in synergistic anticancer immunity of anti-4-1BB and anti-CD4 therapy. Cancer Res 67:8891-8899, 2007

29. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ, et al: Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. J Clin Oncol %20;24:2283-2289, 2006

30. Sanderson K, Scotland R, Lee P, et al: Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. J Clin Oncol 23:741-750, 2005

31. Maker AV, Phan GQ, Attia P, et al: Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. Ann Surg Oncol 12:1005-1016, 2005

32. Rammensee HG, Falk K, Roetzschke O: MHC molecules as peptide receptors. Curr Biol 5:35-44, 1995

33. Elvin J, Cerundolo V, Elliott T, et al: A quantitative assay of peptide-dependent class I assembly. Eur J Immunol 21:2025-2031, 1991

34. McCutcheon M, Wehner N, Wensky A, et al: A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. J Immunol Methods 210:149-166, 1997

35. Andersen MH, Bonfill JE, Neisig A, et al: Phosphorylated Peptides Can Be Transported by TAP Molecules, Presented by Class I MHC Molecules, and Recognized by Phosphopeptide-Specific CTL. J Immunol 163:3812-3818, 1999

36. Pawelec G, Marsh SG: ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank. Cancer Immunol Immunother 55:623-627,2006

37. Schmidt SM, Schag K, Muller MR, et al: Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. Blood 102:571-576, 2003

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Region Hovedstaden Herlev Hospital

<120> Inmunoterapia basada en indolamina 2,3-dioxigenasa

<130> P1851pc00

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 403
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Met Ala His Ala Met Glu Asn Ser Trp Thr Ile Ser Lys Glu Tyr His
1               5                  10                  15

Ile Asp Glu Glu Val Gly Phe Ala Leu Pro Asn Pro Gln Glu Asn Leu
            20                  25                  30

Pro Asp Phe Tyr Asn Asp Trp Met Phe Ile Ala Lys His Leu Pro Asp
        35                  40                  45

Leu Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg Glu Arg Val Glu Lys Leu Asn Met
    50                  55                  60

Leu Ser Ile Asp His Leu Thr Asp His Lys Ser Gln Arg Leu Ala Arg
65                  70                  75                  80

Leu Val Leu Gly Cys Ile Thr Met Ala Tyr Val Trp Gly Lys Gly His
                85                  90                  95

Gly Asp Val Arg Lys Val Leu Pro Arg Asn Ile Ala Val Pro Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Leu Ser Lys Lys Leu Glu Leu Pro Pro Ile Leu Val Tyr Ala Asp
        115                 120                 125

Cys Val Leu Ala Asn Trp Lys Lys Lys Asp Pro Asn Lys Pro Leu Thr
    130                 135                 140

Tyr Glu Asn Met Asp Val Leu Phe Ser Phe Arg Asp Gly Asp Cys Ser
145                 150                 155                 160

Lys Gly Phe Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Ser
                165                 170                 175

Ala Ile Lys Val Ile Pro Thr Val Phe Lys Ala Met Gln Met Gln Glu
            180                 185                 190
```

```
Arg Asp Thr Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu Glu
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Gln Val Phe His Gln Ile His Asp His Val Asn Pro Lys
    210                 215                 220

Ala Phe Phe Ser Val Leu Arg Ile Tyr Leu Ser Gly Trp Lys Gly Asn
225                 230                 235                 240

Pro Gln Leu Ser Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Phe Trp Glu Asp Pro
                245                 250                 255

Lys Glu Phe Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gln Ser Ser Val Phe Gln Cys
            260                 265                 270

Phe Asp Val Leu Leu Gly Ile Gln Gln Thr Ala Gly Gly Gly His Ala
        275                 280                 285

Ala Gln Phe Leu Gln Asp Met Arg Arg Tyr Met Pro Pro Ala His Arg
    290                 295                 300

Asn Phe Leu Cys Ser Leu Glu Ser Asn Pro Ser Val Arg Glu Phe Val
305                 310                 315                 320

Leu Ser Lys Gly Asp Ala Gly Leu Arg Glu Ala Tyr Asp Ala Cys Val
                325                 330                 335

Lys Ala Leu Val Ser Leu Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val Thr Lys
            340                 345                 350

Tyr Ile Leu Ile Pro Ala Ser Gln Gln Pro Lys Glu Asn Lys Thr Ser
        355                 360                 365

Glu Asp Pro Ser Lys Leu Glu Ala Lys Gly Thr Gly Gly Thr Asp Leu
    370                 375                 380

Met Asn Phe Leu Lys Thr Val Arg Ser Thr Thr Glu Lys Ser Leu Leu
385                 390                 395                 400

Lys Glu Gly
```

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Gln Leu Arg Glu Arg Val Glu Lys Leu
1               5
```

<210> 3
<211> 9
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Thr Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Phe Ile Ala Lys His Leu Pro Asp Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Val Leu Ser Lys Gly Asp Ala Gly Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Asp Leu Met Asn Phe Leu Lys Thr Val
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Val Leu Leu Gly Ile Gln Gln Thr Ala
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Lys Val Leu Pro Arg Asn Ile Ala Val
1 5

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Lys Leu Asn Met Leu Ser Ile Asp His Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Ser Leu Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val
1 5 10

<210> 13
<211> 256
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

```
Met Asp Val Leu Phe Ser Phe Arg Asp Gly Asp Cys Ser Lys Gly Phe
1               5                  10                  15

Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Ser Ala Ile Lys
            20                  25                  30

Val Ile Pro Thr Val Phe Lys Ala Met Gln Met Gln Glu Arg Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu Glu Lys Ala Leu
    50                  55                  60

Gln Val Phe His Gln Ile His Asp His Val Asn Pro Lys Ala Phe Phe

65                  70                  75                  80

Ser Val Leu Arg Ile Tyr Leu Ser Gly Trp Lys Gly Asn Pro Gln Leu
                85                  90                  95

Ser Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Phe Trp Glu Asp Pro Lys Glu Phe
            100                 105                 110

Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gln Ser Ser Val Phe Gln Cys Phe Asp Val
        115                 120                 125

Leu Leu Gly Ile Gln Gln Thr Ala Gly Gly Gly His Ala Ala Gln Phe
    130                 135                 140

Leu Gln Asp Met Arg Arg Tyr Met Pro Pro Ala His Arg Asn Phe Leu
145                 150                 155                 160

Cys Ser Leu Glu Ser Asn Pro Ser Val Arg Glu Phe Val Leu Ser Lys
                165                 170                 175

Gly Asp Ala Gly Leu Arg Glu Ala Tyr Asp Ala Cys Val Lys Ala Leu
            180                 185                 190

Val Ser Leu Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val Thr Lys Tyr Ile Leu
        195                 200                 205

Ile Pro Ala Ser Gln Gln Pro Lys Glu Asn Lys Thr Ser Glu Asp Pro
    210                 215                 220

Ser Lys Leu Glu Ala Lys Gly Thr Gly Gly Thr Asp Leu Met Asn Phe
225                 230                 235                 240

Leu Lys Thr Val Arg Ser Thr Thr Glu Lys Ser Leu Leu Lys Glu Gly
                245                 250                 255
```

<210> 14
<211> 405
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

```
Met Ala His Ala Met Glu Asn Ser Trp Thr Ile Ser Lys Glu Tyr His
1               5                  10                  15

Ile Asp Glu Glu Val Gly Phe Ala Leu Pro Asn Pro Gln Glu Asn Leu
            20                  25                  30

Pro Asp Phe Tyr Asn Asp Trp Met Phe Ile Ala Lys His Leu Pro Asp
        35                  40                  45

Leu Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg Glu Arg Val Glu Lys Leu Asn Met
```

```
    50                  55                  60

Leu Ser Ile Asp His Leu Thr Asp His Lys Ser Gln Arg Leu Ala Arg
65                  70                  75                  80

Leu Val Leu Gly Cys Ile Thr Met Ala Tyr Val Trp Gly Lys Gly His
                85                  90                  95

Gly Asp Val Arg Lys Val Leu Pro Arg Asn Ile Ala Val Pro Tyr Cys
            100                 105                 110

Gln Leu Ser Lys Lys Leu Glu Leu Pro Pro Ile Leu Val Tyr Ala Asp
        115                 120                 125

Cys Val Leu Ala Asn Trp Lys Lys Lys Asp Pro Asn Lys Pro Leu Thr
    130                 135                 140

Tyr Glu Asn Met Asp Val Leu Phe Ser Phe Arg Asp Gly Asp Cys Ser
145                 150                 155                 160

Lys Gly Phe Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Ser
                165                 170                 175

Ala Ile Lys Val Ile Pro Thr Val Phe Lys Ala Met Gln Met Gln Glu
            180                 185                 190

Arg Asp Thr Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu Glu
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Gln Val Phe His Gln Ile His Gly Lys Tyr His Val Asn
    210                 215                 220

Pro Lys Ala Phe Phe Ser Val Leu Arg Ile Tyr Leu Ser Gly Trp Lys
225                 230                 235                 240

Gly Asn Pro Gln Leu Ser Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Phe Trp Glu
                245                 250                 255

Asp Pro Lys Glu Phe Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gln Ser Ser Val Phe
            260                 265                 270

Gln Cys Phe Asp Val Leu Leu Gly Ile Gln Gln Thr Ala Gly Gly Gly
        275                 280                 285

His Ala Ala Gln Phe Leu Gln Asp Met Arg Arg Tyr Met Pro Pro Ala
    290                 295                 300

His Arg Asn Phe Leu Cys Ser Leu Glu Ser Asn Pro Ser Val Arg Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Phe Val Leu Ser Lys Gly Asp Ala Gly Leu Arg Glu Ala Tyr Asp Ala
                325                 330                 335

Cys Val Lys Ala Leu Val Ser Leu Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val
            340                 345                 350

Thr Lys Tyr Ile Leu Ile Pro Ala Ser Gln Gln Pro Lys Glu Asn Lys
        355                 360                 365

Thr Ser Glu Asp Pro Ser Lys Leu Glu Ala Lys Gly Thr Gly Gly Thr
    370                 375                 380

Asp Leu Met Asn Phe Leu Lys Thr Val Arg Ser Thr Thr Glu Lys Ser
385                 390                 395                 400

Leu Leu Lys Glu Gly
                405
```

<210> 15
<211> 258
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

```
Met Asp Val Leu Phe Ser Phe Arg Asp Gly Asp Cys Ser Lys Gly Phe
1               5                   10                  15

Phe Leu Val Ser Leu Leu Val Glu Ile Ala Ala Ala Ser Ala Ile Lys
            20                  25                  30

Val Ile Pro Thr Val Phe Lys Ala Met Gln Met Gln Glu Arg Asp Thr
        35                  40                  45

Leu Leu Lys Ala Leu Leu Glu Ile Ala Ser Cys Leu Glu Lys Ala Leu
    50                  55                  60

Gln Val Phe His Gln Ile His Gly Lys Tyr His Val Asn Pro Lys Ala
65                  70                  75                  80

Phe Phe Ser Val Leu Arg Ile Tyr Leu Ser Gly Trp Lys Gly Asn Pro
                85                  90                  95

Gln Leu Ser Asp Gly Leu Val Tyr Glu Gly Phe Trp Glu Asp Pro Lys
            100                 105                 110

Glu Phe Ala Gly Gly Ser Ala Gly Gln Ser Ser Val Phe Gln Cys Phe
        115                 120                 125

Asp Val Leu Leu Gly Ile Gln Gln Thr Ala Gly Gly Gly His Ala Ala
    130                 135                 140
```

```
Gln Phe Leu Gln Asp Met Arg Arg Tyr Met Pro Pro Ala His Arg Asn
145                 150                 155                 160

Phe Leu Cys Ser Leu Glu Ser Asn Pro Ser Val Arg Glu Phe Val Leu
                165                 170                 175

Ser Lys Gly Asp Ala Gly Leu Arg Glu Ala Tyr Asp Ala Cys Val Lys
            180                 185                 190

Ala Leu Val Ser Leu Arg Ser Tyr His Leu Gln Ile Val Thr Lys Tyr
        195                 200                 205

Ile Leu Ile Pro Ala Ser Gln Gln Pro Lys Glu Asn Lys Thr Ser Glu
    210                 215                 220

Asp Pro Ser Lys Leu Glu Ala Lys Gly Thr Gly Gly Thr Asp Leu Met
225                 230                 235                 240

Asn Phe Leu Lys Thr Val Arg Ser Thr Thr Glu Lys Ser Leu Leu Lys
                245                 250                 255

Glu Gly
```

<210> 16
<211> 402
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

```
Met Glu Pro His Arg Pro Asn Val Lys Thr Ala Val Pro Leu Ser Leu
1               5                   10                  15

Glu Ser Tyr His Ile Ser Glu Glu Tyr Gly Phe Leu Leu Pro Asp Ser
            20                  25                  30

Leu Lys Glu Leu Pro Asp His Tyr Arg Pro Trp Met Glu Ile Ala Asn
        35                  40                  45

Lys Leu Pro Gln Leu Ile Asp Ala His Gln Leu Gln Ala His Val Asp
    50                  55                  60

Lys Met Pro Leu Leu Ser Cys Gln Phe Leu Lys Gly His Arg Glu Gln
65                  70                  75                  80

Arg Leu Ala His Leu Val Leu Ser Phe Leu Thr Met Gly Tyr Val Trp
                85                  90                  95

Gln Glu Gly Glu Ala Gln Pro Ala Glu Val Leu Pro Arg Asn Leu Ala
            100                 105                 110
```

```
Leu Pro Phe Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Leu Pro Pro Ile Leu
        115                 120                 125

Val His Ser Asp Leu Val Leu Thr Asn Trp Thr Lys Lys Asp Pro Asp
    130                 135                 140

Gly Asn Leu Glu Thr Ile Ile Ser Phe Pro Gly Gly Glu Ser Leu His
145                 150                 155                 160

Gly Phe Ile Leu Val Thr Ala Leu Val Glu Lys Glu Ala Val Pro Gly
                165                 170                 175

Ile Lys Ala Leu Val Gln Ala Thr Asn Ala Ile Leu Gln Pro Asn Gln
            180                 185                 190

Glu Ala Leu Leu Gln Ala Leu Gln Arg Leu Arg Leu Ser Ile Gln Asp
        195                 200                 205

Ile Thr Lys Thr Leu Gly Gln Met His Asp Tyr Val Asp Pro Asp Ile
    210                 215                 220

Phe Tyr Ala Gly Ile Arg Ile Phe Leu Ser Gly Trp Lys Asp Asn Pro
225                 230                 235                 240

Ala Met Pro Ala Gly Leu Met Tyr Glu Gly Val Ser Gln Glu Pro Leu
                245                 250                 255

Lys Tyr Ser Gly Gly Ser Ala Ala Gln Ser Thr Val Leu His Ala Phe
            260                 265                 270

Asp Glu Phe Leu Gly Ile Arg His Ser Lys Glu Ser Gly Asp Phe Leu
        275                 280                 285

Tyr Arg Met Arg Asp Tyr Met Pro Pro Ser His Lys Ala Phe Ile Glu
    290                 295                 300

Asp Ile His Ser Ala Pro Ser Leu Arg Asp Tyr Ile Leu Ser Ser Gly
305                 310                 315                 320

Gln Asp His Leu Leu Thr Ala Tyr Asn Gln Cys Val Gln Ala Leu Ala
                325                 330                 335

Glu Leu Arg Ser Tyr His Ile Thr Met Val Thr Lys Tyr Leu Ile Thr
            340                 345                 350

Ala Ala Ala Lys Ala Lys His Gly Lys Pro Asn His Leu Pro Gly Pro
        355                 360                 365

Pro Gln Ala Leu Lys Asp Arg Gly Thr Gly Gly Thr Ala Val Met Ser
    370                 375                 380
```

Phe Leu Lys Ser Val Arg Asp Lys Thr Leu Glu Ser Ile Leu His Pro
385 390 395 400

Arg Gly

<210> 17
<211> 1572
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

aatttctcac tgcccctgtg ataaactgtg gtcactggct gtggcagcaa ctattataag 60
atgctctgaa aactcttcag acactgaggg gcaccagagg agcagactac aagaatggca 120
cacgctatgg aaaactcctg gacaatcagt aaagagtacc atattgatga agaagtgggc 180
tttgctctgc caaatccaca ggaaaatcta cctgattttt ataatgactg gatgttcatt 240
gctaaacatc tgcctgatct catagagtct ggccagcttc gagaaagagt tgagaagtta 300
aacatgctca gcattgatca tctcacagac cacaagtcac agcgccttgc acgtctagtt 360
ctgggatgca tcaccatggc atatgtgtgg ggcaaaggtc atggagatgt ccgtaaggtc 420
ttgccaagaa atattgctgt tccttactgc caactctcca agaaactgga actgcctcct 480
attttggttt atgcagactg tgtcttggca aactggaaga aaaaggatcc taataagccc 540
ctgacttatg agaacatgga cgttttgttc tcatttcgtg atggagactg cagtaaagga 600
ttcttcctgg tctctctatt ggtggaaata gcagctgctt ctgcaatcaa agtaattcct 660
actgtattca aggcaatgca aatgcaagaa cgggacactt tgctaaaggc gctgttggaa 720
atagcttctt gcttggagaa agcccttcaa gtgtttcacc aaatccacga tcatgtgaac 780
ccaaaagcat ttttcagtgt tcttcgcata tatttgtctg gctggaaagg caacccccag 840
ctatcagacg gtctggtgta tgaagggttc tgggaagacc caaaggagtt tgcagggggc 900
agtgcaggcc aaagcagcgt ctttcagtgc tttgacgtcc tgctgggcat ccagcagact 960
gctggtggag gacatgctgc tcagttcctc caggacatga gaagatatat gccaccagct 1020
cacaggaact tcctgtgctc attagagtca aatccctcag tccgtgagtt tgtcctttca 1080
aaaggtgatg ctggcctgcg ggaagcttat gacgcctgtg tgaaagctct ggtctccctg 1140
aggagctacc atctgcaaat cgtgactaag tacatcctga ttcctgcaag ccagcagcca 1200
aaggagaata agacctctga agacccttca aaactggaag ccaaaggaac tggaggcact 1260
gatttaatga atttcctgaa gactgtaaga agtacaactg agaaatccct tttgaaggaa 1320
ggttaatgta acccaacaag agcacatttt atcatagcag agacatctgt atgcattcct 1380
gtcattaccc attgtaacag agccacaaac taatactatg caatgtttta ccaataatgc 1440
aatacaaaag acctcaaaat acctgtgcat ttcttgtagg aaaacaacaa aaggtaatta 1500
tgtgtaatta tactagaagt tttgtaatct gtatcttatc attggaataa aatgacattc 1560

aataaataaa aa 1572

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna, que comprende:

a) un fragmento peptídico, inmunogénicamente activo, de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) de SEQ ID NO: 1, que consiste en hasta 25 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6; y
b) un adyuvante

para su uso como un medicamento.

2. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho fragmento peptídico, inmunogénicamente activo, tiene

a) una longitud de hasta 11 aminoácidos; o
b) una longitud de 18 a 25 aminoácidos.

3. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho fragmento peptídico, inmunogénicamente activo, consiste en la SEQ ID NO: 6.

4. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en GM-CSF, adyuvantes basados en ADN bacteriano, adyuvantes basados en aceite/tensioactivo, adyuvantes basados en ARNbc de virus e imidazoquinilinas.

5. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el adyuvante es un adyuvante Montanide ISA o GM-CSF.

6. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el adyuvante es Montanide ISA 51 o Montanide ISA 720.

7. Un péptido aislado de hasta 25 restos de aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 1, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

8. El péptido aislado de la reivindicación 7, que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 6.

9. La composición de vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho uso es en un método para el tratamiento o la prevención del cáncer.

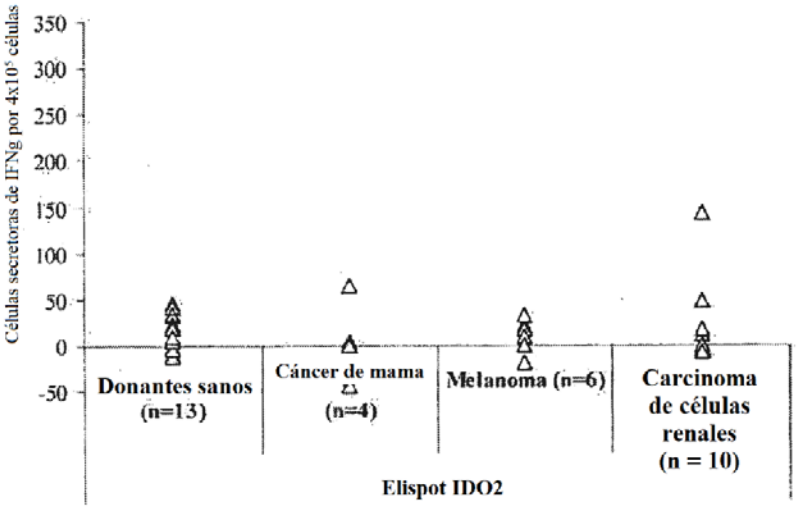
10. El péptido de la reivindicación 7 u 8, para su uso en un método para el tratamiento o la prevención del cáncer.

11. La vacuna o el péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el método comprende administrar dicha vacuna o péptido en combinación con un tratamiento adicional para el cáncer.

12. La vacuna o péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el tratamiento adicional para el cáncer se selecciona del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia, tratamiento con sustancias inmunoestimuladoras, terapia génica, tratamiento con anticuerpos y tratamiento utilizando células dendríticas.

Figura 1/9

a


Células secretoras de IFNg por 4x10⁵ células
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
Donantes sanos (n=13)
Cáncer de mama (n=4)
Melanoma (n=6)
Carcinoma de células renales (n = 10)
Elispot IDO2

b

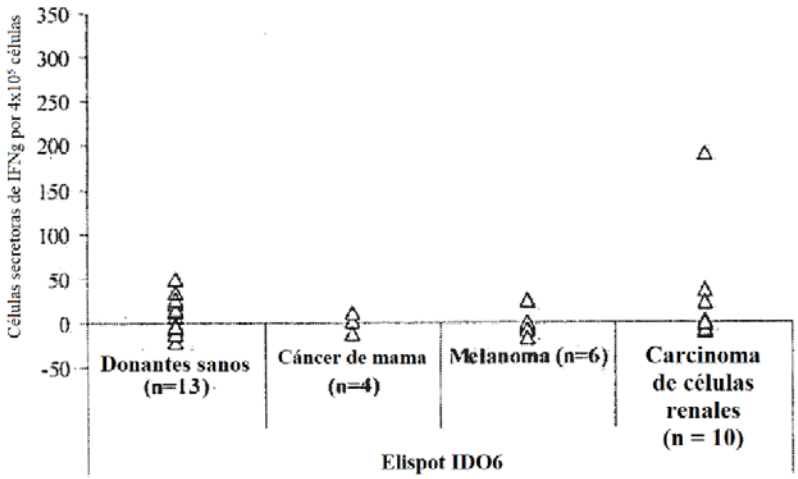
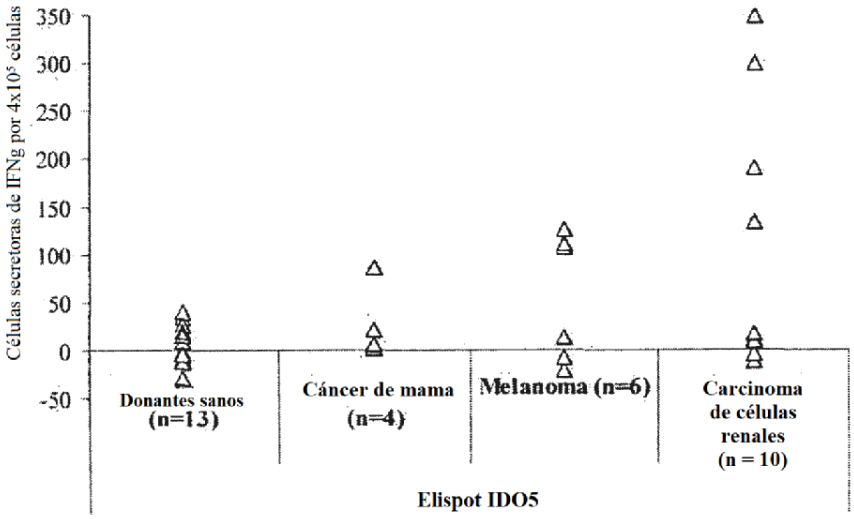
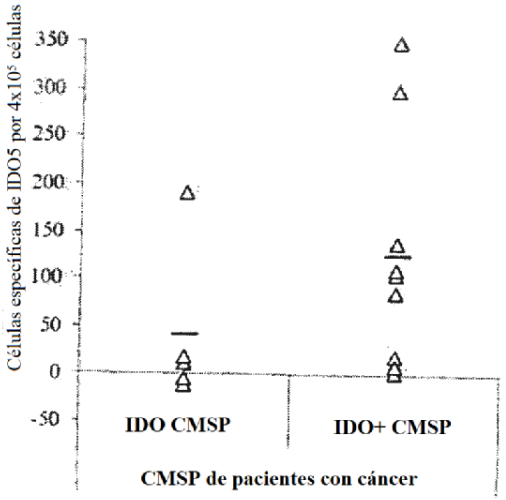

Células secretoras de IFNg por 4x10⁵ células
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
Donantes sanos (n=13)
Cáncer de mama (n=4)
Melanoma (n=6)
Carcinoma de células renales (n = 10)
Elispot IDO6

Figura 1/9

c

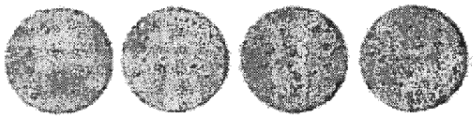


d



e

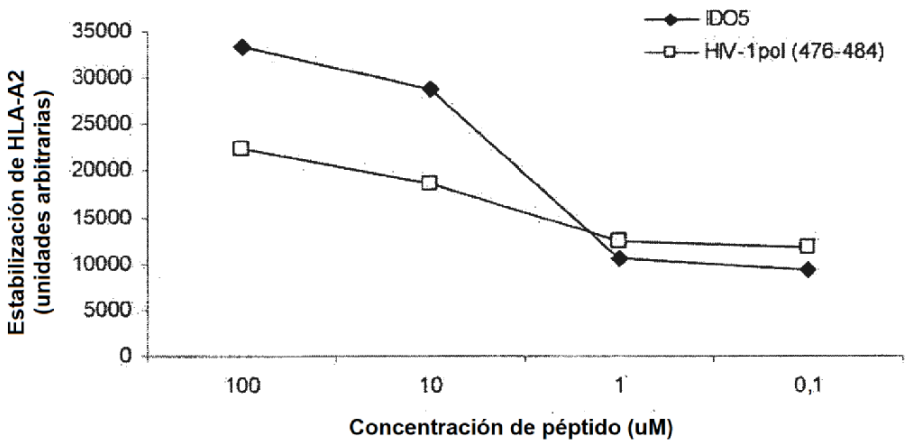
EJEMPLO: CSP de un paciente con cáncer de mama



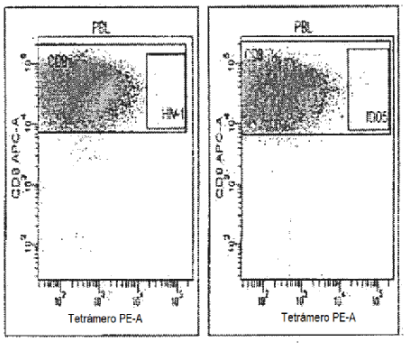
Sin péptido IDO5

Figura 2/9

a



b



c

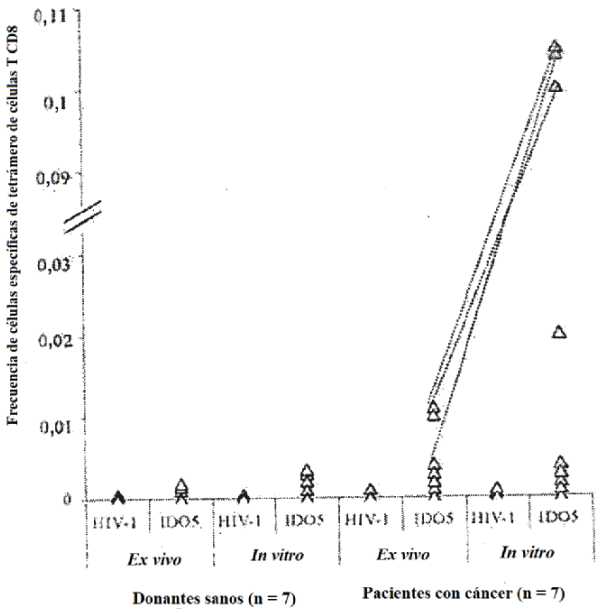
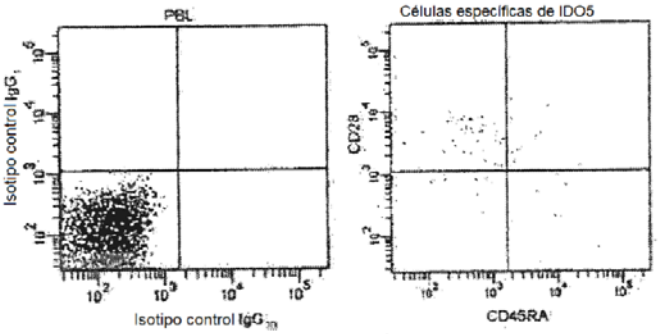
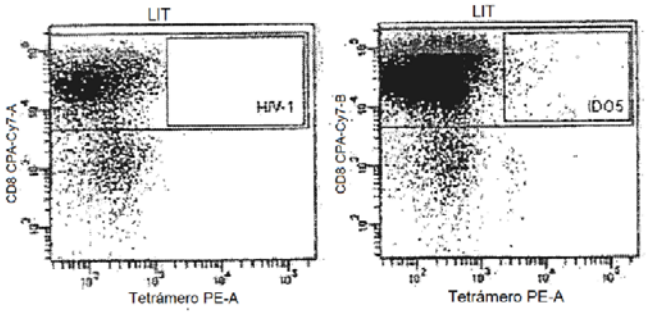


Figura 2/9

d



e



f

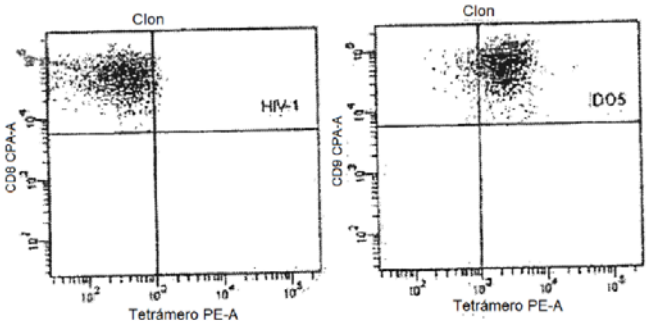


Figura 3/9

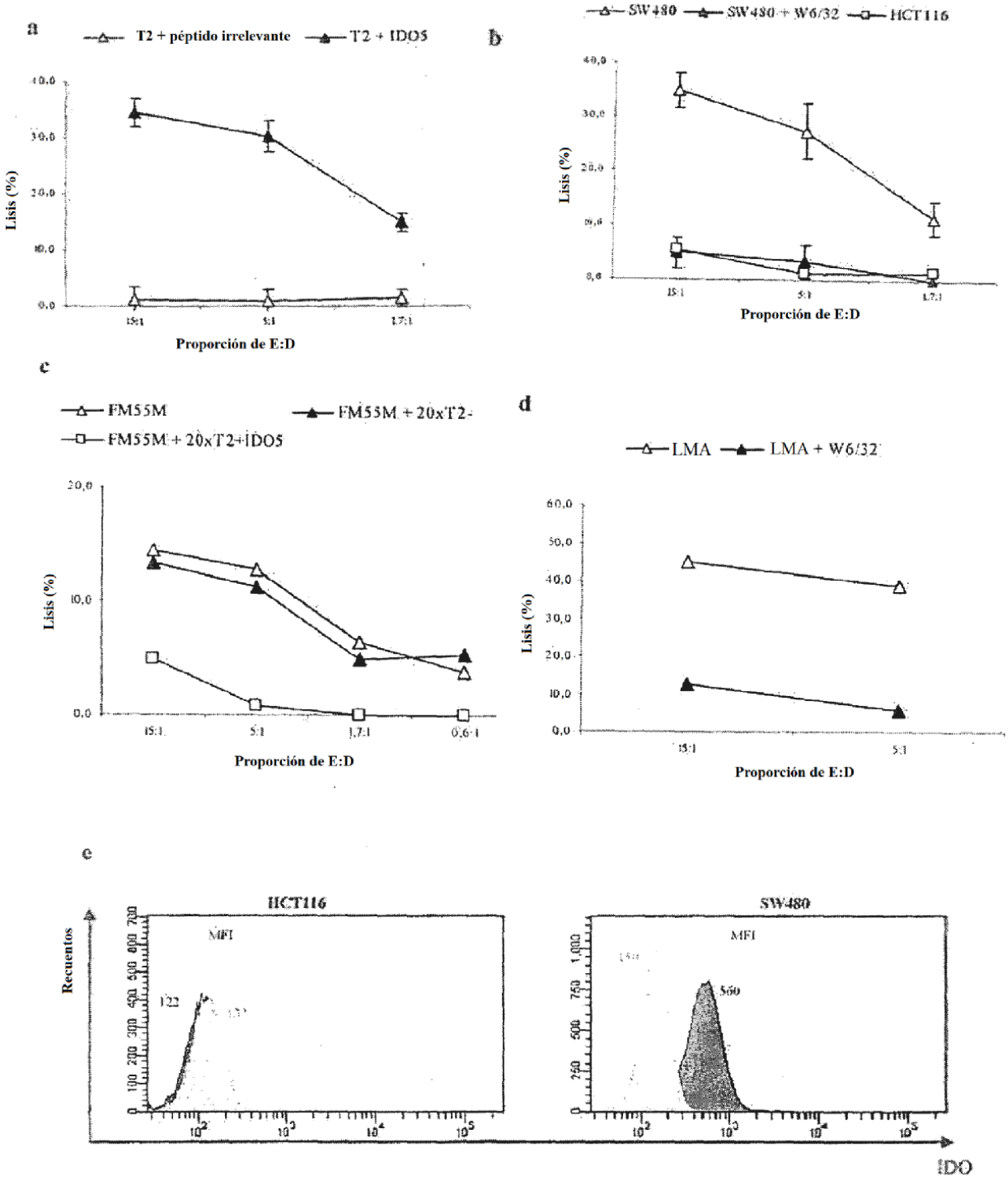

a
T2 + péptido irrelevante
T2 + IDO5
Lisis (%)
Proporción de E:D
b
SW480
SW480 + W6/32
HCT116
Lisis (%)
Proporción de E:D
c
FM55M
FM55M + 20xT2-
FM55M + 20xT2+IDO5
Lisis (%)
Proporción de E:D
d
LMA
LMA + W6/32
Lisis (%)
Proporción de E:D
e
HCT116
SW480
MFI
Recuentos
IDO

Figura 4/9

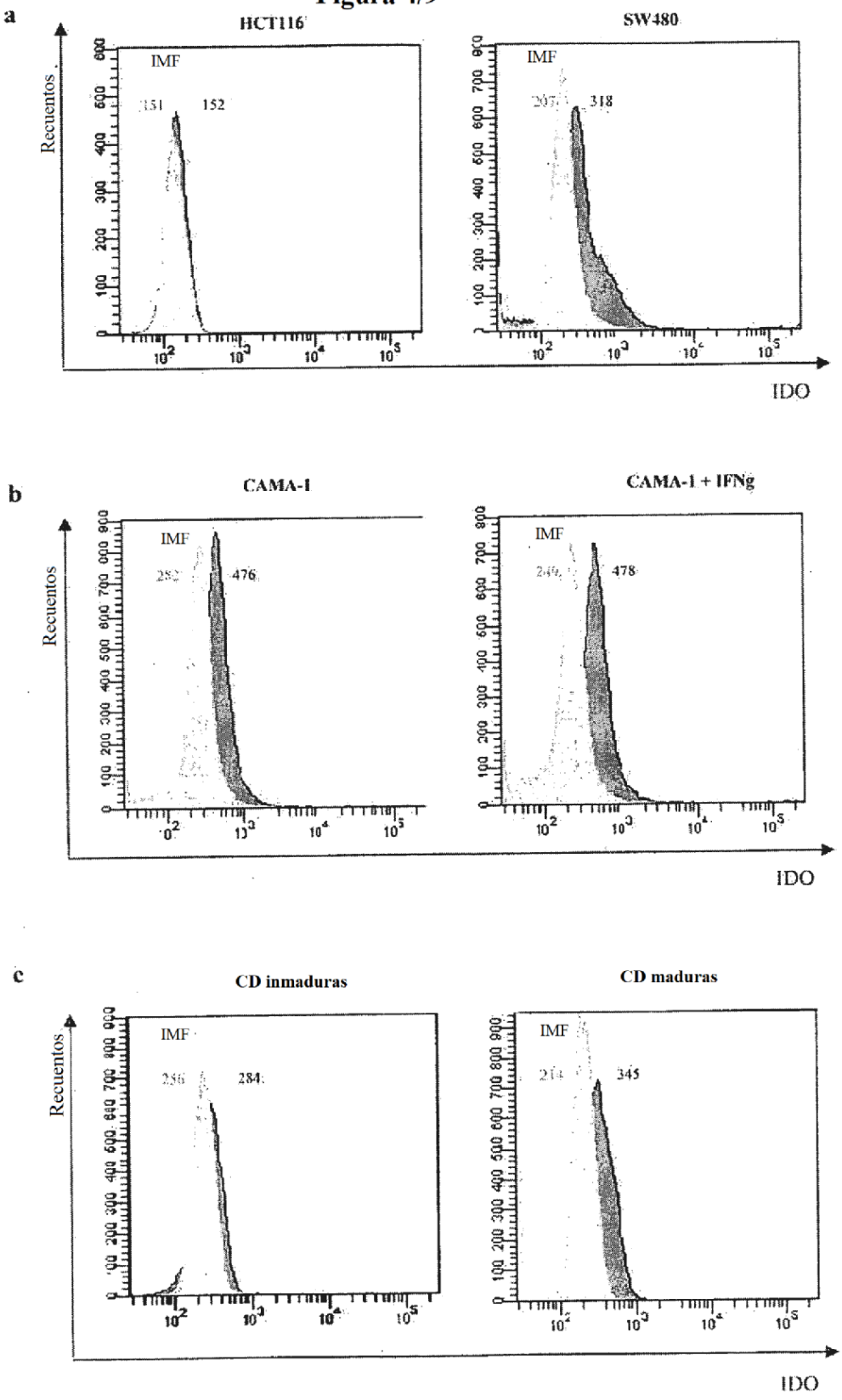
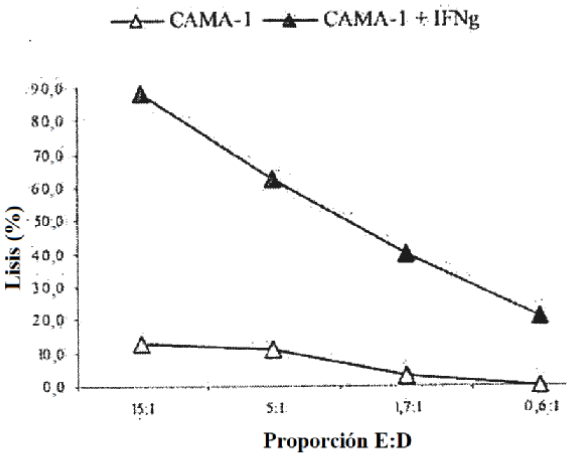
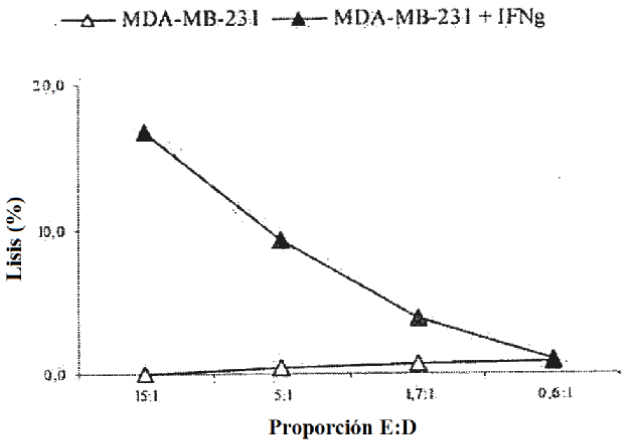

a
HCT116
SW480
IMF
151
152
IMF
207
318
Recuentos
IDO
b
CAMA-1
CAMA-1 + IFNg
IMF
282
476
IMF
249
478
Recuentos
IDO
c
CD inmaduras
CD maduras
IMF
256
284
IMF
214
345
Recuentos
IDO

Figura 5/9

a



b



c

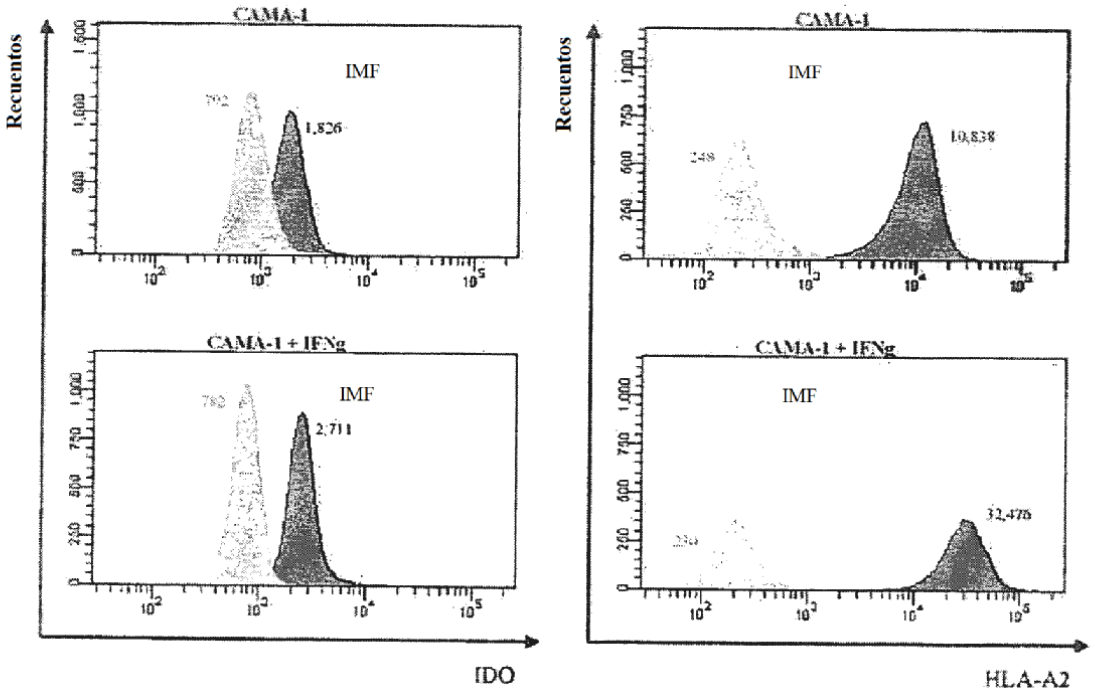
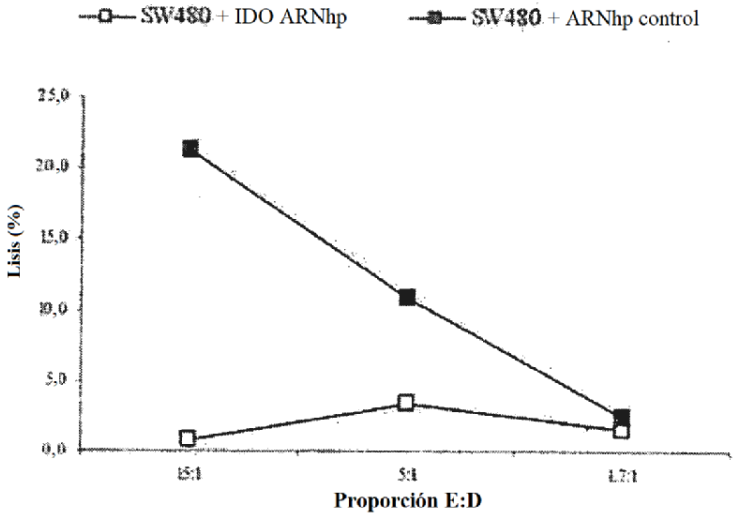


Figura 5/9

d


SW480 + IDO ARNhp
SW480 + ARNhp control
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
Lisis (%)
Proporción E:D

e

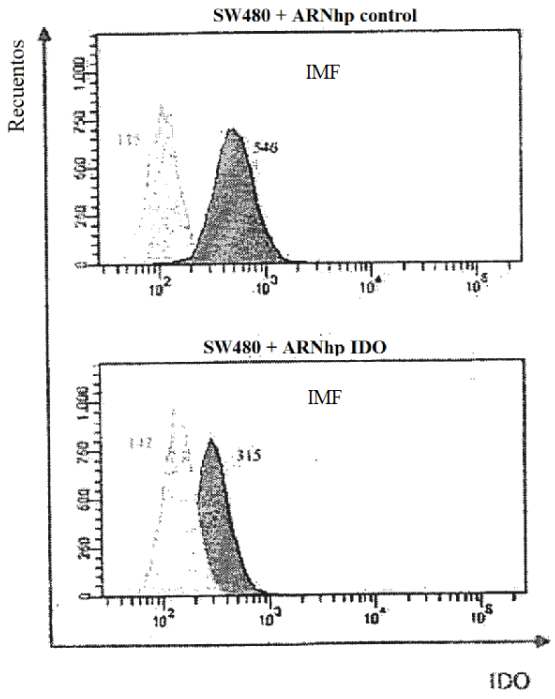

SW480 + ARNhp control
IMF
546
SW480 + ARNhp IDO
IMF
315
Recuentos
IDO

Figura 6/9

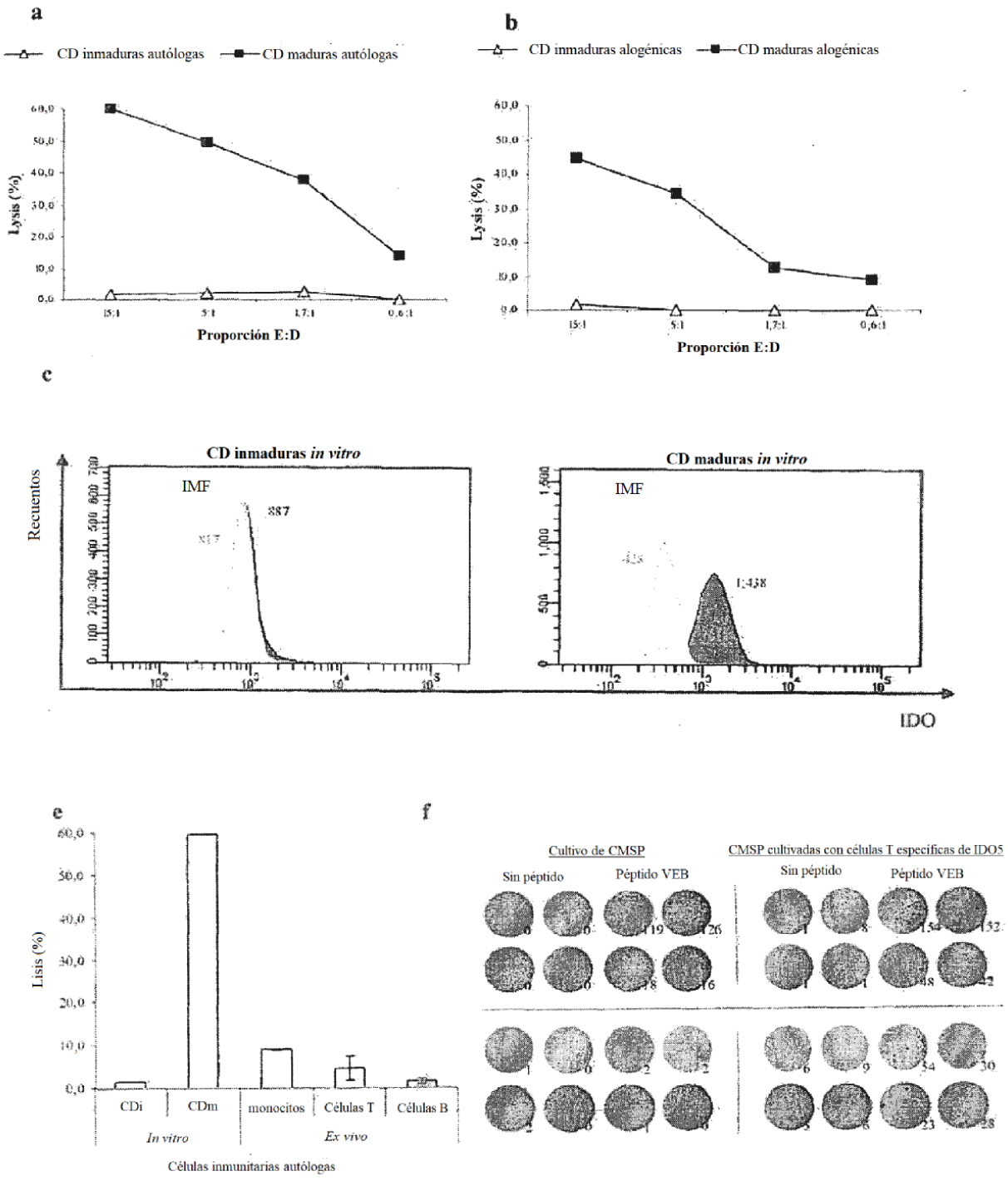

a
CD inmaduras autólogas
CD maduras autólogas
Lysis (%)
Proporción E:D
b
CD inmaduras alogénicas
CD maduras alogénicas
Lysis (%)
Proporción E:D
c
CD inmaduras in vitro
CD maduras in vitro
Recuentos
IMF
887
IMF
1:438
IDO
e
Lisis (%)
CDi
CDm
monocitos
Células T
Células B
In vitro
Ex vivo
Células inmunitarias autólogas
f
Cultivo de CMSP
Sin péptido
Péptido VEB
CMSP cultivadas con células T específicas de IDO5
Sin péptido
Péptido VEB

Figura 7/9

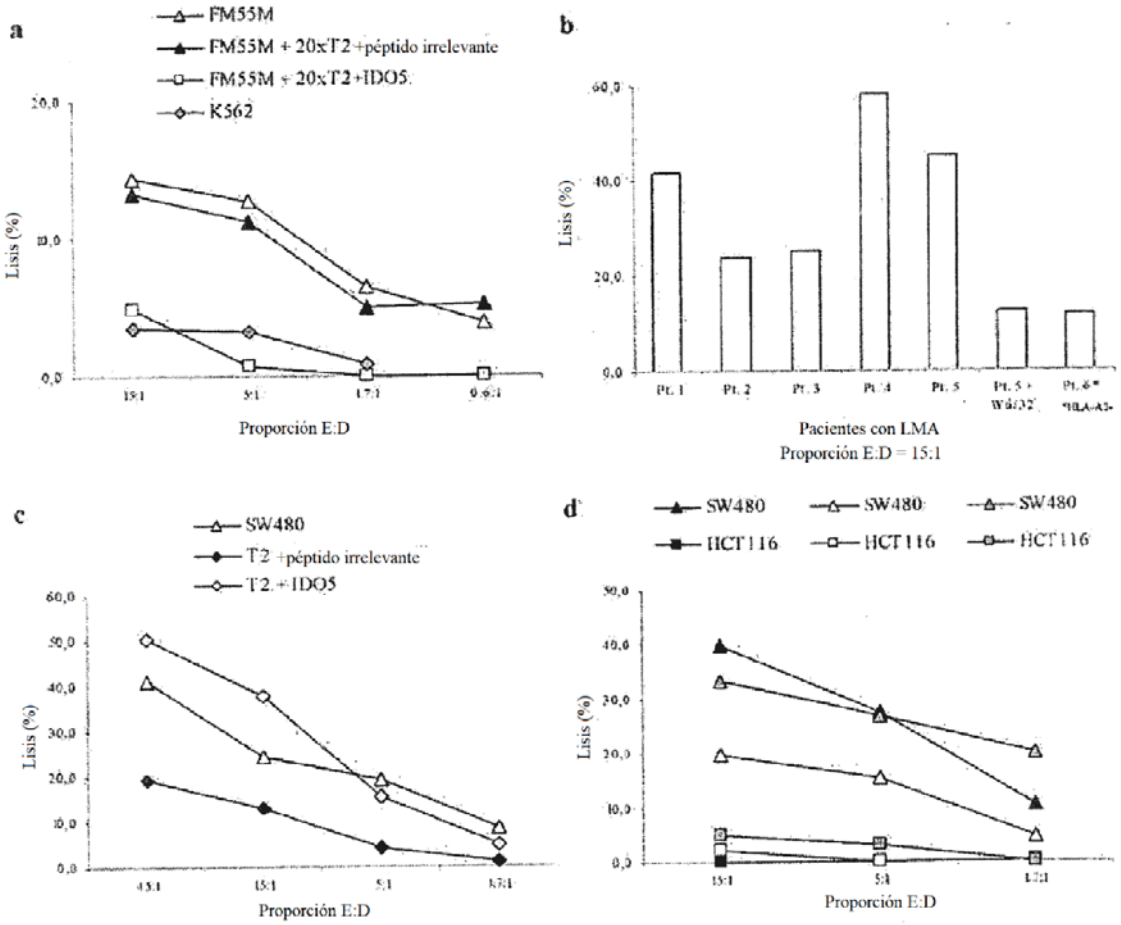

a
FM55M
FM55M + 20xT2+péptido irrelevante
FM55M + 20xT2+IDO5
K562
Lisis (%)
Proporción E:D
b
Lisis (%)
Pt. 1
Pt. 2
Pt. 3
Pt. 4
Pt. 5
Pacientes con LMA
Proporción E:D = 15:1
c
SW480
T2 +péptido irrelevante
T2 + IDO5
Lisis (%)
Proporción E:D
d
SW480
SW480
SW480
HCT116
HCT116
HCT116
Lisis (%)
Proporción E:D

Figura 8/9

```
IDOB        MAHAMENSWTISKEYHIDEEVGFALPNPQENLPDFYNDWMFIAKHLPDLIESGQLRERVE
IDOC        ------------------------------------------------------------
IDO         MAHAMENSWTISKEYHIDEEVGFALPNPQENLPDFYNDWMFIAKHLPDLIESGQLRERVE
IDOA        ------------------------------------------------------------

IDOB        KLNMLSIDHLTDHKSQRLARLVLGCITMAYVWGKGHGDVRKVLPRNIAVPYCQLSKKLEL
IDOC        ------------------------------------------------------------
IDO         KLNMLSIDHLTDHKSQRLARLVLGCITMAYVWGKGHGDVRKVLPRNIAVPYCQLSKKLEL
IDOA        ------------------------------------------------------------

IDOB        PPILVYADCVLANWKKKDPNKPLTYENMDVLFSFRDGDCSKGFFLVSLLVEIAAASAIKV
IDOC        ------------------------MDVLFSFRDGDCSKGFFLVSLLVEIAAASAIKV
IDO         PPILVYADCVLANWKKKDPNKPLTYENMDVLFSFRDGDCSKGFFLVSLLVEIAAASAIKV
IDOA        ------------------------MDVLFSFRDGDCSKGFFLVSLLVEIAAASAIKV
                                     ************************************

IDOB        IPTVFKAMQMQERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQIHGKYHVNPKAFFSVLRIYLSGWK
IDOC        IPTVFKAMQMQERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQIHGKYHVNPKAFFSVLRIYLSGWK
IDO         IPTVFKAMQMQERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQIH--DHVNPKAFFSVLRIYLSGWK
IDOA        IPTVFKAMQMQERDTLLKALLEIASCLEKALQVFHQIH--DHVNPKAFFSVLRIYLSGWK
            ************************************   ******************

IDOB        GNPQLSDGLVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLLGIQQTAGGGHAAQFLQDMRRY
IDOC        GNPQLSDGLVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLLGIQQTAGGGHAAQFLQDMRRY
IDO         GNPQLSDGLVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLLGIQQTAGGGHAAQFLQDMRRY
IDOA        GNPQLSDGLVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLLGIQQTAGGGHAAQFLQDMRRY
            ************************************************************

IDOB        MPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDAGLREAYDACVKALVSLRSYHLQIVTKYILIPA
IDOC        MPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDAGLREAYDACVKALVSLRSYHLQIVTKYILIPA
IDO         MPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDAGLREAYDACVKALVSLRSYHLQIVTKYILIPA
IDOA        MPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDAGLREAYDACVKALVSLRSYHLQIVTKYILIPA
            ************************************************************

IDOB        SQQPKENKTSEDPSKLEAKGTGGTDLMNFLKTVRSTTEKSLLKEG
IDOC        SQQPKENKTSEDPSKLEAKGTGGTDLMNFLKTVRSTTEKSLLKEG
IDO         SQQPKENKTSEDPSKLEAKGTGGTDLMNFLKTVRSTTEKSLLKEG
IDOA        SQQPKENKTSEDPSKLEAKGTGGTDLMNFLKTVRSTTEKSLLKEG
            ********************************************
```

Figura 9/9

IDOLIKE MEPHRPNVKTAVPLSLESYHISEEYGFLLPDSLKELPDHYRPWMEIANKL
IDO ----MAHAMENSWTISKEYHIDEEVGFALPNPQENLPDFYNDWMFIAKHL
IDOLIKE PQLIDAHQLQAHVDKMPLLSCQFLKGHREQRLAHLVLSFLTMGYVWQEGE
IDO PDLIESGQLRERVEKLNMLSIDHLTDHKSQRLARLVLGCITMAYVWGKGH
IDOLIKE AQPAEVLPRNLALPFVEVSRNLGLPPILVHSDLVLTNWTKKDPDG-----
IDO GDVRKVLPRNIAVPYCQLSKKLELPPILVYADCVLANWKKKDPNKPLTYE
IDOLIKE NLETIISFPGGESLHGFILVTALVEKEAVPGIKALVQATNAILQPNQEAL
IDO NMDVLFSFRDGDCSKGFFLVSLLVEIAAASAIKVIPTVFKAMQMQERDTL
IDOLIKE LQALQRLRLSIQDITKTLGQMHDYVDPDIFYAGIRIFLSGWKDNPAMPAG
IDO LKALLEIASCLEKALQVFHQIHDHVNPKAFFSVLRIYLSGWKGNPQLSDG
IDOLIKE LMYEGVSQEPLKYSGGSAAQSTVLHAFDEFLGIRHSK---ESGDFLYRMR
IDO LVYEGFWEDPKEFAGGSAGQSSVFQCFDVLLGIQQTAGGGHAAQFLQDMR
IDOLIKE DYMPPSHKAFIEDIHSAPSLRDYILSSGQDHLLTAYNQCVQALAELRSYH
IDO RYMPPAHRNFLCSLESNPSVREFVLSKGDAGLREAYDACVKALVSLRSYH
IDOLIKE ITMVTKYLITAAAKAKHGKPNHLPGPPQALKDRGTGGTAVMSFLKSVRDK
IDO LQIVTKYILIPAS--QQPKENKTSEDPSKLEAKGTGGTDLMNFLKTVRST
IDOLIKE TLESILHPRG
IDO TEKSLLKEG-