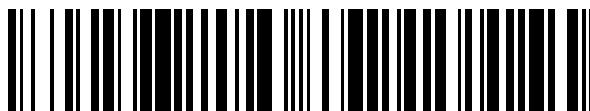


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 333**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2014 PCT/US2014/016610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14127296**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2014 E 14752122 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2956544**

54 Título: **Vacunas contra el cáncer y métodos de vacunación**

30 Prioridad:

14.02.2013 US 201361764789 P

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

06.04.2018

73 Titular/es:

**IMMUNOCELLULAR THERAPEUTICS LTD.
(100.0%)
23622 Calabasas Road Suite 300
Calabasas, CA 91302, US**

72 Inventor/es:

**BENDER, JAMES G. y
YU, JOHN S.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 662 333 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra el cáncer y métodos de vacunación

Campo técnico

5 La divulgación se refiere generalmente a composiciones de vacunas multivalentes, a métodos para elaborar estas composiciones, así como a métodos para el tratamiento de cánceres ginecológicos y peritoneales.

Antecedentes

10 El cáncer ovárico epitelial (EOC) es la causa más frecuente de mortalidad relacionada con el cáncer ginecológico en mujeres (Jemal, A. y cols., *Global cancer statistics. CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): p. 69-90). Se estimó que en 2008 (el año más reciente en el que hay números disponibles), aproximadamente 21,204 mujeres fueron diagnosticadas y 14.362 mujeres murieron por la enfermedad en los EE. UU. (véase www.cdc.gov/cancer/ovarian/statistics/index.htm). Se estima que aproximadamente 190.000 nuevos casos serán diagnosticados y 115.000 mujeres morirán de cáncer ovárico al año en todo el mundo. Aunque se han hecho avances en la quimioterapia durante las tres últimas décadas, la supervivencia general de 5 años para la enfermedad en estado avanzado sigue siendo menor de 35%.

15 La tasa de respuesta inicial del cáncer ovárico avanzado al importante enfoque de tratamiento estándar con paclitaxel y carboplatino es 75%, con tasas de respuesta clínica completa cercanos a 55%. Desgraciadamente, más de 75% de los sujetos con respuesta clínica completa están destinados a recaer y sucumbir a la enfermedad (Coukos, G. y S.C. Rubin, *Chemotherapy resistance in ovarian cancer: new molecular perspectives. Obstet Gynecol*, 1998, 91(5 Pt 1): p. 783-92). Para la mayoría de los sujetos, el cáncer ovárico se volverá a presentar en menos de dos años, con un tiempo mediano hasta la progresión de 20-24 meses para sujetos óptimamente citorreducidos quirúrgicamente y 12-18 meses para sujetos con reducción insuficiente. Las tasas de respuesta a quimioterapia de segunda línea son significativamente inferiores, entre 15-30%, dependiendo de la duración de la supervivencia libre de progresión y el número de tratamientos previos. Una vez que el cáncer ovárico se ha vuelto a presentar, no se considera curable y la progresión hasta la muerte habitualmente es inevitable, a pesar de estrategias de quimioterapia agresivas. Estos hechos dilucidan la enorme necesidad no cumplida de desarrollo de terapias alternativas en el cáncer ovárico (Coukos, G. y S.C. Rubin, *Gene therapy for ovarian cancer. Oncology (Williston Park)*, 2001, 15(9): p. 1197-204, 1207; análisis 1207-8; Coukos, G. y cols., *Immunotherapy for gynaecological malignancies. Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(9): p. 1193-210; Coukos, G., M.C. Courreges y F. Benencia, *Intraperitoneal oncolytic and tumor vaccination therapy with replication-competent recombinant virus: the herpes paradigm. Curr Gene Ther*, 2003, 3(2): p. 113-25).

35 Los cánceres de las trompas de Falopio y peritoneal primario tienen muchas similitudes moleculares, histológicas, clínicas y etiológicas con el carcinoma ovárico epitelial. Más de 90% de los cánceres de las trompas de Falopio son adenocarcinomas serosos, que son histológicamente indistinguibles del carcinoma ovárico seroso papilar. Las mujeres diagnosticadas con cáncer de las trompas de Falopio y cáncer peritoneal primario se tratan clínicamente usando el mismo enfoque quirúrgico y quimioterapéutico que el cáncer ovárico epitelial debido a las similitudes en su comportamiento biológico (Benedet, J.L. y cols., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Int J Gynaecol Obstet*, 2000, 70(2): p. 209-62). La mayoría de los cánceres ováricos hereditarios y quizás muchos de los esporádicos se pueden originar de hecho en las trompas de Falopio, subrayando adicionalmente las similitudes entre los dos tumores.

45 La inmunoterapia es una forma de tratamiento del cáncer que activa el sistema inmunitario para atacar y erradicar células cancerosas. Los linfocitos T citotóxicos ("CTL") son críticos para una respuesta inmunitaria antitumoral satisfactoria. Las células T que atacan a células cancerosas requieren la presentación de antígenos tumorales a células T sin tratamiento que sufren activación, expansión clonal y finalmente ejercen su función efectora citolítica. La presentación de antígenos eficaz es esencial para la función efectora satisfactoria de los CTL. Así, el desarrollo de una estrategia satisfactoria para iniciar la presentación de antígenos tumorales a células T puede ser importante para una estrategia inmunoterapéutica para el tratamiento del cáncer.

50 Chianese-Bullock, K. A. y cols. presentan que un multipéptido es seguro y provoca respuestas de células T en participantes con cáncer ovárico en estado avanzado (*Journal of Immunotherapy*, vol. 31, no. 4, 1 de mayo de 2008, páginas 420-430).

55 Siendo el resultado clínico de muchos tipos de cánceres de pobre a letal, existe una necesidad significativa de desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos.

Sumario

Esta divulgación se basa, al menos en parte, en el reconocimiento de que la inmunización de pacientes con cánceres ginecológicos y peritoneales con células que presentan antígenos (APC) cargadas con combinaciones de epítomos peptídicos del MHC clase I procedentes de al menos siete antígenos tumorales, o con mezclas de múltiples péptidos de estos epítomos peptídicos, puede inducir sorprendentemente fuertes respuestas inmunitarias terapéuticas que pueden conducir a una sensibilidad significativamente mejorada al tratamiento y una supervivencia incrementada de los pacientes. Los siete antígenos tumorales son: mesotelina, NY-ESO-1, proteína fijadora de folato, HER2/neu, IL-13R α 2, MAGE-A1 y EphA2.

La razón fundamental de usar uno o más epítomos procedentes de estos al menos siete antígenos se deriva del hecho de que estos antígenos están implicados en una amplia gama de funciones celulares tales como el crecimiento tumoral, la diferenciación tumoral, la transformación, la transducción de señales, la adhesión celular y el movimiento celular. Así, las vacunas que comprendan epítomos peptídicos procedentes de estos antígenos se dirigirán a múltiples antígenos que atacarán a diferentes funciones de la célula cancerosa (p. ej., célula cancerosa ovárica, de las trompas de Falopio y peritoneal). Además, el uso de la mezcla de epítomos peptídicos procedentes de estos siete antígenos evita la generación de mutantes de escape que regularían a la baja un solo antígeno. Por otra parte, como la mayoría de los siete antígenos se expresan altamente en el cáncer ovárico así como los cánceres peritoneal y de las trompas de Falopio, la combinación de epítomos peptídicos de estos siete antígenos proporcionaría una cobertura de todos los tumores ováricos así como los cánceres peritoneal y de las trompas de Falopio. Finalmente, una vacuna que comprenda epítomos procedentes de estos siete antígenos se dirigirá a antígenos antes en la enfermedad de que sean normalmente regulados al alza con progresión. Así, se cree que la combinación específica de epítomos de la Tabla 1 (es decir, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:66; o SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55 y SEQ ID NO:66) será útil en el tratamiento del cáncer ovárico como una vacuna multipeptídica y/o como una vacuna de células dendríticas.

Según esto, se proporcionan en la presente composiciones y métodos para inducir respuestas inmunitarias en pacientes con cáncer contra antígenos tumorales. Las composiciones incluyen vacunas multipeptídicas que comprenden epítomos del HLA clase I procedentes de al menos los siete antígenos tumorales siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, proteína fijadora de folato (FBP), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu), receptor α 2 de IL-13, antígeno 1 asociado a melanoma (MAGE-A1) y receptor A2 de EPH (EphA2). Las composiciones también incluyen células que presentan antígeno (p. ej., células dendríticas) que presentan epítomos que comprenden epítomos del HLA clase I procedentes de los siete antígenos asociados a tumores listados anteriormente. Los métodos descritos en la presente usan estas vacunas para el tratamiento del cáncer ginecológico y el cáncer peritoneal.

En un aspecto, la divulgación proporciona una composición que comprende al menos un epítomo peptídico del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I de al menos siete antígenos seleccionados del grupo que consiste en mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1. Los epítomos de los al menos siete antígenos se pueden almacenar individualmente o almacenar como una mezcla de estos epítomos. En ciertas realizaciones de este aspecto, la composición puede comprender una mezcla de al menos un epítomo peptídico del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I de al menos ocho, nueve o diez antígenos. En ciertas realizaciones de este aspecto, el epítomo peptídico del MHC clase I es un epítomo de HLA-A2. En algunas realizaciones, la composición puede comprender una mezcla de al menos un epítomo peptídico del MHC clase I de los siete antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. La composición que comprende al menos un epítomo peptídico del MHC clase I de los siete antígenos comprende las siguientes secuencias peptídicas: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFIL (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2. En ciertas realizaciones, los péptidos son sintéticos.

En otra realización, la composición de este aspecto comprende además al menos un epítomo peptídico del MHC clase I procedente de un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor no es ninguno de mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1 o EphA2. En algunas realizaciones específicas, la composición que comprende al menos un epítomo peptídico del MHC clase I de los siete antígenos comprende además al menos un epítomo peptídico del MHC clase I de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de los siete antígenos siguientes: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1 (p. ej., p53; k-Ras; Ep-CAM; MUC1; survivina; hTERT; WT1; p53 y k-Ras; p53 y Ep-CAM; p53 y MUC1; p53 y survivina; p53 y hTERT1; p53 y WT1; k-Ras y Ep-CAM; k-Ras y MUC1; k-Ras y survivina; k-Ras y hTERT; k-Ras y WT1; Ep-CAM y MUC1; Ep-CAM y survivina; Ep-CAM y hTERT; Ep-CAM y WT1; MUC1 y survivina; MUC1 y hTERT; MUC1 y WT1; survivina y hTERT; survivina y WT1; hTERT y WT1; p53, k-Ras y Ep-CAM; p53, Ep-CAM y MUC1; p53, MUC-1 y survivina; p53, survivina y hTERT; p53, hTERT1 y WT1; p53, WT1 y MUC-1; survivina, hTERT y WT1; Ep-CAM, survivina, hTERT y WT1; p53, survivina, hTERT y WT1; k-Ras, survivina, hTERT y WT1; Ep-CAM, k-Ras, survivina, hTERT y WT1; p53,

k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina y hTERT; -Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1; p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1).

En algunas realizaciones específicas, la composición que comprende al menos un epítipo peptídico del MHC clase I de los siete antígenos comprende además dos epítipos peptídicos del MHC clase I of de menos uno (p. ej., 1,2,3,4,5,6 o 7) de los siete antígenos siguientes: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1 (p. ej., p53; k-Ras; Ep-CAM; MUC1; survivina; hTERT; WT1; p53 y k-Ras; p53 y Ep-CAM; p53 y MUC1; p53 y survivina; p53 y hTERT1; p53 y WT1; k-Ras y Ep-CAM; k-Ras y MUC1; k-Ras y survivina; k-Ras y hTERT; k-Ras y WT1; Ep-CAM y MUC1; Ep-CAM y survivina; Ep-CAM y hTERT; Ep-CAM y WT1; MUC1 y survivina; MUC1 y hTERT; MUC1 y WT1; survivina y hTERT; survivina y WT1; hTERT y WT1; p53, k-Ras y Ep-CAM; p53, Ep-CAM y MUC1; p53, MUC-1 y survivina; p53, survivina y hTERT; p53, hTERT1 y WT1; p53, WT1 y MUC-1; survivina, hTERT y WT1; Ep-CAM, survivina, hTERT y WT1; p53, survivina, hTERT y WT1; k-Ras, survivina, hTERT y WT1; Ep-CAM, k-Ras, survivina, hTERT y WT1; p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina y hTERT; -Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1; p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1).

En ciertas realizaciones, el al menos un péptido del MHC clase I es sintético. En otra realización, la composición de este aspecto, comprende además al menos un (p. ej., 1, 2, 3) epítipo peptídico del MHC clase I procedente de un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor no es p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina o hTERT. En ciertas realizaciones, el al menos un péptido del MHC clase I es sintético. En otra realización, la composición de este aspecto comprende además al menos un (p. ej., 1, 2, 3) epítipo peptídico del MHC clase I procedente de un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor no es mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina o hTERT.

En algunas realizaciones, la composición de este aspecto comprende además al menos un (p. ej., 1, 2, 3, 4) epítipo peptídico del MHC clase II. En algunas realizaciones, la composición de este aspecto comprende además un adyuvante. En algunas realizaciones, la composición de este aspecto comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, esta divulgación presente una composición que comprende péptidos aislados que comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) con dos o menos (p. ej., 2, 1 o ninguna) sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:15 o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:17; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:26; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:28; VMAGVGVSPYV (SEQ ID NO:40) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:40; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:49; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:55; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) con dos o menos sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:66.

Los epítipos de los al menos siete antígenos se pueden almacenar individualmente o almacenar como una mezcla de estos epítipos. En algunas realizaciones específicas, la composición comprende además al menos un epítipo peptídico del MHC clase I de al menos uno (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) de los siete antígenos siguientes: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1 (p. ej., p53; k-Ras; Ep-CAM; MUC1; survivina; hTERT; WT1; p53 y k-Ras; p53 y Ep-CAM; p53 y MUC1; p53 y survivina; p53 y hTERT1; p53 y WT1; k-Ras y Ep-CAM; k-Ras y MUC1; k-Ras y survivina; k-Ras y hTERT; k-Ras y WT1; Ep-CAM y MUC1; Ep-CAM y survivina; Ep-CAM y hTERT; Ep-CAM y WT1; MUC1 y survivina; MUC1 y hTERT; MUC1 y WT1; survivina y hTERT; survivina y WT1; hTERT y WT1; p53, k-Ras y Ep-CAM; p53, Ep-CAM y MUC1; p53, MUC-1 y survivina; p53, survivina y hTERT; p53, hTERT1 y WT1; p53, WT1 y MUC-1; survivina, hTERT y WT1; Ep-CAM, survivina, hTERT y WT1; p53, survivina, hTERT y WT1; k-Ras, survivina, hTERT y WT1; Ep-CAM, k-Ras, survivina, hTERT y WT1; p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina y hTERT; -Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1; p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1). En ciertas realizaciones, los péptidos son sintéticos. En otra realización, la composición comprende además al menos un epítipo peptídico del MHC clase I procedente de un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor no es mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina o hTERT. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos un epítipo peptídico del MHC clase II. En algunas realizaciones, la composición comprende además un adyuvante. En algunas realizaciones, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, esta divulgación presenta una composición que comprende células dendríticas aisladas, en donde las células dendríticas presentan secuencias peptídicas sobre su superficie, en donde las secuencias peptídicas comprenden al menos un (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) epítipo peptídico del MHC clase I de al menos siete de los siguientes antígenos: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1 (p. ej., mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1 y EphA2; mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2 y survivina; mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2 y hTERT; mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2 y WT1; mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2 y Ep-CAM; mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de

IL-13, MAGE-A1, EphA2 y MUC1; FBP, Her-2, NY-ESO-1, IL-13R α 2, survivina, hTERT y WT1). En algunas realizaciones, el epítipo peptídico del MHC clase I es un epítipo peptídico del HLA-A2. En una realización específica, el epítipo peptídico del MHC clase I es un epítipo peptídico del HLA-A0201. En ciertas realizaciones, las células dendríticas presentan secuencias peptídicas que comprenden epítopos peptídicos del MHC clase I de al menos, ocho, nueve o diez de los antígenos.

Los epítopos peptídicos del MHC clase I comprenden las siguientes secuencias peptídicas: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2. En algunas realizaciones, las células dendríticas adquirirían los epítopos peptídicos *in vitro* mediante exposición a péptidos sintéticos que comprenderían los epítopos peptídicos. En ciertas realizaciones, la composición comprende además células dendríticas que presentan al menos un epítipo del MHC clase I de al menos uno de los siete antígenos siguientes: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1. En algunas realizaciones, la composición comprende además al menos un epítipo del MHC clase I procedente de un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor no es mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT o WT1. En algunas realizaciones, las secuencias peptídicas son sintéticas.

En otro aspecto, la divulgación presenta una solución que comprende células dendríticas aisladas que presentan los siguientes epítopos peptídicos del MHC clase I sobre su superficie celular: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2. En ciertas realizaciones, esta solución también incluye uno o más de: Plasmalyte-A (20-40% - p. ej., 20%, 25%, 30%, 35%, 40%), dextrosa (1-8% p. ej., 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%)/NaCl (de 0,2 a 0,6 M - p. ej., 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6), DMSO (de 5 a 10% p. ej., 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%), dextrano (de 0,2% a 2% - p. ej., 0,2%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,2%, 1,5%, 2%) y albúmina sérica humana (de 1% a 7,5% - p. ej., 1%, 2%, 3%, 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,5%, 7%, 7,5%). En una realización específica, la solución comprende 31,25% de Plasmalyte-A; 31,25% de dextrosa (5%)/NaCl 0,45 M; 7,5% de DMSO; 1% de dextrano y 5% de albúmina sérica humana. En algunas realizaciones, la solución contiene de 1×10^7 a $1,5 \times 10^7$ células dendríticas. En algunas realizaciones, la solución tiene un volumen de 1 ml.

En otro aspecto más, la divulgación presenta un método para tratar un cáncer ginecológico o peritoneal. El método implica administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una composición descrita en la presente. En ciertas realizaciones, el cáncer ginecológico es cáncer ovárico epitelial o cáncer de las trompas de Falopio. En algunas realizaciones, el cáncer peritoneal es cáncer peritoneal primario. En algunas realizaciones, el método implica además administrar un segundo agente antes de, sustancialmente al mismo tiempo que o después de administrar la composición al sujeto, en donde el segundo agente es cualquier agente que sea útil en el tratamiento del cáncer ginecológico o peritoneal. La terapia combinada puede permitir dosis inferiores de múltiples agentes y/o regímenes de dosificación modificados, reduciendo así la incidencia global de efectos adversos. En algunas realizaciones, el método implica además administrar un agente quimioterapéutico antes de, sustancialmente al mismo tiempo que o después de administrar la composición al sujeto. En ciertas realizaciones, al sujeto se le administra el agente quimioterapéutico de 0,5 horas a 3 días (0,5 horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 15 horas, 18 horas, 20 horas, 1 día, 1,5 días, 2 días, 2,5 días, 3 días) antes o después de administrar la composición al sujeto. En una realización específica, el agente quimioterapéutico es ciclofosfamida. En otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es paclitaxel, altretamina, capecitabina, etopódido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecano, doxorubicina, melfalano, pemetrexed, toptecano o vinorelbina.

En otro aspecto, la divulgación presenta un procedimiento que incluye las etapas de: obtener de un paciente células mononucleares derivadas de la médula ósea; cultivar las células mononucleares *in vitro* bajo condiciones en las que las células mononucleares se vuelven adherentes a un recipiente de cultivo; seleccionar las células mononucleares adherentes; cultivar las células mononucleares adherentes en presencia de una o más citocinas bajo condiciones en las que las células se diferencian en células que presentan antígeno; y cultivar las células que presentan antígeno en presencia de péptidos, en donde los péptidos comprenden secuencias de aminoácidos correspondientes a al menos un epítipo peptídico del MHC clase I de al menos siete de los dieciséis antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1, bajo condiciones en las que las células presentan los péptidos sobre moléculas de histocompatibilidad principal clase I.

En algunas realizaciones, los péptidos sintéticos comprenden al menos un epítipo peptídico del MHC clase I de los siguientes antígenos: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. En ciertas realizaciones, la una o más citocinas comprenden factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos e interleucina-4 (IL-4). En otras realizaciones, la una o más citocinas comprenden factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). En ciertas realizaciones, las células derivadas de la médula ósea se obtienen de un paciente diagnosticado de cáncer ovárico epitelial, cáncer peritoneal primario o carcinoma de las trompas de Falopio. En una realización

específica, los péptidos sintéticos comprenden las siguientes secuencias: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPV (SEQ ID NO:66) de EphA2.

"Cáncer ginecológico" significa cáncer de cuello uterino, ovárico, uterino, vaginal, vulvar o de las trompas de Falopio.

Por "cáncer ovárico" se entiende un crecimiento canceroso que surge de los ovarios. El término abarca tumores ováricos epiteliales, tumores ováricos de células germinales, tumores ováricos, tumores ováricos estromáticos de los cordones sexuales así como cánceres metastásicos que se extienden a los ovarios.

"Epítipo" significa un péptido corto derivado de un antígeno proteínico, en donde el péptido se une a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y es reconocido en el contexto unido al MHC por una célula T. El epítipo se puede unir a una molécula del MHC clase I (p. ej., HLA-A1, HLA-A2 o HLA-A3) o una molécula del MHC clase II.

"Tratamiento" y "tratar", según se usa en la presente, se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es inhibir o frenar (reducir) el trastorno elegido (p. ej., cáncer, p. ej., cáncer ovárico) o un síntoma del trastorno o mejorar un síntoma, incluso si el tratamiento es parcial o finalmente insatisfactorio. Los que necesitan tratamiento incluyen los ya diagnosticados del trastorno así como los propensos o predispuestos a contraer el trastorno o aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores (p. ej., cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de las células tumorales o hacer a las células tumorales más sensibles al tratamiento con otros agentes terapéuticos o por el propio sistema inmunitario del sujeto.

Una "célula dendrítica" o "DC" es una célula que presenta antígeno (APC) que típicamente expresa altos niveles de moléculas del MHC y moléculas coestimulantes y carece de expresión de (o tiene una baja expresión de) marcadores específicos para granulocitos, células NK, linfocitos B y linfocitos T, pero puede variar dependiendo de la fuente de la célula dendrítica. Las DCs son capaces de iniciar respuestas de linfocitos T primarios antigénicamente específicos *in vitro* e *in vivo* y dirigir una fuerte reacción leucocitaria mixta (MLR) en comparación con leucocitos de sangre periférica, esplenocitos, células B y monocitos. Generalmente, las DCs ingieren antígeno mediante fagocitosis o pinocitosis, lo degradan, presentan fragmentos del antígeno en su superficie y secretan citocinas.

A menos que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Singleton y cols., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); Sambrook y Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001); y Lutz y cols., Handbook of Dendritic Cells: Biology, Diseases and Therapies, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2006) proporcionan a un experto en la técnica una guía general de muchos de los términos usados en la presente solicitud. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica o las pruebas de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen posteriormente. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG.1A es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en una célula de cáncer ovárico humano (882AC) con relación a una célula epitelial ovárica humana (HoEpic) basado en el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real.

La FIG. 1B es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en una célula madre cancerosa (882CSC) con relación a una célula epitelial ovárica humana (HoEpic) basado en el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real.

La FIG. 1C es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en una célula hija de cáncer ovárico (882ADC) con relación a una célula epitelial ovárica humana (HoEpic) basado en el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real.

- La FIG. 2A es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en una célula madre de cáncer ovárico humano (882CSC) con relación a célula de cáncer ovárico humano (882AC).
- 5 La FIG. 2B es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 en una célula hija de cáncer ovárico humano (882ADC) con relación a una célula madre de cáncer ovárico humano (882CSC).
- La FIG. 3A es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en células de cáncer ovárico humano (1031AC) con relación a una célula epitelial ovárica humana (HoEpic) basado en el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real.
- 10 La FIG. 3B es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en células madre cancerosas (1031CSC) con relación a una célula epitelial ovárica humana (HoEpic) basado en el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real.
- La FIG. 3C es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en una células hijas de cáncer ovárico (1031ADC) con relación a una célula epitelial ovárica humana (HoEpic) basado en el análisis cuantitativo de PCR en tiempo real.
- 15 La FIG. 4A es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en una célula madre de cáncer ovárico humano (1031CSC) con relación a célula de cáncer ovárico humano (1031 AC).
- La FIG. 4B es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN de los antígenos de Vacuna Ejemplar 1 en una célula hija de cáncer ovárico humano (1031ADC) con relación a una célula madre de cáncer ovárico humano (1031CSC) (FIG.4B).
- 20 La FIG. 5A es un gráfico de barras que muestra la capacidad de los péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1 para unirse a células T2.
- La FIG. 5B es un gráfico de barras que muestra la capacidad de los péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1 para unirse a células T2.
- 25 La FIG. 6A es un gráfico de barras que representa la citotoxicidad de CTLs antigénicamente específicos contra células madre de cáncer ovárico humano 882CSC HLA-A2⁺. Control: 882CSC (UT): célula no tratada.
- La FIG. 6B es un gráfico de barras que representa la citotoxicidad de CTLs antigénicamente específicos contra células madre de cáncer ovárico humano 1031CSC HLA-A2⁺. Control: 1031CSC (UT): célula no tratada.
- 30 La FIG. 7 es un gráfico de barras que muestra la expresión de ARN basada en el conjunto de datos de TCGA (muestras de 586 pacientes) de los genes que codifican antígenos de los que se derivaban los péptidos usados en la Vacuna Ejemplar 1.
- La FIG. 8A es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de HER2 en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.
- 35 La FIG. 8B es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de EphA2 en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.
- La FIG. 8C es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de FOLR1 en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva superior en el gráfico.
- 40 La FIG. 8D es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de MSLN en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.

La FIG. 8E es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de MAGE-A1 en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.

5 La FIG. 8F es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de IL-13R α 2 en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.

La FIG. 8G es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de NY-ESO-1 en cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: TCGA, 557 pacientes con cáncer ovárico humano). La curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.

10 La FIG. 9A es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de IL-13R α 2 en pacientes con cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: GSE 9891, 285 pacientes con cáncer ovárico humano). En esta figura, la curva de alta expresión es la curva inferior en el gráfico.

15 La FIG. 9B es un gráfico que representa la supervivencia global (OS) basada en la expresión de ARN de NY-ESO-1 en pacientes con cáncer ovárico humano (Conjunto de datos: GSE 9891, 285 pacientes con cáncer ovárico humano). En esta figura, la curva de alta expresión es la curva superior en el gráfico.

La FIG. 10 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo ELISPOT de IFN- γ de la respuesta de células T antigénicamente específicas a T2 impulsados con HER2 p339 y tres péptidos de la Vacuna Ejemplar 1: HER2p773, IL-13R α 2p345 y EphA2p883.

Descripción detallada

20 Esta divulgación se refiere en parte a composiciones que son útiles para tratar cánceres ginecológicos y peritoneales. Las composiciones descritas en la presente incluyen células que presentan antígeno (p. ej., células dendríticas) que presentan epítomos procedentes de al menos siete antígenos asociados a tumores (es decir, mesotelina, NY-ESO-1, proteína de unión a folato (FBP), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2/neu), receptor α 2 de IL-13, antígeno asociado a melanoma 1(MAGE-A1) y receptor A2 de EPH (EphA2)) que
 25 provocan respuestas inmunitarias terapéuticas y específicas de tumores. Las composiciones descritas en la presente también incluyen mezclas muropeptídicas de epítomos que comprenden al menos siete de los antígenos asociados a tumores listados anteriormente. Estas composiciones se dirigen a múltiples funciones de las células tumorales y estimulan una respuesta inmunitaria más heterogénea que la que se provocaría con epítomos procedentes de un solo antígeno y, así, son particularmente beneficiosas para dirigirse a tumores. A menudo, un tumor evolucionará para desactivar la expresión de un antígeno asociado a un tumor particular, creando "mutantes de escape". Así, es más probable que una respuesta inmunitaria contra múltiples antígenos tumorales proporcione
 30 una terapia eficaz para tratar estos mutantes y puede proporcionar beneficios terapéuticos significativos para diversas poblaciones de pacientes. Además, las composiciones descritas en la presente proporcionan la capacidad de tratar todos los tumores ginecológicos y peritoneales. Una ventaja adicional de las composiciones descritas en la presente es que se dirigen a antígenos que se expresan tempranamente en la enfermedad que son regulados al alza con progresión de la enfermedad.
 35

La Tabla 1 proporciona un listado de los siete antígenos y epítomos peptídicos del MHC clase I ejemplares de la Vacuna Ejemplar 1.

40

Tabla 1

Antígeno	Epítipo(s) peptídicos de A2	Expresión de Ag en Cáncer Ovárico	Inmunogenicidad <i>in vitro</i>	Función
Mesotelina	SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15); VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17)	67-100%	Sí	Facilitar la metástasis; Mantener la viabilidad
NY-ESO-1	SLLMWITQC (SEQ ID NO:26)	11-20%	Sí	desconocida
Proteína fijadora de folato	EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28)	>90%	Sí	Ventaja de crecimiento tumoral
HER2/neu	VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40)	100%-Estadio III/IV	Sí	Transducción de señales
IL-13R α 2	WLPFGFILI (SEQ ID NO:49)	83%	Sí	Ganancia de función, sensibilidad a IL13
MAGE-A1	KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55)	30-55%	Sí	desconocida
EphA2	TLADFDPRV (SEQ ID NO:66)	76%	Sí	Tirosina cinasa receptora (RTK)

5 Esta divulgación también se refiere en parte a métodos para tratar cánceres ginecológicos (p. ej., ováricos, de las trompas de Falopio) y peritoneales (p. ej., peritoneal primario) al administrar una vacuna muropeptídica que comprende mezclas de epítipos procedentes de al menos los siete antígenos tumorales divulgados anteriormente o al administrar células que presentan antígeno que presentan combinaciones únicas de epítipos procedentes de los antígenos tumorales divulgados anteriormente. Las combinaciones de epítipos procedentes de los antígenos se pueden administrar a los pacientes bien como una vacuna muropeptídica o bien se pueden presentar sobre la superficie de células que presentan antígeno (p. ej., células dendríticas). La vacunación con células que presentan antígeno es segura y provoca una respuesta de células T citotóxicas que conduce a la eliminación de células tumorales que expresan uno o más de estos antígenos.

15 Las composiciones y los métodos de esta solicitud presentan al menos un epítipo de al menos los siete antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. Las composiciones y los métodos también pueden presentar uno o más epítipos de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de los siguientes antígenos: p53, k-Ras, molécula de adhesión a células epiteliales (Ep-CAM), mucina 1 (MUC1), survivina, transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT) y WT1; estos epítipos pueden ser epítipos del MHC clase I (p. ej., HLA-A2) y/o clase II. En una realización, la solicitud presenta combinaciones o mezclas de uno o más epítipos del MHC clase I de los siete antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. En una realización específica, los epítipos son péptidos que se unen a HLA-A2.

20 La Tabla 2 lista las secuencias de aminoácidos de los antígenos listados anteriormente. La Tabla 3 proporciona ejemplos de epítipos de estos antígenos.

Antígenos

25 Mesotelina

La mesotelina es un antígeno de diferenciación presente sobre células mesoteliales normales y sobreexpresado en varios tumores humanos, incluyendo mesotelioma, cáncer ovárico y adenocarcinoma pancreático. El gen de la mesotelina codifica una proteína precursora que es procesada para dar la proteína de 40 kDa mesotelina, que está ligada a la membrana celular mediante un enlace de glicosilfosfatidilinositol y un fragmento de cubierta de 31 kDa denominado factor potenciador de megacariocitos. Se cree que esta proteína representa un papel en la metástasis del cáncer al mediar en la adhesión celular al unirse a MUC16/CA-125.

30 La Tabla 2 proporciona una secuencia de aminoácidos de la proteína mesotelina humana de 622 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el n° de registro NP_001170826,1). Secuencias ejemplares de epítipos del HLA de mesotelina se proporcionan en la Tabla 3.

NY-ESO-1

Aunque NY-ESO-1 se expresa en tejidos de adultos normales en las células germinales testiculares de adultos normales, se expresa en diversos cánceres incluyendo melanoma, cánceres de pulmón, mama y ovarios.

- 5 El NY-ESO-1 humano tiene una longitud de 180 aminoácidos. La Tabla 2 proporciona una secuencia de aminoácidos de NY-ESO-1 humano (también disponible en GenBank bajo el nº de registro CAA05908,1). Secuencias ejemplares de epítomos del HLA de NY-ESO-1 se listan en la Tabla 3.

FBP

- 10 La proteína fijadora de folato exhibe una fuerte afinidad para ácido fólico humano. La proteína fijadora de folato se sobreexpresa en cánceres incluyendo carcinomas ovárico, endometrial, de mama, de pulmón, colorrectal y de células renales.

- 15 La FBP humana tiene una longitud de 257 aminoácidos. La Tabla 2 proporciona una secuencia de aminoácidos de FBP humana (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_057941.1). Secuencias ejemplares de epítomos del HLA de FBP se proporcionan en la Tabla 3.

HER-2

- 20 El HER-2 (también conocido como HER-2/neu y c-erbB2) es una glicoproteína transmembranaria de 1255 aminoácidos con actividad de tirosina cinasa. El HER-2 se sobreexpresa en una variedad de tipos de tumores. Esta proteína promueve el crecimiento tumoral al activar una variedad de rutas de señalización celular incluyendo MAPK, PI3K/Akt y PKC.

La Tabla 2 proporciona una secuencia de aminoácidos de HER-2 humano (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_004439.2). Secuencias ejemplares de HER-2 HLA se listan en la Tabla 3.

Receptor $\alpha 2$ de IL-13

- 25 El receptor $\alpha 2$ de IL-13 es un componente no señalizador del receptor de IL-13 multímero. La estimulación de este receptor activa la producción de TGF- $\beta 1$, que inhibe la función de células T citotóxicas. La secuencia de aminoácidos del receptor $\alpha 2$ de IL-13, que tiene una longitud de 380 aminoácidos, se muestra en la Tabla 2 (también disponible en Genbank bajo el nº de registro NP_000631.1). Una secuencia ejemplar de un epítomo del HLA del receptor $\alpha 2$ de IL-13 se muestra en la Tabla 3.

30 MAGE-A1

MAGE-A1 es una proteína encontrada en células germinales testiculares y representa un importante papel en la espermatogénesis. MAGE-A1 también se expresa en varios cánceres incluyendo de cerebro, ovario, pulmón e hígado.

- 35 La proteína MAGE-A1 tiene una longitud de 309 aminoácidos. La Tabla 2 proporciona una secuencia de aminoácidos de MAGE-1 humano (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_004979.3). Secuencias ejemplares de epítomos del HLA de MAGE-A1 se muestran en la Tabla 3.

EphA2

- 40 EphA2 pertenece a la subfamilia de receptores de efrina de la familia de proteína-tirosina cinasas. EPH y los receptores relacionados con EPH se han relacionado con la mediación de episodios de desarrollo, particularmente en el sistema nervioso. Los receptores en la subfamilia de EPH tienen típicamente un solo dominio de cinasa y una región extracelular que contiene un dominio rico en Cys y dos repeticiones de fibronectina tipo III. Los receptores de efrina se dividen en 2 grupos basados en la similitud de sus secuencias de dominios extracelulares y sus afinidades para la unión a ligandos de efrina-A y efrina-B. EphA2 se une a ligandos de efrina-A y es una diana de transcripción de la ruta Ras-MAPK. Se cree que representa un papel en la invasión de células tumorales al regular integrinas y la desfosforilación de cinasa de adhesión focal (FAK).

- 45 La Tabla 2 proporciona una secuencia de EphA2 humano que tiene 976 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_004422.2). Secuencias ejemplares de epítomos del HLA de EphA2 se proporcionan en la Tabla 3.

p53

5 p53 es una proteína supresora de tumores que es crucial en organismos multicelulares, donde regula el ciclo celular y, así, funciona como un supresor de tumores que está implicado en la prevención del cáncer. p53 se ha denominado "el guardián del genoma" debido a su papel en la conservación de la estabilidad al prevenir la mutación genómica. p53 es un factor de transcripción que se puede unir a regiones promotoras de cientos de genes donde bien activa o bien suprime la expresión génica. p53 sirve como un supresor de tumores al inducir la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia y la reparación de ADN. En células normales, p53 frecuentemente es indetectable debido a la ubiquitinación rápida mediante mdm-2 y la posterior degradación proteasómica. Sin embargo, durante el daño al ADN y varios otros estreses, incluyendo el estrés oncogénico, la cantidad de p53 se incrementa debido a la alteración de su degradación. Notablemente, la inactivación de p53 es una de las características del cáncer. En efecto, p53 tiene un amplio espectro de tipos de mutación y p53 se encuentra mutada en aproximadamente la mitad de todos los tumores.

15 La Tabla 2 proporciona una secuencia de p53 humana que tiene 393 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_000537.3). La Tabla 3 lista epítomos de p53 ejemplares.

K-Ras

20 El homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten también conocido con KRAS es una proteína que realiza funciones esenciales en la señalización de tejidos normales. Como otros miembros de la familia Ras, la proteína KRAS es una GTPasa y es un participante temprano en muchas rutas de transducción de señales. Habitualmente, KRAS está atado a membranas celulares debido a la presencia de un grupo isoprenilo en su extremo C. La mutación de un gen KRAS es una etapa esencial en el desarrollo de muchos cánceres.

La Tabla 2 proporciona una secuencia de k-Ras humano que tiene una longitud de 188 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_004976.2). La Tabla 3 lista epítomos del HLA de k-Ras ejemplares.

25 Ep-CAM

EpCAM es un antígeno de diferenciación panepitelial que se expresa en casi todos los carcinomas. Es una proteína membranaria de tipo I de un solo paso. La Tabla 2 proporciona una secuencia de Ep-CAM humano que tiene una longitud de 314 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_002345.2). La Tabla 3 lista epítomos del HLA de Ep-CAM ejemplares

30 MUC1

MUC1 es una glicoproteína con una glicosilación conectada a O extensiva de su dominio extracelular. MUC1 alinea la superficie apical de células epiteliales de varios órganos tales como los pulmones, el estómago, los intestinos y los ojos. MUC1 protege al cuerpo de las infecciones al evitar que un patógeno alcance la superficie celular al capturar el patógeno en oligosacáridos en el dominio extracelular. La sobreexpresión de MUC1 a menudo se asocia con cánceres de colon, mama, ovarios, pulmón y páncreas.

La Tabla 2 proporciona una secuencia de survivina humana que tiene una longitud de 264 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_001018016.1). La Tabla 3 proporciona epítomos del HLA de MUC1 ejemplares.

40 Survivina

La survivina es un miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis. La survivina inhibe la activación de caspasa, conduciendo de ese modo a la regulación negativa de la apoptosis o muerte celular programada. La survivina se expresa mucho en la mayoría de los tumores y el tejido fetal humanos, pero está completamente ausente en células terminalmente diferenciadas. Esto convierte a la survivina en una diana ideal para la terapia del cáncer ya que las células cancerosas son elegidas como diana mientras que las células normales se dejan.

La Tabla 2 proporciona una secuencia de survivina humana que tiene una longitud de 137 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_001012270.1). Epítomos del HLA de survivina ejemplares se listan en la Tabla 3.

50

hTERT

La transcriptasa inversa de telomerasa es una subunidad catalítica de la enzima telomerasa. La telomerasa es una ribonucleoproteína polimerasa que alarga los telómeros. La telomerasa protege los extremos de los cromosomas de la destrucción y la muerte celular normal. La proteína telomerasa representa un papel en la muerte celular normal debido a que habitualmente es reprimida, dando como resultado un acortamiento progresivo de los telómeros. Cuando la telomerasa empieza a funcionar anormalmente, la célula se puede volver inmortal. Se cree que este proceso es importante en el desarrollo de varios tipos de cáncer.

La Tabla 2 proporciona una secuencia de TERT humana que tiene una longitud de 1069 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro NP_001180305.1). La Tabla 3 lista epítomos del HLA de hTERT ejemplares.

WT1

WT1 es un factor de transcripción de dedo de cinc que representa un papel esencial en el desarrollo del sistema urogenital. Se sobreexpresa en varios tipos de leucemia y tumores sólidos. La Tabla 2 proporciona una secuencia de WT1 humana que tiene una longitud de 449 aminoácidos (también disponible en GenBank bajo el nº de registro AAA61299.1). Epítomos del HLA de WT1 ejemplares se listan en la Tabla 3.

Tabla 2. Secuencias de Aminoácidos de Antígenos

Antígeno tumoral	Secuencia de aminoácidos
Mesotelina	MALPTARPLL GSCGTPALGS LFLFLFSLGW VQPSRTLAGE TGQEAAPLDG VLANPPNISS LSPRQLLGFP CAEVSGLSTE RVRELAVALA QKNVKLSTEQ LRCLAHRLSE PPEDLDALPL DLLLFLNPDA FSGPQACTRF FSRITKANVD LLPRGAPERQ RLLPAALACW GVRGSLLESEA DVRALGGLAC DLPGRFVAES AEVLLPRLVS CPGPLDQDQ EAARAALQGG GPPYGGPSTW SVSTMDALRG LLPVLGQPII RSIPQGIVAA WRQRSSRDPS WRQPRTLIR PRFRREVEKT ACPSGKKARE IDESLIFYKK WELEACVDAA LLATQMDRVN AIPFTYEQLD VLKHKLEDELY PQGYPESVIQ HLGYLFLKMS PEDIRKWNVT SLETLKALLE VNKGHMSPQ VATLIDRFVK GRGQLDKDTL DTLTAFYPGY LCSLSPEELS SVPPSSIWAV RPQDLDTCDP RQLDVLYPKA RLAFQNMNGS EYFVKIQSFL GGAPTEDLKA LSQQNVSMDL ATFMKLRDA VLPLTVAEVQ KLLGPHVEGL KAEERHRPVR DWILRQRQDD LDTLGLGLQG GIPNGYLVLD LSMQEALSGT PCLLGGPVL TVLALLLAST LA (SEQ ID NO:1)
NY-ESO-1	MQAEGRGTGG STGDADGPGG PGIPDGPGEN AGGPGEAGAT GGRGPRGAGA ARASGPGGGA PRGPHGGAAS GLNGCCRCGA RGPE SRLLEF YLAMPFATPM EAELARRSLA QDAPPLPVP VLLKEFTVSG NILTIRLTAA DHRQLQLSIS SCLQQLSLLM WITQCFLPVF LAQPPSGQRR (SEQ ID NO:2)
FBP	MAQRMTTQLL LLLVWVAVVG EAQTRIAWAR TELLNVCNNA KHKHEKPGPE DKLHEQCRPW RKNACCSTNT SQEAHKDVS LYRFNWNHCG EMAPACKRHF IQDTCLYEC PNLGPWIIQV DQSWRKERV NVPLCKEDCE QWEDCRTSY TCKSNWHKGW NWTSGFNKCA VAAACQPFHF YFPTPTVLCN EIWTHSYKVS NYSRSGRCI QMWFDPQGN PNEEVARFYA AAMSGAGPWA AWPFLLSLAL MLLWLLS (SEQ ID NO:3)
HER-2	MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVVGNL ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIHNO VRQVPLQRLR IVRGTLQFED NYALAVLDNG DPLNNTTPTV GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCHEQC

ES 2 662 333 T3

Antígeno tumoral	Secuencia de aminoácidos
	<p>AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP YNYLSTDVGS CTLVCLPHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF ETLEEITGYL YISAWPDSLP DLSVFNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGLRSLRE LGSGLALIHH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGPPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCACAHAH KDPFFCVARC PSGVKPDLISY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP LTSIIISAVVG ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRLLQETELVEPL TPGAMPNQA QMRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGS YVSRLLGICL TSTVQLVTQL MPYGCLLDHV RENRGRLLGSQ DLLNWCQIA KGMSYLEDVR LVHRDLAARN VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEYHAD GGKVPKQMA LESILRRRFT HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIAPARE IPDLLEKGER LPQPPICTID VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPASPL DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA EEYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVHHRHRSS STRSGGGDLT LGLEPSEEEA PRSFLAPSEG AGSDVFDGDL GMGAAGLQOS LPTHDPSPLO RYSEDPTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV NQPDVVRPQP SPREGPLPAA RPAGATLERP KTLSPGKNGV VKDVFVAFGGA VENPEYLTPQ GGAAPOPHPP PAFSPAFLNL YYWDQDPPER GAPPSTFKGT PTAENPEYLG LDVPV (SEQ ID NO: 4)</p>
receptor $\alpha 2$ de IL-13	<p>MAFVCLAIGC LYTFLLISTTF GCTSSSDTEI KVNPPQDFEI VDPGYLGYLY LQWQPPLSLD HFKECTVEYE LKYRNIGSET WKTIIITKNLH YKDGFDLNKG IEAKIHTLLP WQCTNGSEVQ SSWAETTYWI SPQGIPETKV QMDMDEVYINW QYLLCSWKPG IGVLLDTNYN LFYWYEGLDH ALQCVDYIKA DGQNIQCRFP YLEASDYKDF YICVNGSSEN KPIRSSYFTF QLQNIQKPLP PVYLTFTRES SCEIKLWWSI PLGPIPARCF DYEIEIREDD TTLVTATVEN ETYTLKTTNE TRQLCFVVRV KVNIIYCSDDG IWSEWSDKQC WEGEDLSKKT LLRFWLPFGF ILILVIFVTVG LLLRKPNTYP KMIPEFFCDT (SEQ ID NO: 5)</p>
MAGE-A1	<p>MSLEQORSLHC KPEEALAAEQ EALGLVCVQA ATSSSSPLVL GTLEEVPTAG STDPPQSPQG ASAFPPTINF TRQRQPSEGS SSREEEGPST SCILESLFRA VITKKVADLV GFLLLKYRAR EPVTKAEMLE SVIKNYKHCPEIFGKASES LQLVFGIDVK EADPTGHSYV LVTCLGLSYD GLLGDNQIMP KTGFLIIVLV MIAMEGGHAP EEEIWEELSV MEVYDGREHS AYGEPRKLLT QDLVQEKYLE YRQVPDSDPA RYEFWGPRA LAETSYVKVL EYVIKVSARV RFFFPSLREA ALREEEEGV (SEQ ID NO: 6)</p>
EphA2	<p>MELQAARACF ALLWGCALAA AAAAQGKEVV LLDFAAAGGE LGWLTHPYGK GWDLMQNIIMN DMPYIMYSVC NVMSGDQDNW LRTNWWYRGE AERIFIELKF TVRDCNSFPG GASSCKETFN LYAESDLDY GTNFQKRLFT KIDTIAPDEI TVSSDFEARH VKLNVEERSV GPLTRKGFYL AFQDIGACVA LLSVRVYK CPELLQGLAH FPETIAGSDA PSLATVAGTC VDHAVVPPGG EEPRMHCAVD GEWLVPIGQC LCQAGYEKVE DACQACSPGF FKFEASESPC LECPEHTLPS PEGATSCECE EGFFRAPQDP ASMPCTRPPS APHYLTAVGM GAKVELRWTP PQDSSGGREDI VYSVTCEQCW PESGECGPCE ASVRYSEPPH GLTRTSVTVS DLEPHMNYTF TVEARNGVSG LVTSRSFRTA SVSINQTEPP KVRLEGRST SLSVSWSI PPQQRVWKYE VTYRKKGDSN SYNVRTEGFSVTLDDLAPD TTYLVQVQAL TQEGQGAGSK VHEFQTLSPG GSNLAVIGG VAVGVVLLLV LAGVGF IHR RRKNQRARQS PEDVYFSKSE QLKPLKTYVD PHTYEDPNQA VLKFTTEIHP SCVTRQKVI AGEFGEVYK MLKTSSGKKE VPVAIKTLKA GYTEKQRVDF LGEAGIMQGF SHHNIIRLEG VISKYKPMMI ITEYMENGAL DKFLREKDG FSVLQLVGMML RGIAAGMKYL ANMNYVHRDL AARNILVNSN LVCKVSDFLG SRVLEDDPEA TYTTSGGKIP IRWTAPEAIS YRKFTSASDV WSFGIVMWEV MTYGERPYWE LSNHEVMKAI NDGFRLLPTPM DCPSAIYQLM MQCWQERAR RPKFADIVSI LDKLIRAPDS LKTLADFDPR VSIRLPSTSG SEGVPFRTVS EWLESIKMQQ YTEHFMAAGY TAIEKVVQMT NDDIKRIGVR LPHGQKRIAY SLLGLKDQVN TVGIPI (SEQ ID NO: 7)</p>
p53	<p>MEEPQSDPSV EPPLSQETFS DLWKLLPENN VLSPLPSQAM DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP DEAPRMPEAA PPVAPAPAAP TPAAPAPAPS WPLSSSVPSQ KTYQGSYGFR LGFLHSGTAK SVTCTYSPAL NKMFCQLAKT CPVQLWVDST PPPGTRVRAM AIYKQSQHMT EVVRRCPHHE RCSDSDDLAP PQHLIRVEGN LRVEYLDLDRN TFRHSVVVPY EPPEVGSCT TIHNYMCNS</p>

ES 2 662 333 T3

Antígeno tumoral	Secuencia de aminoácidos
	SCMGMNRRP ILTIITLED SGNLLGRNSF EVRVCACPGR DRRTEENLR KKGEPPHELP PGSTKRALPN NTSSSPQPK KPLDGEYFTL QIRGRERFEM FRELNEALEL KDAQAGKEPG GSRAHSSHLK SKKGQSTSRH KKLMPKTEGP DSD (SEQ ID NO:8)
k-Ras	MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKMKKKK SKTKCVIM (SEQ ID NO:9)
Ep-CAM	MAPPQVLAFG LLLAAATATF AAAQEBCVCE NYKLAVNCFV NNNRQCQCTS VQAQNTVICS KLAACKLVMK AEMNGSKLGR RAKPEGALQN NDGLYDPDCD ESGLFKAKQC NGTSMCWCVN TAGVRRTDK TEITCSERVY TWIIIEELKH KAREKPYDSK SLRFLAQKEI TTRYQLDPKF ITSILYENNV ITIDLQVNSS QKTQNDVDIA DVAYYFEKDV KGESLFHSHK MDLTVNGEQL DLDPGQTLIY YVDEKAPFES MQGLKAGVIA VIVVVVIAVV AGIVVLVVISR KKRMAKYEKA EIKEMGEMHR ELNA (SEQ ID NO:10)
MUC1	MTPGTQSPFF LLLLLTVLTA TTAPKPATVV TGSGHASSTP GGEKETSATQ RSSVPSSTEK NAFNSSLEDP STDYYQELQR DISEMFLQIY KQGGFLGLSN IKFRPGSVVV QLTLAFREGT INVHDEVETQF NQYKTEAASR YNLTISDVSV SDVPFFPSAQ SGAGVPGWGI ALLVLVCLV ALAIVYLIAL AVCQCRKNY GQLDIFPARD TYHPMSEYPT YHTHGRYVPP SSTDRSPYEK VSANGGSSL SYTNPAVAAT SANL (SEQ ID NO:11)
survivina	MGAPTLPAPW QPFLKDHRS TFKNWPFLG CACTPERMAE AGFIHCPTEN EPDLAQCFFC FKELEGWEPD DDPMQRKPTI RKNLRLKLR KCAVPSSSWL PWEASGRSC LVPEWLHHFQ GLFPGATSLP VGPLAMS (SEQ ID NO:12)
hTERT	MPRAPRCRAV RSLLRSHYRE VLPLATFVRR LGPQGWRLVQ RGDPAAFRAL VAQCLVCVPW DARPPPAAPS FRQVSKLCEL VARVLQRLCE RGAKNVLAFG FALLDGARG PPEAFTTSVR SYLNTVTDAL LRGSGAWGLL LRRVGDVVLV HLLARCALFV LVAPSCAYQV CGPPLYQLGA ATQARPPPHA SGPRRLGCE RAWNHSVREA GVPLGLPAPG ARRRGGSASR SLPLPKRPRR GAAPPERTP VGQGSWAHPG RTRGSDRGF CVVSPARPAE EATSLEGALS GTRHSHPSVG RQHAGAPPST SRPPRPWDTF CPPVYAETKH FLYSSGDKEQ LRPSFLSSSL RPSLTGARRL VETIFLGSRP WMPGTPRRLP RLPQRYWQMR PLFLELLGNH AQCPYGVLLK THCPLRAAVT PAAGVCAREK PQGSVAAPEE EDTDPRRLVQ LLRQHSSEWQ VYGFVRACLR RLVPPGLWGS RHNERFLRN TKKFISLGH AKLSLQELTW KMSVRDCAWL RRSPGVGCVP AAHRLREEI LAKFLHWLMS VYVVELLRSF FYVTETTFQK NRLFYRKS VSKLQSIGIR QHLKRVQLRE LSEAEVRQHR EARPALLTSR LRFIPKPDGL RPIVNDYVY GARTFRREKR AERLTSRVKA LFSVLNYERA RRPGLLGASV LGLDDIHRW RTFVLRVRAQ DPPPELYFVK VDVTGAYDTI PQDRLTEVIA SIKPQNTYC VRRYAVVQKA AHGHVRKAFK SHVSTLTDLQ PYMRQFVAHL QETSPLRDAV VIEQSSSLNE ASSGLFDVFL RFMCHHAVRI RGKSYVQCQG IPQGSILSTL LCSLCYGDME NKLFAGIRR GLLRLVDDF LLVTPHLTHA KTFLSYARTS IRASLTFNRG FKAGRNMRRK LFGVLRKCH SLFLDLQVNS LQTVCTNIYK ILLQAYRFH ACVLQLPFHQ QVWKNPTFFL RVIDSTASLC YSILKAKNAG MSLGAKGAG PLPSEAVQWL CHQAFLLKLT RHRVTYVPLL GSLRTAQTQL SRKLPGTTLT ALEAAANPAL PSDFKTILD (SEQ ID NO:13)
WT1	MGSDVRDLNA LLPAVPSLGG GGCALPVSG AAQWAPVLD APPGASAYGS LGGPAPPAP PPPPPPPHS FIKQEPSWGG AEPHEEQCLS AFTVHFSGQF TGTAGACRYG PFGPPPSQA SSGQARMFPN APYLPSCLES QPAIRNQYS TVTFDGTPSY GHTPSHAAQ FPNHFKHED PMGQGSGLGE QQYSVPPPVY GCHTPTDSC TGSQALLRTP YSSDNLYQMT SQLECMTWNQ MNLGATLKGV AAGSSSSVKW TEGQSNHSTG YESDNHTTPI LCGAQYRIHT HGVFRGIQDV RRVPGVAPTL VRSASETSEK RPFMCAYPGC NKRYFKLSHL QMHSRKHTEG KPYQCDFKDC ERRFSRSDQL KRHRRTGTG KPFQCKTCQR KFSRSDHLK HTRHTGTGKTS EKPFSCRWPS CQKKFARSDE LVRHHNMQR NMTKLQAL (SEQ ID NO:14)

Tabla 3. Péptidos de Antígenos Tumoriales

Antígeno tumoral	Posición en la secuencia	Secuencia peptídica
Mesotelina	20-28	SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15)
Mesotelina	23-31	FLLFSLGWV (SEQ ID NO:16)
Mesotelina	530-538	VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17)
Mesotelina	547-556 (wt)	KLLGPHVEGL (SEQ ID NO:18)
Mesotelina	547-556 (554L)	KLLGPHVLGL (SEQ ID NO:19)
Mesotelina	547-556 (554L/556V))	KLLGPHVLGV (SEQ ID NO:20)
Mesotelina	547-556 (548M/554L/556V	KMLGPHVLGV (SEQ ID NO:21)
Mesotelina	547-556 (548M/554L)	KMLGPHVLGL (SEQ ID NO:22)
Mesotelina	547-556 (548I/554L)	KILGPHVLGL (SEQ ID NO:23)
Mesotelina	547-556 (547Y/554L/556V)	YLLGPHVLGV (SEQ ID NO:24)
Mesotelina	547-556 (547Y/554L)	YLLGPHVLGL (SEQ ID NO:25)
NY-ESO-1	157-165	SLLMWITQC (SEQ ID NO:26)
NY-ESO-1	158-166	LLMWITQCF (SEQ ID NO:27)
FBP	191-199	EIWITHSTKV (SEQ ID NO:28)
FBP	245-253	LLSLALMLL (SEQ ID NO:29)
HER-2	5-13	ALCRWGLLL (SEQ ID NO:30)
HER-2	8-16	RWGLLLALL (SEQ ID NO:31)
HER-2	63-71	TYLPTNASL (SEQ ID NO:32)
HER-2	106-114	QLFEDNYAL (SEQ ID NO:33)
HER-2	369-377	KIFGSLAFL (SEQ ID NO:34)
HER-2	435-443	ILHNGAYSL (SEQ ID NO:35)
HER-2	654-662	IISAVVGIL (SEQ ID NO:36)
HER-2	665-673	VVLGVVFGI (SEQ ID NO:37)
HER-2	689-697	RLLQETELV (SEQ ID NO:38)
HER-2	754-762	VLRENTSPK (SEQ ID NO:39)
HER-2	773-782	VMAGVGSPIV (SEQ ID NO:40)
HER-2	780-788	PYVSRLGI (SEQ ID NO:41)
HER-2	789-797	CLTSTVQLV (SEQ ID NO:42)
HER-2	799-807	QLMPYGCLL (SEQ ID NO:43)
HER-2	835-842	YLEDVRLV (SEQ ID NO:44)
HER-2	851-859	VLVKSPNHV (SEQ ID NO:45)
HER-2	883-899	KVPIKWMALESILRRRF (SEQ ID NO:46)
HER-2	952-961	YMIMVKCWMI (SEQ ID NO:47)
HER-2	971-979	ELVSEFSRM (SEQ ID NO:48)
Receptor α 2 de IL-13	345-354	WLPIFGFILI (SEQ ID NO:49)
MAGE-A1	102-112	ITKKVADLVGF (SEQ ID NO:50)
MAGE-A1	135-143	NYKHCFPEI (SEQ ID NO:51)
MAGE-A1	160-169	KEADPTGHSY (SEQ ID NO:52)
MAGE-A1	161-169	EADPTGHSY (SEQ ID NO:53)
MAGE-A1	230-238	SAYGEPKRL (SEQ ID NO:54)

ES 2 662 333 T3

Antígeno tumoral	Posición en la secuencia	Secuencia peptídica
MAGE-A1	278-286	KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55)
EphA2	12-20	LLWGCALAA (SEQ ID NO:56)
EphA2	58-66	IMNDMPIYM (SEQ ID NO:57)
EphA2	120-128	NLYYAESDL (SEQ ID NO:58)
EphA2	162-170	KLNVEERSV (SEQ ID NO:59)
EphA2	253-261	WLVPIGQCL (SEQ ID NO:60)
EphA2	391-399	GLTRTSVTV (SEQ ID NO:61)
EphA2	546-554	VLLLVLAVG (SEQ ID NO:62)
EphA2	550-558	VLAGVGFFI (SEQ ID NO:63)
EphA2	806-814	VMWEVMTYG (SEQ ID NO:64)
EphA2	873-881	KLIRAPDSL (SEQ ID NO:65)
EphA2	883-891	TLADFDPRV (SEQ ID NO:66)
EphA2	925-933	FMAAGYTAI (SEQ ID NO:67)
EphA2	961-969	SLLGLKDQV (SEQ ID NO:68)
p53	65-73	RMPEAAPPV (SEQ ID NO:69)
p53	103-111 L2 m	YLGSYGFRL (SEQ ID NO:70)
p53	139-147 wt	KTCPVQLWV (SEQ ID NO:71)
p53	139-147 L2 m	KLCPVQLWV (SEQ ID NO:72)
p53	139-147 L2B3 m	KLBPVQLWV (SEQ ID NO:73)
p53	149-157 wt	STPPPGTRV (SEQ ID NO:74)
p53	149-157 L2m	SLPPPGTRV (SEQ ID NO:75)
p53	149-157 M2 m	SMPPPGTRV (SEQ ID NO:76)
p53	187-197 wt	GLAPPQHILRV (SEQ ID NO:77)
p53	217-225 wt	VVPYEPPEV (SEQ ID NO:78)
p53	264-272 wt	LLGRNSFEV (SEQ ID NO:79)
p53	264-272 7W m	LLGRNSWEV (SEQ ID NO:80)
k-Ras	5-17wt	KLVVVGAGGVGKS (SEQ ID NO:81)
k-Ras	5-17 D8	KLVVVGADGVGKS (SEQ ID NO:82)
k-Ras	5-14 D8	KLVVVGADGV (SEQ ID NO:83)
k-Ras	5-14 V8	KLVVVGAVGV (SEQ ID NO:84)
k-Ras	5-14 C8	KLVVVGACGV (SEQ ID NO:85)
k-Ras	4-12 V9	YKLVVVGAV (SEQ ID NO:86)
EpCAM	6-14	VLAFLGLLLA (SEQ ID NO:87)
EpCAM	174-184	YQLDPKFITSI (SEQ ID NO:88)
EpCAM	184-193	ILYENNVITI (SEQ ID NO:89)
EpCAM	255-264	KAPEFSMQGL (SEQ ID NO:90)
EpCAM	263-271	GLKAGVIAV (SEQ ID NO:91)
MUC1	12-20	LLLLTVLTV (SEQ ID NO:92)
MUC1	950-958, V5N7	ST(A)PPVHNV (SEQ ID NO:93)
Survivina	18-28	RISTFKNWPFL (SEQ ID NO:94)

Antígeno tumoral	Posición en la secuencia	Secuencia peptídica
Survivina	53-67 M57	DLAQMFFCFKELEGW (SEQ ID NO:95)
Survivina	95-104	ELTLGEFLKL (SEQ ID NO:96)
Survivina	96-104 wt	LTLGEFLKL (SEQ ID NO:97)
Survivina	96-104 M2 m	LMLGEFLKL (SEQ ID NO:98)
hTERT	1540-548	ILAKFLHWL (SEQ ID NO:99)
hTERT	572-580Y	YLFFYRKS SV (SEQ ID NO:100)
hTERT	988Y	YLQVNSLQTV (SEQ ID NO:101)
hTERT	30-38 wt	RLGPQGWRL (SEQ ID NO:102)
hTERT	30-38 V9 m	RLGPQGW RV (SEQ ID NO:103)
hTERT	865-873	RLVDDFLLV (SEQ ID NO:104)
WT1	37-45	VLDFAAPGA (SEQ ID NO:105)
WT1	126-134	RMFPNAPYL (SEQ ID NO:106)
WT1	R1Y WT1 ₁₂₆	YMFNAPYL (SEQ ID NO:107)
WT1	187-195	SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 108)
WT1	235-243	CMTWNQMNL (SEQ ID NO:109)

- Según se apunta anteriormente, los epítomos listados en la Tabla 3 son ejemplares. Un experto normal en la técnica será capaz de identificar otros epítomos para estos antígenos asociados a tumores. Además, el experto normal reconocerá fácilmente que los epítomos listados en la Tabla 3 se pueden modificar mediante sustituciones de aminoácidos para alterar la unión al HLA (p. ej., para mejorar la unión al HLA). Estos epítomos se pueden modificar en una, dos, tres, cuatro, cinco o seis posiciones y se pueden probar con respecto a la unión al HLA. Basándose en estos ensayos de unión habituales, se pueden seleccionar para el uso los que tengan la actividad de unión deseada y los que sean capaces de inducir sensibilidad de células T adecuada.
- 5 Los péptidos antigénicos descritos en la presente se pueden usar en vacunas multi-peptídicas o para cargar células que presentan antígeno que se pueden usar a continuación para vacunación. Estos epítomos estimulan una respuesta inmunitaria mediada por células T (p. ej., una respuesta de células T citotóxicas) mediante la presentación a célula T sobre moléculas del MHC. Por lo tanto, los epítomos peptídicos útiles de mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1 incluyen porciones de sus secuencias de aminoácidos que se unen a moléculas del MHC y en ese estado unido son presentadas a células T.
- 10 Los seres humanos tienen tres locus genéticos diferentes que codifican moléculas del MHC clase I (denominados antígenos leucocitarios humanos (HLA)): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-A*11 son ejemplos de diferentes alelos del MHC clase I que se pueden expresar a partir de estos locus. Los seres humanos también tienen tres locus diferentes para genes del MHC clase II: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Los péptidos que se unen a moléculas del MHC clase I tienen generalmente una longitud de 8-10 aminoácidos. Los péptidos que se unen a moléculas del MHC clase II tienen generalmente una longitud de 13 aminoácidos o más (p. ej., una longitud de 12-17 aminoácidos).
- 15 Los epítomos de células T se pueden identificar por un número de métodos diferentes. Los epítomos del MHC procesados naturalmente se pueden identificar mediante análisis espectrofotométrico de masas de péptidos eluidos de APC cargadas de antígeno (p. ej., APC que han recogido antígeno o que se han manipulado para producir la proteína intracelularmente). Después de la incubación a 37°C, las células se someten a lisis en detergente y la proteína del MHC se purifica (p. ej., mediante cromatografía de afinidad). El tratamiento del MHC purificado con un medio químico adecuado (p. ej., bajo condiciones ácidas, p. ej., al hervir en ácido acético al 10%, según se describe en Sánchez y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(9): 4626-4630, 1997) da como resultado la elución de péptidos procedentes del MHC. Este conjunto de péptidos se separa y el perfil se compara con péptidos procedentes de APC de control tratadas del mismo modo. Los picos únicos para las células que expresan/alimentadas con proteína se analizan (por ejemplo mediante espectrometría de masas) y los fragmentos peptídicos se identifican. Este protocolo identifica péptidos generados a partir de un antígeno particular mediante procesamiento de antígenos y proporciona un medio directo para aislar estos antígenos.
- 20 Alternativamente, se identifican epítomos de células T al cribar una biblioteca sintética de péptidos que se solapan y se extienden por la longitud del antígeno en un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, se pueden usar péptidos que tienen una
- 25
- 30
- 35
- 40

longitud de 9 aminoácidos y que se solapan en 5 aminoácidos. Los péptido se prueban en un sistema de presentación de antígeno que incluye células que presentan antígeno y células T. La activación de célula T en presencia de APCs que presentan el péptido se puede medir (p. ej., al medir la proliferación de células T o la producción de citocinas) y comparar con controles, para determinar si un epítipo particular es reconocido por las células T.

Otro modo de identificar epítopos de células T es mediante análisis algorítmico de secuencias que tienen unión predictiva a HLA (véase, p. ej., www.immuneepitope.org) seguido por estudios de unión y confirmación con inducción *in vitro* de células T CD8 específicas para el péptido.

Los epítopos de células T descritos en la presente se pueden modificar para incrementar la inmunogenicidad. Un modo de incrementar la inmunogenicidad es mediante la adición de residuos de aminoácidos dibásicos (p. ej., Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg o Lys-Lys) a los extremos N y C de péptidos. Otro modo de incrementar la inmunogenicidad es mediante sustituciones de aminoácidos bien para mejorar la unión al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) al modificar residuos de anclaje ("epítopos de anclaje fijos") o bien para mejorar la unión al receptor de células T (TCR) al modificar sitios de interacción con TCR ("epítopos heteroclíticos") (véase, p. ej., Sette y Fikes, *Current Opinion in Immunology*, 2003, 15:461-5470). En algunas realizaciones, los epítopos descritos en la presente pueden estar modificados en uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis posiciones. Incluso los epítopos no inmunogénicos o de baja afinidad se pueden hacer inmunogénicos al modificar su secuencia para introducir una tirosina en la primera posición (véase, p. ej., Tourdot y cols., *Eur. J Immunol.*, 2000, 30:3411-3421).

Los péptidos también incluyen mutaciones internas que los convierten en "superantígenos" o "superagonistas" para la estimulación de células T. Se pueden generar péptidos superantigénicos al cribar células T con una biblioteca combinatoria de péptidos sintéticos de barrido posicional (PS-CSL) según se describe en Pinilla y cols., *Biotechniques*, 13(6):901-5, 1992; Borrás y cols., *J. Immunol. Methods*, 267(1):79-97, 2002; Publicación de EE. UU. N° 2004/0072246; y Lustgarten y cols., *J. Immun.* 176:1796-1805, 2006. En algunas realizaciones, un péptido superagonista es un péptido mostrado en la Tabla 2, anteriormente, con uno, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos que convierten al péptido en un inmunógeno más potente.

Se pueden obtener péptidos antigénicos mediante síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado disponible comercialmente. Los péptidos sintetizados químicamente se pueden precipitar y purificar adicionalmente, por ejemplo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Alternativamente, los péptidos se pueden obtener mediante métodos recombinantes usando sistemas de expresión de células hospedadoras y vectores. "Péptidos sintéticos" incluye péptidos obtenidos mediante síntesis química *in vitro* así como péptidos obtenidos mediante expresión recombinante. Cuando se obtienen sintéticamente péptidos de antígenos tumorales, se pueden incubar con células que presentan antígeno en concentraciones superiores (p. ej., concentraciones superiores que las que estarían presentes en lisados celulares de antígenos tumorales, que incluye una abundancia de péptidos de proteínas celulares normales no inmunogénicas). Esto permite niveles superiores de presentación mediada por el MHC del péptido antigénico tumoral de interés y una inducción de una respuesta inmunitaria más potente y más específica y una menor probabilidad de provocar reactividad autoinmunitaria no deseable contra células no cancerosas sanas.

Vacunas multipeptídicas

Al formular una vacuna multipeptídica no solo es importante identificar y caracterizar antígenos asociados a tumores expresados en el cáncer de interés, sino también las combinaciones de diferentes epítopos procedentes de los antígenos asociados a tumores que incrementan la probabilidad de una respuesta a más de un epítipo para el paciente. Para contrarrestar la capacidad del tumor para evadir terapias dirigidas contra él, la presente divulgación utiliza una variedad de péptidos específicos en la vacuna. Específicamente, las combinaciones o mezclas de al menos un epítipo de los siete antígenos asociados a tumores siguientes particularmente útiles para tratamientos inmunoterapéuticos: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. La eficacia de una vacuna multipeptídica que comprende epítopos de los siete antígenos anteriores se puede mejorar adicionalmente al incluir en esta vacuna multivalente al menos un epítipo procedente de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de los siguientes antígenos asociados a tumores: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1. Se puede usar más de un epítipo procedente de la misma proteína en la vacuna multipeptídica. Por ejemplo, la vacuna puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro epítopos diferentes procedentes de los catorce antígenos asociados a tumores listados anteriormente. Además, también se pueden usar uno o más epítopos procedentes de antígenos distintos a los catorce listados anteriormente (p. ej., CT45, SP-17, SCP-1).

Las vacunas multipeptídicas descritas en la presente abarcan una mezcla de péptidos aislados que comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:15 o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:17; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o

sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:26; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:28; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:40; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:49; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:55; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:66.

Ciertas vacunas multipeptídicas descritas en la presente comprenden una mezcla de péptidos correspondientes a los siguientes epítomos: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2.

Las vacunas multipeptídicas de la presente divulgación pueden contener mezclas de epítomos procedentes de epítomos restringidos al HLA-A2 solos; epítomos restringidos al HLA-A2 en combinación con al menos un epítomo restringido al HLA-A1 o HLA-A3; epítomos restringidos al HLA-A2 en combinación con al menos un epítomo restringido al HLA-DR, HLA-DQ y/o HLA-DP; o epítomos restringidos al HLA-A2 en combinación con al menos un epítomo restringido al HLA-A1 o HLA-A3 y al menos un epítomo restringido al HLA-DR, HLA-DQ y/o HLA-DP. Los epítomos de MHC clase I y MHC clase II pueden proceder del mismo antígeno o antígenos diferentes.

Para el tratamiento de cánceres ginecológicos (p. ej., ovarios, trompas de Falopio) o cáncer peritoneal, la vacuna multipeptídica puede comprender al menos un epítomo procedente de los siete antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor α 2 de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. Por ejemplo, una vacuna multipeptídica para el uso en el tratamiento de un cáncer ginecológico o peritoneal puede comprender los siguientes péptidos de epítomos restringidos al HLA-A2: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2. La vacuna también puede incluir al menos una secuencia de epítomos restringidos al HLA-A1 tales como EADPTGHSY (SEQ ID NO:127) (epítomo de MAGE-A1) y/o al menos una secuencia de epítomos restringidos al HLA-A3 tales como SLFRAVITK (SEQ ID NO:128) (epítomo de MAGE-A1) y VLENTSPK (SEQ ID NO:129) (epítomo de Her-2/neu). Una vacuna para el uso en el tratamiento del cáncer ovárico, de las trompas de Falopio o peritoneal puede incluir además al menos un epítomo del MHC clase II (p. ej., AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:130), el epítomo de pan-DR (PADRE); AQYIKANSKFIGITEL (SEQ ID NO:131), un péptido de toxoide del tétanos modificado). Además, una vacuna para el tratamiento de cánceres ginecológicos (p. ej., ovárico, de las trompas de Falopio) o el cáncer peritoneal también puede incluir uno o más epítomos (clase I (p. ej., HLA-A2) y/o clase II) de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de los siguientes antígenos asociados a tumores: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1.

La mezcla multipeptídica se puede administrar con adyuvantes para hacer la composición más inmunogénica. Adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, GM-CSF, Montanide (p. ej., Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V y Montanide ISA-51), 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax®, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos de TLR5 derivados de flagelina, ligando FLT3, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas tales como IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23, interferón- α o - β o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilado A, emulsiones de agua en aceite y aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema vectorial PepTel®, micropartículas basadas en poli(láctido-co-glicólido) [PLG] y de dextrano, talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, trampa de VEGF, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulación QS21 de Aquila, extractos micobacterianos y miméticos sintéticos de la pared celular bacteriana, Detox de Ribit, Quil, Superfos, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, trampa de VEGF, ZD2171, AZD2171 y anticuerpos anti-CTLA4. Se pueden usar oligonucleótidos inmunoestimulantes de CpG para mejorar los efectos de los adyuvantes en un entorno de vacuna. En una realización, la vacuna multipeptídica se administra con Montanide ISA-51 y/o GM-CSF.

Las composiciones multipeptídicas de la presente divulgación se puede administrar parenteralmente (p. ej., subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal) u oralmente. Los péptidos y opcionalmente otras moléculas (p. ej., adyuvantes) se pueden disolver o suspender en un portador farmacéuticamente aceptable. Además, las composiciones multipeptídicas de la presente divulgación pueden contener tampones y/o excipientes. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimulantes, tales como citocinas.

Los péptidos para el uso en la vacuna se pueden sintetizar, por ejemplo, al usar el modo de Fmoc-poliámidas de síntesis de péptidos en fase sólida que es divulgado por Lu y cols (1981) J. Org. Chem. 46, 3433 y las referencias citadas allí. Los péptidos descritos en la presente se pueden purificar mediante una cualquiera o una combinación de técnicas tales como recristalización, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico,

5 cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa usando, p. ej., separación con gradiente de acetonitrilo/agua. El análisis de los péptidos se puede llevar a cabo usando cromatografía en capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa, análisis de aminoácidos después de hidrólisis ácida y mediante análisis espectrométrico de masas con bombardeo atómico rápido (FAB), así como análisis espectrométrico de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

10 Los péptidos divulgados en la presente pueden tener tramos de aminoácidos situados N- y/o C-terminalmente adicionales que no forman parte necesariamente del péptido que funciona como el epítipo real para moléculas del MHC pero que, no obstante, pueden ser importantes para la introducción eficaz del péptido en células. Los péptidos descritos en la presente también se pueden modificar para mejorar la estabilidad y/o la unión a moléculas del MHC para provocar una respuesta inmunitaria más fuerte. Métodos para esta optimización de una secuencia peptídica son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o enlaces no peptídicos. Los péptidos que comprenden las secuencias descritas en la presente se pueden sintetizar con grupos químicos adicionales presentes en sus extremos amino y/o carboxi, para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrófobos tales como carbobenzoxilo, dansilo, t-butiloxicarbonilo, acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo se pueden añadir al extremo amino de los péptidos. Adicionalmente, grupos hidrófobos, t-butiloxicarbonilo o se pueden añadir al extremo carboxi de los péptidos. Además, todos los péptidos descritos en la presente se pueden sintetizar para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, se puede usar el isómero D de uno o más de los residuos de aminoácido de los péptidos, en lugar del isómero L habitual. Por otra parte, al menos uno de los residuos de aminoácido de los péptidos se puede sustituir con uno de los residuos de aminoácido no presentes en la naturaleza bien conocidos. Alteraciones tales como estas pueden servir para incrementar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la acción de unión de los péptidos de la divulgación. Los péptidos descritos en la presente también se pueden modificar con polietilenglicol (PEG) y otros polímeros para prolongar sus semividas.

Una vez que se prepara cada péptido, se puede solubilizar, filtrar estérilmente y almacenar bien por sí mismo o bien mezclado con otros péptidos de la vacuna multi-peptídica y almacenar a bajas temperaturas (p. ej., -80°C) y protegido de la luz.

30 Preparación de células que presentan antígeno

Las células que presentan antígeno (APCs) son células que exhiben antígenos complejados con proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) sobre sus superficies. Las células T no pueden reconocer y por lo tanto no reaccionan con antígeno "libre". Las APCs procesan antígenos y los presentan a células T. Las células T pueden reconocer estos complejos usando sus receptores de células T (TCRs). Ejemplos de APCs incluyen células dendríticas, macrófagos, células B y ciertas células epiteliales activadas. Las células dendríticas (DCs) incluyen células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmacitoides. Las APCs, adecuadas para la administración a sujetos (p. ej., pacientes con cáncer), se pueden aislar u obtener de cualquier tejido en el que se encuentran estas células o de otro modo se pueden cultivar y proporcionar.

40 Las APCs (p. ej., DCs) se pueden encontrar, a modo de ejemplo, en la médula ósea o las PBMCs de un mamífero, en el bazo de un mamífero o en la piel de un mamífero (es decir, células de Langerhans, que poseen ciertas cualidades similares a las de DC, se pueden encontrar en la piel). Por ejemplo, la médula ósea se puede recoger de un mamífero y cultivarse en un medio que promueve el crecimiento de DC. GM-CSF, IL-4 y/o otras citocinas (p. ej., TNF- α), factores de crecimiento y complementos se pueden incluir en este medio. Después de una cantidad de tiempo adecuada en el cultivo en medio que contiene citocinas apropiadas (p. ej., adecuadas para expandir y diferenciar las DCs en DCs maduras, p. ej., 4, 6, 8, 10, 12 o 14 días), aglomerados de DC se cultivan en presencia de epítopos de antígenos de interés (p. ej., en presencia de una mezcla de al menos un epítipo procedente de: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2; y, opcionalmente, epítopos procedentes de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de los siguientes antígenos: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1) y se recogen para el uso en una vacuna contra el cáncer usando técnicas estándar.

55 Los epítopos usados para el cultivo con las APCs dependerán del tipo de cáncer. Por ejemplo, para el tratamiento del cáncer ginecológico (p. ej., cánceres ovárico o de las trompas de Falopio) o el cáncer peritoneal, se puede elegir al menos un epítipo (p. ej., epítipo del HLA-A2) de los siguientes antígenos: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1 y EphA2. Por ejemplo, los epítopos comprenden: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:15 o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:17; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:26; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:28; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:40; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) con cuatro o

menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:49; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:55; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:66. En otra realización, los epítomos comprenden: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2. Opcionalmente, también se podrían incluir epítomos procedentes de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete de los siguientes antígenos: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1. En ciertas realizaciones, el epítomo que se usa es un epítomo del HLA-A2. Además de los epítomos del HLA-A2, las APCs también se pueden expandir en presencia de epítomos del MHC clase II epítomos y/u otros epítomos del HLA (p. ej., HLA-A1 y/o HLA-A3). Epítomos de los antígenos (p. ej., péptidos purificados aislados o péptidos sintéticos) se pueden añadir a los cultivos en una concentración de 1 μ g/ml - 50 μ g/ml por epítomo, p. ej., 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 o 40 μ g/ml por epítomo. Se producen vacunas de APC (p. ej., vacunas de DC) específicas para el sujeto, se etiquetan cuidadosamente y se almacenan. Dosis individuales de las APCs (p. ej., DCs) (p. ej., 1 a 50 x 10⁶ células cargadas con péptido se pueden crioconservar en albúmina sérica humana que contiene 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) o en cualquier otro medio adecuado para el uso futuro. En una realización, la vacuna basada en APC es la Vacuna Ejemplar 1 (una vacuna de DC) divulgada en el Ejemplo 4.

En un método ejemplar para preparar APC (p. ej., DC), las APC se aíslan de un sujeto (p. ej., un ser humano) según el siguiente procedimiento. Las células mononucleares se aíslan de la sangre usando leucaféresis (p. ej., usando un COBE Spectra Apheresis System). Se deja que las células mononucleares se vuelvan adherentes mediante incubación en matraces para tejido durante 2 horas a 37°C. Las células no adherentes se retiran mediante lavado. Las células adherentes se cultivan en medio complementado con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (800 unidades/ml, calidad clínica, Immunex, Seattle, WA) e interleucina-4 (IL-4) (500 unidades/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN) durante cinco días. El día cinco, se añade TNF- α al medio de cultivo durante otros 3-4 días. El día 8 o 9, las células se recogen y se lavan y se incuban con antígenos peptídicos durante 16-20 horas en un rotor para tejidos. En una realización, los epítomos comprenden: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:15 o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:17; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:26; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:28; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:40; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:49; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:55; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) con cuatro o menos, tres o menos, dos o menos o una sustitución o sustituciones de aminoácidos dentro de SEQ ID NO:66. En otra realización, los epítomos comprenden: SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina; SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1; EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP; VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu; WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R α 2; KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2. Los péptido antigénicos se añaden a los cultivos a una concentración de aproximadamente 10 μ g/ml a aproximadamente 20 μ g/ml por epítomo.

Se pueden usar otros varios métodos para aislar las APCs, como será reconocidos por un experto en la técnica. Las DCs se presentan en números bajos en todos los tejidos en los que residen, requiriendo el aislamiento y el enriquecimientos de las DCs. Cualquiera de un número de procedimientos que implican separación repetitiva en gradiente de densidad, técnicas de clasificación celular activadas por fluorescencia, selección positiva, selección negativa o una combinación de las mismas se usa para obtener poblaciones enriquecidas de DCs aisladas. Una guía de estos métodos para aislar DCs se pueden encontrar, por ejemplo, en O'Doherty y cols., J. Exp. Med., 178: 1067-1078, 1993; Young y Steinman, J. Exp. Med., 171: 1315-1332, 1990; Freudenthal y Steinman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57: 7698-7702, 1990; Macatonia y cols., Immunol., 67: 285-289, 1989; Markowicz y Engleman, J. Clin. Invest., 85: 955-961, 1990; Mehta-Damani y cols., J. Immunol., 153: 996-1003, 1994; y Thomas y cols., J. Immunol., 151: 6840-6852, 1993. Un método para aislar DCs de sangre periférica humana se describe en la Patente de EE. UU. N° 5.643.786.

Las DCs preparadas según los métodos descritos aquí presentan epítomos correspondientes a los antígenos a una densidad media superior que los epítomos presentes sobre células dendríticas expuestas a un lisado tumoral (p. ej., un lisado de cáncer ovárico). La densidad relativa de uno o más antígenos sobre células que presentan antígeno se puede determinar por medios tanto indirectos como directos. La respuesta inmunitaria primaria de animales no tratados es aproximadamente proporcional a la densidad antigénica de células que presentan antígeno (Bullock y cols., J. Immunol., 170:1822-1829, 2003). Por lo tanto, la densidad antigénica relativa entre dos poblaciones de células que presentan antígeno se puede estimar al inmunizar a un animal con cada población, aislar células B o T y comprobar la respuesta inmunitaria específica contra el antígeno específico, p. ej., mediante ensayos con tetrámeros, ELISPOT o PCR cuantitativa.

La densidad antigénica relativa también se puede medir directamente. En un método, las células que presentan antígeno se tiñen con un anticuerpo que se une específicamente al complejo MHC-antígeno y las células se analizan a continuación para determinar la cantidad relativa de anticuerpo que se une a cada célula (véase, p. ej., González y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:4824-4829, 2005). Métodos ejemplares para analizar la unión a anticuerpos incluyen citometría de flujo y clasificación celular activada por fluorescencia. Los resultados de los análisis se pueden presentar, p. ej., como la proporción de células que son positivas a la tinción para un complejo MHC-antígeno individual o la cantidad relativa media de tinción por célula. En algunas realizaciones, se puede crear un histograma de cantidad relativa de tinción por célula.

En algunas realizaciones, la densidad antigénica se puede medir directamente mediante el análisis directo de los péptidos unidos al MHC, p. ej., mediante espectrometría de masas (véase, p. ej., Purcell y Gorman, Mol. Cell. Proteomics, 3:193-208, 2004). Típicamente, los péptidos unidos al MHC se aíslan mediante uno de varios métodos. En un método, se analizan lisados celulares de células que presentan antígeno, a menudo después de ultrafiltración para enriquecer con respecto a péptidos pequeños (véanse, p. ej., Falk y cols., J. Exp. Med., 174:425-434, 1991; Rotzshke y cols., Nature, 348:252-254, 1990). En otro método, los péptidos unidos al MHC se aíslan directamente de la superficie celular, p. ej., mediante elución con ácido (véanse, p. ej., Storkus y cols., J. Immunother., 14:94-103, 1993; Storkus y cols., J. Immunol., 151:3719-27, 1993). En otro método, los complejos MHC-péptido se purifican por inmunoafinidad de lisados celulares que presentan antígeno y los péptidos unidos al MHC se eluyen a continuación mediante tratamiento ácido (véase, p. ej., Falk y cols., Nature, 351:290-296). Después del aislamiento de péptidos unidos al MHC, los péptidos se analizan a continuación mediante espectrometría de masas, a menudo después de una etapa de separación (p. ej., cromatografía de líquidos, electroforesis capilar en gel o electroforesis bidimensional en gel). Los antígenos peptídicos individuales se pueden tanto identificar como cuantificar usando espectrometría de masas para determinar la proporción media relativa de cada antígeno en una población de células que presentan antígeno. En algunos métodos, las cantidades relativas de un péptido en dos poblaciones de células que presentan antígeno se comparan usando marcaje isotópico estable de una población, seguido por espectrometría de masas (véase, p. ej., Lemmel y cols., Nat. Biotechnol., 22:450-454, 2004).

Administración de vacuna basada en células que presentan antígenos

La vacuna basada en APC se puede aportar a un paciente (p. ej., un paciente que tiene un cáncer ginecológico o un cáncer peritoneal) o un animal de prueba mediante cualquier vía de aporte adecuada, que puede incluir inyección, infusión, inoculación, aporte quirúrgico directo o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la vacuna contra el cáncer se administra a un ser humano en la región deltoidea o la región axilar. Por ejemplo, la vacuna se administra en la región axilar como una inyección intradérmica. En otras realizaciones, la vacuna se administra intravenosamente.

Un portador apropiado para administrar las células puede ser seleccionado por un experto en la especialidad mediante técnicas habituales. Por ejemplo, el portador farmacéutico puede ser una solución salina tamponada, p. ej., un medio de cultivo celular, y puede incluir DMSO para conservar la viabilidad celular. En ciertas realizaciones, las células se administran en un medio de criopreservación infundible. La composición que comprende las células pueden incluir DMSO y Hetastarch como crioprotectores, soluciones de Plasmalyte A y/o dextrosa y albúmina sérica humana como un componente proteínico.

La cantidad de APC apropiada para la administración a un paciente como una vacuna contra el cáncer para efectuar los métodos descritos en la presente y la vía más conveniente de esta administración se basan en una variedad de factores, tales como la formulación de la propia vacuna. Algunos de estos factores incluyen las características físicas del paciente (p. ej., edad, peso y sexo), las características físicas del tumor (p. ej., localización, tamaño, velocidad de crecimiento y accesibilidad) y el grado hasta el que otras metodologías terapéuticas (p. ej., quimioterapia y radioterapia con haces) se estén realizando en relación con un régimen de tratamiento global. A pesar de la variedad de factores que se debe considerar al realizar los métodos de la presente divulgación para tratar un estado de enfermedad, a un mamífero se le pueden administrar de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 APC (p. ej., 10^7 APC) en de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 2 ml de solución (p. ej., solución salina) en una sola administración. Se pueden llevar a cabo administraciones adicionales, dependiendo de los factores descritos anteriormente y otros, tales como la gravedad de la patología tumoral. En una realización, se realizan de aproximadamente cinco administraciones de aproximadamente 10^6 APC a intervalos de dos semanas.

La vacunación con DC puede estar acompañada por otros tratamientos. Por ejemplo, un paciente que recibe vacunación con DC también puede estar recibiendo quimioterapia, radiación y/o terapia quirúrgica, antes, simultáneamente o después de la vacunación con DC. La quimioterapia se usa para reducir y frenar el cáncer, La quimioterapia está recomendada para la mayoría de las mujeres que tienen cáncer ginecológico (p. ej., cáncer ovárico y cáncer de las trompas de Falopio) o cáncer peritoneal después de la cirugía inicial para el cáncer; sin embargo, a veces la quimioterapia se da para reducir el cáncer antes de la cirugía. El número de ciclos de tratamiento con quimioterapia depende del estadio de la enfermedad. La quimioterapia puede neutralizar una respuesta inmunitaria antitumoral generada a través de terapia con vacuna. Además, la quimioterapia se puede

combinar seguramente con inmunoterapia, con efectos posiblemente aditivos o sinérgicos, con la condición de que las combinaciones se diseñen racionalmente. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en tratamientos de pacientes con cánceres ginecológicos (p. ej., cánceres ovárico, de las trompas de Falopio) o peritoneales incluyen, pero no se limitan a, carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, etopósido, gemcitabina, oxaliplatino, paclitaxel, taxol, topotecano y vinorelbina. En una realización, un paciente es tratado con ciclofosfamida (intravenosamente 200 mg/kg) antes de la vacunación con APC (p. ej., DC). Por ejemplo, un paciente puede ser inyectado intravenosamente con ciclofosfamida (200 mg/kg) el día antes o entre 24 horas y una hora antes de la vacunación con APC (p. ej., DC). La ciclofosfamida es un fármaco alquilante que se usa para tratar varios tipos de cáncer. La ciclofosfamida es un profármaco inactivo; es convertida y activada por el hígado en dos productos químicos, acroleína y fosforamida. La acroleína y la fosforamida son los compuestos activos y frenan el crecimiento de células cancerosas al interferir con las acciones del ácido desoxirribonucleico (ADN) dentro de las células cancerosas. Por lo tanto, la ciclofosfamida se menciona como un fármaco citotóxico. Métodos para tratar el cáncer usando vacunación con DC junto con quimioterapia se describen, p. ej., en Wheeler y cols., Pat. EE. UU. N° 7.939.090. En algunas realizaciones, un paciente que recibe vacunación con DC ya ha recibido quimioterapia, radiación y/o tratamiento quirúrgico para el cáncer ginecológico o peritoneal.

Además de o separadamente del tratamiento quimioterapéutico, un paciente que reciba vacunación con DC puede ser tratado con cualesquiera otros tratamientos que sean beneficiosos para el cáncer ginecológico o peritoneal. Por ejemplo, un paciente (p. ej., uno que tiene cáncer ovárico, de las trompas de Falopio o peritoneal) se puede tratar antes de, simultáneamente o después de la vacunación con DC con un inhibidor de COX-2, según se describe, p. ej., en Yu y Akasaki, documento WO 2005/037995. En otra realización, un paciente que recibe vacunación con DC se puede tratar con bevacizumab (Avastin®) antes de, simultáneamente o después de la vacunación con DC.

Prueba inmunológica

Las respuestas inmunitarias celulares específicas antigénicamente de sujetos vacunados se pueden comprobar mediante un número de ensayos diferentes, tales como ensayos con tetrámeros y ELISPOT. Las siguientes secciones proporcionan ejemplos de protocolos para detectar respuestas con estas técnicas. Están disponibles métodos y protocolos adicionales. Véase, p. ej., Current Protocols in Immunology, Coligan, J. y cols., Eds., (John Wiley & Sons, Inc.; Nueva York, N.Y.).

Ensayo con tetrámeros

Tetrámeros comprendidos por moléculas del MHC recombinantes complejadas con un péptido se pueden usar para identificar poblaciones de células T específicas antigénicamente. Para detectar células T específicas para antígenos tales como HER-2, FBP y mesotelina, complejos de tetrámeros peptídicos específicos marcados con fluorocromo (p. ej., ficoeritrina (PE)-tHLA) que contienen péptidos procedentes de estos antígenos se pueden sintetizar y son proporcionados por Beckman Coulter (San Diego, CA). Células CTL clon CD8 específicas se pueden resuspender en un tampón, p. ej., en 10^5 células/50 μ l de tampón de FACS (tampón de fosfato más 1% de tampón de FCS inactivado). Las células se pueden incubar con 1 μ l de tHLA durante un tiempo suficiente, p. ej., durante 30 minutos a temperatura ambiente y la incubación se puede continuar durante un tiempo adicional, p. ej., 30 minutos a 4°C con 10 μ l de mAb anti-CD8 (Becton Dickinson, San Jose, CA). Las células se pueden lavar dos veces, p. ej., en 2 ml de tampón de FACS frío, antes del análisis mediante FACS (Becton Dickinson).

Ensayo ELISPOT

Los ensayos ELISPOT se pueden usar para detectar células que secretan citocinas, p. ej., para determinar si las células de un paciente vacunado secretan citocina en respuesta a un antígeno, demostrando de ese modo si se han provocado respuestas antigénicamente específicas. Estuches de ensayo ELISPOT son suministrados, p. ej., por R & D Systems (Minneapolis, MN) y se pueden emplear según se describe en las instrucciones del fabricante.

1×10^5 células PBMC de pacientes que responden al tratamiento (R) de antes y después de la vacunación se siembran en placas de 96 pocillos con inserciones de membrana de nitrocelulosa revestidas con Ab de captura. Células estimulantes (S) (células T2 deficientes en TAP impulsadas con antígeno) se añaden en la relación R:S de 1:1. Después de una incubación de 24 horas, las células se retiran al lavar las placas 4 veces. El Ab de detección se añade a cada pocillo. Las placas se incuban a 4°C durante la noche y las etapas de lavado se repiten. Después de una incubación de 2 horas con estreptavidina-AP, las placas se lavan. Partes alícuotas (100 μ l) de cromógeno BCIP/NBT se añaden a cada pocillo para desarrollar las manchas. La reacción se detiene, p. ej., después de 60 minutos, p. ej., al lavar con agua. Las manchas se pueden escanear y contar con un análisis de imágenes asistido por ordenador (Cellular Technology Ltd, Cleveland, OH). Cuando los valores experimentales son significativamente diferentes del número medio de manchas frente a células T2 no impulsadas (valores de fondo), según se determina mediante una prueba de suma de rangos de Wilcoxon bilateral, los valores de fondo se pueden sustraer de los valores experimentales.

Inducción *in vitro* de CTL en PBMCs derivadas de pacientes

El siguiente protocolo se puede usar para producir CTL antigénicamente específicos *in vitro* a partir de PBMC derivadas de pacientes. Para generar células dendríticas, las células adherentes plásticas procedentes de PBMCs se pueden cultivar en medio AIM-V complementado con GM-CSF humano recombinante e IL-4 humana recombinate a 37°C en una incubadora de CO₂ (5%) humidificada. Seis días más tarde, las células dendríticas inmaduras de los cultivos se pueden estimular con TNF- α humano recombinante para la maduración. Las células dendríticas maduras se pueden recoger a continuación el día 8, resuspender en PBS a 1×10^6 por ml con péptido (2 μ g/ml) e incubar durante 2 horas a 37°C. Células T CD8+ autólogas se pueden enriquecer a partir de PBMCs usando microcuentas magnéticas (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Las células T CD8+ (2×10^6 por pocillo) se pueden cocultivar con 2×10^5 por pocillo células dendríticas impulsadas por péptido en 2 ml/pocillo de medio AIM-V complementado con 5% de suero AB humano y 10 unidades/ml de rIL-7 (Cell Sciences) en cada pocillo de placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Se pueden añadir aproximadamente 20 U/ml de IL-2 24 h más tarde a intervalos regulares, 2 días después de cada reestimulación.

El día 7, los linfocitos se pueden reestimar con células dendríticas autólogas impulsadas con péptido en medio AIM-V complementado con 5% de suero AB humano, rIL-2 y rIL-7 (10 unidades/ml de cada uno). Se pueden añadir aproximadamente 20 U/ml de IL-2 24 h más tarde a intervalos regulares, 2 días después de cada reestimulación. El séptimo día, después de las tres rondas de reestimulación, las células se pueden recoger y se puede probar la actividad de CTL. Las células cultivadas (CTL) CD8+ estimuladas se pueden cocultivar con células T2 (una línea celular humana deficiente en TAP) impulsadas con 2 μ g/ml de péptidos de Her-2, FBP, mesotelina o receptor $\alpha 2$ de IL13. Después de 24 horas de incubación, el IFN- γ del medio se puede medir mediante un ensayo ELISA.

Composiciones farmacéuticas

En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas, p. ej., que incluyen un portador farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las vacunas descritas en la presente que incluyen vacunas mipeptídicas y células dendríticas cargadas con los antígenos descritos en la presente. "Portador farmacéuticamente aceptable", según se usa en la presente, se refiere a un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable que está implicado en soportar o transportar un compuesto de interés desde un tejido, un órgano o una porción del cuerpo a otro tejido, órgano o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser una carga líquida o sólida, un diluyente, un excipiente, un disolvente o un material encapsulante o una combinación de los mismos. Cada componente del portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" ya que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para el uso en contacto con cualesquiera tejidos u órganos con los que pueda entrar en contacto, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere sus beneficios terapéuticos.

En diversas realizaciones, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden formular para el aporte a través de cualquier vía de administración. "Vía de administración" se puede referir a cualquier ruta de administración, sea o no conocida actualmente en la técnica, incluyendo, pero no limitada a, aerosol, nasal, transmucosa, transdérmica o parenteral. "Parenteral" se refiere a una vía de administración que generalmente está asociada con la inyección, incluyendo intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal. A través de la vía parenteral, las composiciones pueden estar en la forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección o como polvos liofilizados.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden aportar en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa es la cantidad de la composición que dará los resultados más eficaces en cuanto a eficacia de tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo pero no limitados a las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo la edad, el sexo, el tipo y el estadio de la enfermedad, la condición física general, la sensibilidad a una dosificación dada y el tipo de medicación), la naturaleza del portador o los portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Un experto en las técnicas clínica y farmacológica será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz a través de experimentación habitual, a modo de ejemplo, al comprobar la respuesta de un sujeto a la administración de un sujeto y ajustar la dosificación según esto. Para una guía adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 21ª edición, Williams & Wilkins PA, EE. UU. de A.) (2005). En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna puede comprender de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 DC impulsadas con antígeno tumoral (p. ej., 10^6 , $0,5 \times 10^7$, 10^7 , $0,5 \times 10^8$, 10^8). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para reducir o detener el crecimiento del tumor, y/o para incrementar la supervivencia de un paciente.

Estuches

La presente divulgación también se dirige a estuches para tratar cánceres (p. ej., cáncer ovárico, cáncer peritoneal). Los estuches son útiles para poner en práctica el método de la invención para tratar el cáncer con una vacuna que comprende células dendríticas cargadas con los antígenos o vacunas multipéptidicas como las descritas en la presente. El estuche es una reunión de materiales o componentes, incluyendo al menos una de las composiciones descritas en la presente. Así, en algunas realizaciones, el estuche incluye un conjunto de péptidos para preparar células para la vacunación. El estuche también puede incluir agentes para preparar células (p. ej., citocinas para inducir diferenciación de DC *in vitro*). La divulgación también proporciona estuches que contienen una composición incluyendo una vacuna que comprende células dendríticas (p. ej., células dendríticas criopreservadas) cargadas con los antígenos que se describen en la presente.

La naturaleza exacta de los componentes configurados en los estuches descritos en la presente depende de su propósito pretendido. Por ejemplo, algunas realizaciones están configuradas con el propósito de tratar cánceres ováricos. En una realización, el estuche está configurado particularmente con el propósito de tratar sujetos mamíferos. En otra realización, el estuche está configurado particularmente con el propósito de tratar sujetos humanos. En realizaciones adicionales, el estuche está configurado para aplicaciones veterinarias, tratando sujetos tales como, pero no limitados a, animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

Opcionalmente, el estuche también contiene otros componentes útiles, tales como diluyentes, tampones, portadores farmacéuticamente aceptables, jeringas, catéteres, aplicadores, herramientas de pipeteo o medida u otra parafernalia útil que será fácilmente reconocida por los expertos en la técnica.

Los materiales o componentes reunidos en el estuche se pueden proporcionar al profesional sanitario almacenados de cualquier modo conveniente y adecuado que conserve su capacidad de operación y utilidad. Por ejemplo, los componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; se pueden proporcionar a temperaturas ambiente, refrigeradas o congeladas. Los componentes están contenidos típicamente en un material o materiales de envasado adecuados. Según se emplea en la presente, la expresión "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para alojar los contenidos del estuche, tales como las composiciones de la invención y similares. El material de envasado está construido mediante métodos muy conocidos, preferiblemente para proporcionar un ambiente estéril libre de contaminantes. Los materiales de envasado empleados en el estuche son los utilizados normalmente en tratamientos contra el cáncer o en vacunaciones. Según se usa en la presente, el término "envase" se refiere a una matriz sólida o un material adecuados tales como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaces de contener los componentes individuales del estuche. Así, por ejemplo, un envase puede ser un vial de vidrio usado para contener cantidades adecuadas de una composición de la invención que contiene, por ejemplo, una vacuna que comprende células dendríticas cargadas con epítopos procedentes de los antígenos que se describen en la presente. El material de envasado tiene generalmente una etiqueta externa que indica el contenido y/o el propósito del estuche y/o sus componentes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la divulgación reivindicada. En la medida en que se mencionen materiales específicos, es meramente con propósitos de ilustración y no se pretende limitar la divulgación. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reaccionantes equivalentes sin ejercitar capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la divulgación.

Ejemplo 1. Sumario del diseño de estudio global

Este estudio se efectúa de acuerdo con las directrices y las guías de the Declaration of Helsinki y the International Conference on Harmonization Guidance for Industry on Good Clinical Practice Consolidated Guidance (ICH GCP-E6).

Antes de iniciar el estudio, el protocolo y la autorización por escrito del paciente (ICF) se somete a revisión y aprobación por un comité de ética (IRB).

Los pacientes con cáncer ovárico epitelial (EOC), cáncer peritoneal primario (PPC) o carcinoma de las trompas de Falopio (FTC) en estadio FIGO III o IV histológicamente confirmado que no tienen evidencia de enfermedad (NED) por CT o PET/CT y están en remisión se criban para seleccionar sujetos para el tratamiento con una vacuna autóloga (Vacuna Ejemplar 1) que consiste en las DCs de los pacientes impulsadas con péptidos de epítopos del MHC clase I sintéticos procedentes de siete antígenos asociados a células madre tumorales (es decir, mesotelina, NY-ESO-1, FBP, Her2/neu, IL13Ra2, MAGE-A1 y EphA2).

Los criterios de inclusión y exclusión del cribado para este estudio se listan posteriormente.

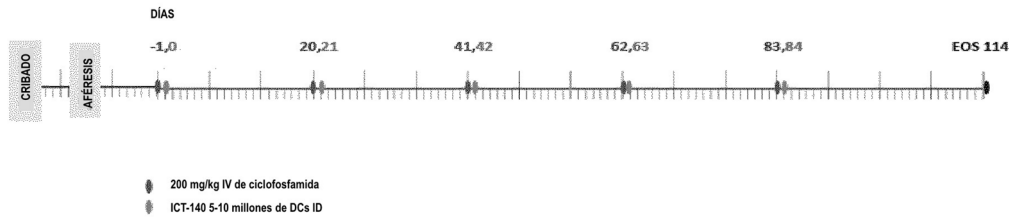
Criterios de inclusión del cribado

1. El sujeto debe entender y firmar la autorización por escrito específica del estudio
- 5 2. El sujeto debe estar actualmente en remisión clínica mediante los criterios clínicos y radiológicos (criterios RECIST 1.1). [deben de haber transcurrido >15 semanas para sujetos en remisión primaria y >12 semanas para los que estén en remisión secundaria]
3. La presencia de ascitis o efusiones pleurales no es excluyente si estas son asintomáticas y no tienen citología positiva
4. Estado de comportamiento de ECOG de 0 o 1
5. Esperanza de vida > 6 meses
- 10 6. Positividad a HLA-A2
7. Función renal, hepática y de la médula ósea adecuada basada en evaluaciones de cribado de laboratorio. Los estudios hematológicos y los perfiles químicos iniciales deben cumplir los siguientes criterios:
 - a) hemoglobina (Hgb) > 9,9 g/dl
 - b) hematocrito > 30%
 - 15 c) número absoluto de neutrófilos (ANC) > 1000/mm³
 - d) número de plaquetas > 100.000/mm³
 - e) nitrógeno de urea en sangre (BUN) < 30 mg/dl
 - f) creatinina < 2 mg/dl
 - 20 g) fosfatasa alcalina (ALP), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) < 4 x límite superior de lo normal (ULN)
 - h) tiempo de protrombina (PT) y tiempo de tromboplastina parcial (PTT) activado ≤ 1,6x a menos que esté terapéuticamente garantizado
8. La autorización por escrito, el formulario de divulgación de expedientes médicos y la ley de portabilidad y responsabilidad del seguro médico (HIPAA) revisados y firmados por el paciente o los representantes legalmente autorizados.
- 25

Criterios de exclusión del cribado:

1. Sujetos con cualquier evidencia de metástasis según se confirma mediante diagnóstico por imagen.
2. Sujetos que reciben un fármaco de estudio en fase de investigación para cualquier indicación o tratamiento de base inmunológica por cualquier razón
- 30 3. Sujetos con afecciones simultáneas que podrían comprometer la seguridad del sujeto o la aceptación del protocolo
4. El sujeto tiene una infección por hepatitis C o B crónica o aguda
5. El sujeto tiene un resultado de prueba positivo en a visita de cribado para uno o más de los siguientes: HTLV-1/2 y/o anticuerpo Anti-HIV 1 (α-HIV-1)

6. El sujeto requiere o es probable que requiera más de un tratamiento de más de dos semanas de corticosteroides por una dolencia intercurrente. El sujeto debe completar el tratamiento de corticosteroides 2 semanas antes del cribado para ser elegible.
- 5 7. El sujeto tiene insuficiencia renal según se define por una creatinina sérica > 2,0 mg/dl o BUN > 30 mg/dl. Nota: Si la creatinina es mayor de 1,5 x ULN, la depuración de creatinina debe ser mayor de 60 ml/min.
8. Un sujeto con insuficiencia hepática según se define por una bilirrubina sérica total > 2,0 y/o transaminasas séricas > 3X los límites superiores de lo normal.
9. El sujeto tiene insuficiencia hematopoyética al principio según se define por uno de los siguientes:
- Plaquetas < 100.000/ mm³
- 10 WBC < 2.500/mm³
- Número absoluto de neutrófilos (ANC) < 1.000/mm³
- Número absoluto de linfocitos < 200/ mm³
- Hematocrito < 30%
- 15 10. El sujeto tiene una infección aguda que requiere un tratamiento activo con antibióticos/antivirales; la terapia aguda se debe haber finalizado siete días antes de la incorporación al estudio.
11. El sujeto está recibiendo una medicación o medicaciones que podrían afectar a la función inmunitaria. El uso de antagonistas de H2 está prohibido ya que son todos antihistamínicos cinco días antes y cinco días después de cada inyección de la vacuna de estudio. Sin embargo, se permiten NSAIDS incluyendo inhibidores de COX-2, acetaminofeno o aspirina.
- 20 Después de firmar la autorización y terminar los procedimientos de cribado, los pacientes se someten a una aféresis de ~10-15 litros el día -30 a -15 en el centro del estudio para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que se van a usar para la preparación del tratamiento de estudio.
- 25 El producto de la aféresis se usa para preparar células dendríticas autólogas que a continuación se impulsan con epítopos procedentes de los siete antígenos asociados a células madre tumorales sintéticos. Los sujetos reciben cinco dosis de 5-10 x 10⁶ células dendríticas autólogas impulsadas con los siete antígenos asociados a células madre tumorales sintéticos intradérmicamente los días 0, 21, 42, 63 y 84 y 200 mg/m² de ciclofosfamida el día antes de cada vacuna. Se administran vacunas de inducción posteriores cada tres semanas durante la Fase de inducción de la vacuna.
- 30 Todos los sujetos tendrán una evaluación de final de estudio (EOS) aproximadamente 30 días después de la quinta vacuna el día ~114. Los sujetos que continúan "Sin evidencia de enfermedad" (NED) tienen la opción de entrar en la Fase de mantenimiento donde tendrán la opción de someterse a terapia de mantenimiento continuando los tratamientos cada 4 semanas hasta el agotamiento de la vacuna o la confirmación de enfermedad progresiva (PD).
- 35 Los esquemas de tratamiento y las evaluaciones de seguridad y eficacia son iguales para todos los pacientes. La seguridad se comprobará a lo largo de todo el estudio.
- 40 Se espera que la duración del estudio sea de 20 a 24 meses. La duración del estudio para cada paciente depende de la cantidad de tratamiento de estudio producido por el paciente, la progresión de la enfermedad, la presencia de toxicidades inaceptables y el tiempo necesario para la aféresis y la preparación del tratamiento de estudio. Después de la inclusión, tendrá lugar la aféresis. Esto es seguido por la Producción de vacuna. A continuación, los pacientes pueden entrar en la Fase de inducción de vacuna. La vacunación de mantenimiento opcional continuará hasta el agotamiento del tratamiento de estudio o la confirmación de PD, lo que ocurra antes. El estudio continuará hasta que todos los pacientes terminen sus evaluaciones de fin de estudio (EOS).
- 45 Se contacta con los sujetos cada 6 meses durante 5 años para comprobar la supervivencia. Este seguimiento puede ser un contacto telefónico o por escrito y empieza después de la última visita clínica terminada.
- 50 Una representación esquemática de la línea temporal del estudio se representa a continuación:



Ejemplo 2. Preparación de células dendríticas (DC) autólogas

Se identifican pacientes positivos en antígeno leucocitario humano A2 (HLA-A2 o A2) con cáncer ovárico, cáncer peritoneal primario o carcinoma de las trompas de Falopio. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de estos pacientes entre los días -30 a -15 usando leucaféresis. The COBE Spectra Apheresis System se usa para recoger la capa de células mononucleares. La leucaféresis da aproximadamente 10^{10} células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Si estas células no se van a procesar para preparar DCs poco después de que se recojan, el producto se envasa en recipientes de plomo aislados con controladores de la temperatura para asegurar que se mantenga un intervalo de temperatura de $2 \pm 18^\circ\text{C}$.

Para el procesamiento de las PBMCs para preparar DCs, se deja que las PBMCs se vuelvan adherentes durante dos horas a 37°C en un matraz de cultivo tisular y se lavan en HBSS. Las PBMC se siembran a una densidad de $1,4 \times 10^5$ células/cm² en matraces de cultivo de 185 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) y se deja que se adhieran durante 2 h a 37°C . Las células no adherentes se retiran al lavar cuatro veces. Las células adherentes se cultivan en RPMI 1640 complementado con GM-CSF (Berlex) e IL-4 (R&D systems) durante 5 días. El día 5, se añaden al medio de cultivo 50 ng/ml de TNF- α de calidad clínica (R&D systems) durante otros 3-4 días. Los días 8-9, se recogen DCs y se lavan tres veces. El número mínimo de DCs requerido para producir el tratamiento de estudio es 7×10^9 .

Ejemplo 3. Preparación de vacunas

Células dendríticas, preparadas como se describe en el Ejemplo 2, se lavan tres veces en dPBS, se resuspenden en $5-10 \times 10^6$ células/ml en medio completo y a continuación se coincuban con péptidos de antígenos asociados a tumores (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por antígeno, reconstituidos en DMSO al 10%). Las células dendríticas se incuban con los péptidos a $37^\circ/\text{CO}_2$ al 5% durante 16-20 horas en un rotor de tejidos para facilitar la interacción.

Después de la producción, cada preparación de DC se prueba con respecto a la viabilidad y el crecimiento microbiano y se somete a una prueba de calidad adicional antes de congelar. Se producirá un certificado de análisis para cada lote (un certificado de análisis para cada paciente). A continuación, la preparación de DC se congela como sigue: las DC se resuspenden en criotubos a diversas concentraciones (1×10^7 células por ml en medio de congelación autólogo (10% de DMSO y 90% de suero autólogo), a continuación se transfieren inmediatamente a criotubos de 2 ml (viales criotubulares, Nunc, Brand Products, Roskilde, Dinamarca), se congelan lentamente hasta -80°C al usar un recipiente de criocongelación (recipiente de congelación Nalgene cryo 1°C , velocidad en enfriamiento $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ (Fisher Scientific, CA)) y finalmente se transfieren a la fase gaseosa de nitrógeno líquido hasta el uso.

Los tratamientos de estudio se etiquetarán de tal modo que se identifique claramente la identidad del paciente. Es imperativo que solo el tratamiento de estudio del propio paciente (autólogo) se administre al mismo paciente individual. Por estas razones, la muestra de sangre se obtiene y se maneja según un protocolo estricto para asegurar la calidad óptima de la muestra y un tiempo de transporte mínimo hasta y desde las instalaciones de procesamiento, así como para asegurar la identificación única de la muestra en todos los momentos incluyendo la inyección nuevamente al paciente.

Ejemplo 4. Vacuna Ejemplar 1

La Vacuna Ejemplar 1 es una vacuna autóloga que consiste en las DCs del propio paciente impulsadas con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de al menos siete de los péptidos sintéticos listados en la Tabla 4 procedentes de los siguientes antígenos tumorales: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, Her2/neu, receptor $\alpha 2$ de interleucina-13, MAGE-A1 y EphA2. Se producirá para cada sujeto una Vacuna Ejemplar 1 específica del sujeto.

Tabla 4. Péptidos de Antígenos Tumorales

Antígeno	Epítipo del HLA-A2	Antígeno	Epítipo del HLA-A2
mesotelina	SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17)	EphA2	TLADFDPRV (SEQ ID NO:66)
NY-ESO-1	SLLMWITQC (SEQ ID NO:26)	HER-2	VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40)
MAGE-1	KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55)	IL-13R α2	WLPFGFILI (SEQ ID NO:49)
FBP	EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28)		

5 La Vacuna Ejemplar 1 se prepara y se suministra como una solución para inyección intradérmica de vacunas. El volumen de la Vacuna Ejemplar 1 es 1 ml por vial; el volumen administrado al paciente es 1 ml. La concentración de células dendríticas impulsadas en la Vacuna Ejemplar 1 es $1,1 \times 10^7$ células/ml. La vacuna contiene los siguientes excipientes: 31,25% de Plasmalyte-A; 31,25% de dextrosa (5%)/0,45 de NaCl; 7,5% de DMSO; 1% de dextrano 40; y 5% de albúmina sérica humana. Las vacunas se almacenan en un recipiente de almacenamiento para nitrógeno líquido u otro de plomo climatizado capaz de mantener la temperatura a o por debajo de 130°C y con una comprobación de la temperatura adecuada hasta que se necesite para el uso. La vacuna se debe usar a menos de 10 una hora de la descongelación.

Se entiende que la Vacuna Ejemplar 1 se puede administrar con otros epítipos del HLA-A2 de los siete antígenos tumorales distintos a los listados en la Tabla 4. Además, también se pueden administrar epítipos del MHC clase II en combinación con la Vacuna Ejemplar 1.

15 Ejemplo 5. Preparación de la vacuna de estudio

La preparación no debe empezar hasta que se confirme que el paciente está en el centro de estudio y listo para recibir el tratamiento de estudio. Al confirmar, una sola vacuna de estudio (criovial de 2 ml) correspondiente a las células autólogas del paciente se descongela en un baño de agua estéril a 37°C. La vacuna de estudio se carga en una jeringa con tuberculina (aguja 27 g) y se usa a menos de una hora de la descongelación.

20 Ejemplo 6. Protocolo para administrar la vacuna

Todos los pacientes reciben ciclofosfamida (intravenosamente 200 mg/kg) cada 3 semanas, un día antes de cada vacunación por procedimientos institucionales.

Vacunación de inducción (Vacunas 1 a 5):

25 Los pacientes elegibles recibirán una inyección intradérmica de su vacuna específica para el paciente (Vacuna Ejemplar 1) una vez cada 3 semanas a lo largo de 12 semanas durante la Fase de inducción de la vacuna. La vacunación se da los días 1, 20, 41, 62 y 83.

Vacunación de mantenimiento (Vacuna 6 y superiores):

30 El sujeto se puede someter a vacunaciones de mantenimiento después de la valoración de fin del estudio (EOS). Durante la fase de vacunación de mantenimiento los sujetos reciben vacunaciones mensuales (cada 4 semanas) hasta el agotamiento de la vacuna o una confirmación de enfermedad progresiva (PD), lo que ocurra en primer lugar.

Administración

Las vacunas se administrarán como inyecciones intradérmicas en la región inguinal. Después de la administración de la vacuna, el paciente es observado durante al menos 60 minutos con respecto a reacciones potenciales. Estas reacciones se evalúan y registran como episodios adversos (AEs), según se apropiado.

35 Ejemplo 7. Prueba inmunológica

La respuesta antitumoral celular del paciente se evalúa mediante un ensayo con tetrámeros y un ensayo de manchas de inmuoabsorción con enzimas ligadas (ELISPOT).

40 El ensayo con tetrámeros se usará para evaluar las respuestas a todos los péptidos procedentes de: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, Her2/neu, IL13Ra2, MAGE-A1 y EphA2.

La primera muestra se recoge del producto de aféresis. Para las muestras de seguimiento (es decir, (cada 3 semanas antes de cada infusión de ciclofosfamida y en EOS), se recogen aproximadamente 80 ml muestras de sangre por momento y se transportan a un laboratorio central para el análisis. El análisis con tetrámeros, la estimulación *in vitro* y ELISPOT se realizaron con tetrámeros y péptidos del HLA apropiados para el tipo de HLA específico del paciente.

Ejemplo 8. Análisis de expresión de antígenos tumorales en muestras de tumor ovárico humano.

Objetivo: Utilizar análisis basado en citometría de flujo para obtener el perfil antigénico de células de cáncer ovárico humano primario para determinar si la Vacuna Ejemplar 1 incluye posibles proteínas adecuadas para la orientación inmunoterapéutica.

Materiales y métodos: Los pacientes se incluyeron en un protocolo aprobado por un comité de revisión institucional y firmaron una autorización antes de la recogida del tejido. Para la digestión enzimática de tumores sólidos, la muestra tumoral se cortó en cubitos en RPMI-1640, se lavó y se centrifugó a 800 rpm durante 5 min a 15-22°C, se resuspendió en tampón de digestión enzimática (0,2 mg/ml de colagenasa y 30 unidades/ml de ADNasa en RPMI-1640) antes de la rotación durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron y se crioconservaron como suspensiones de células individuales para uso posterior. Algunas muestras de tumor sólido se disociaron físicamente usando un dispositivo Bellco Collector. Para la obtención del perfil antigénico, siete muestras tumorales se digirieron enzimáticamente durante la noche y dos se disociaron físicamente. El día del estudio, las células se descongelaron y se tiñeron con los anticuerpos indicados para el análisis de proteínas extracelulares o se fijaron y se permeabilizaron para la tinción de antígenos intracelulares. Se realizó un análisis fenotípico multiparamétrico sobre células tumorales viables seleccionadas (EpCAM⁺, 7AAD negativo, CD45 negativo) usando anticuerpos específicos para la siguientes proteínas: receptor de folato alfa (FR) (también conocido como proteína fijadora de folato (FBP)), mesotelina, HER2/neu, IL-13R α 2, EphA2, NY-ESO-1 y MAGE-1 y se comparó con la tinción alcanzada usando un anticuerpo isotópico. Se usaron líneas celulares tumorales establecidas positivas a antígeno como control positivo siempre que fuera posible. La adquisición se realizó en un citómetro de flujo BD Canto II y el análisis se realizó usando software Flo-Jo.

Los anticuerpos usados para el análisis inmunofluorescente citométrico de flujo eran como sigue: los anticuerpos contra CD45, EpCAM, HER2 e IL-13R α 2 humanos se adquirieron de Biolegend (San Diego, CA); los anticuerpos contra FR/FBP y mesotelina eran de R&D Systems (Minneapolis, MN); el anticuerpo contra EphA2 era de Millipore (Billerica, MA); el anticuerpo contra NY-ESO-1 era de Invitrogen (Camarillo, CA); y el anticuerpo contra MAGE-1 era de Epitomics (Burlingame, CA). La solución de tinción de viabilidad 7-AAD se adquirió de BD Bioscience.

El análisis inmunofluorescente citométrico de flujo se realizó como sigue: las células se resuspendieron en tampón de FACS que consistía en PBS con 2% de FBS (Gemini Bioproducts). 10⁶ células en 100 μ l se tiñeron directamente con mAbs conjugados a fluorocromos a 4°C durante 40 min en la oscuridad. Para anticuerpos no conjugados, segundos anticuerpos conjugados a fluorocromos se tiñeron durante otros 20 minutos. Para la selección de la viabilidad, las células se tiñeron brevemente con solución 7-AAD y se analizaron con respecto a la exclusión de células no viables usando un FACS Cantor II (BD Biosciences). La tinción intracelular estaba de acuerdo con el protocolo de eBiosciences (San Diego, CA).

Resultados: En el estudio de nueve cánceres ováricos humanos primarios, 38,6% \pm 13,4% de todas las células viables procedentes de suspensiones de células de tumores sólidos eran células tumorales EpCAM⁺, mientras que 28,6% \pm 15,3% eran leucocitos CD45⁺ (Tabla 5). Los leucocitos estaban comprendidos por monocitos CD14⁺, linfocitos T y bajos números de linfocitos B, así como otras células (distintas a T, B, monocitos) no definidas dentro del cóctel de anticuerpos aplicado.

Tabla 5

T.1 Composición de células procedentes de ovárico sólido primario

Nota: Esta tabla contiene muestras preparadas mediante digestión enzimática de un tumor sólido solamente excepto cuando se apunta (*)

Muestra	Fecha de recogida	% viables del total			% de células viables			% de leucocitos viables			
		total	tumor	leuco	CD45+	EpCam+	CD45-	células T	células B	mono	otras
1796	3/21/2011	20.6	19.6	55.1	10.2	39.5	89.8	4.7	1.6	60.1	33.6
1797	3/22/2011	56.5	51.3	72.0	34.5	29.1	65.5	24.4	7.6	36.0	31.9
1807	5/17/2011	52.1	68.0	78.9	24.3	49.3	75.7	9.3	0.5	44.8	45.4
1836	8/24/2011	53.9	57.2	46.6	25.8	30.7	74.2	5.2	0.5	67.6	26.8
1884	4/18/2012	71.6	85.1	43.1	20.1	32.9	79.9	30.8	9.7	18.4	41.1
1913	9/24/2012	56.2	86.4	85.2	23.5	23.7	76.5	29.9	ND	27.9	24.9
1922*	4/22/2013	74.5	67.3	81.5	51.3	35.6	48.7	62.4	ND	14.7	12.8
1934	12/12/2012	85.1	86.1	88.5	13.7	68.4	86.3	47.5	ND	20.3	21.5
1938*	4/22/2013	47.1	30.5	79.5	54.0	38.0	46.0	23.8	ND	61.5	6.7
	media	57.5	61.3	70.0	28.6	38.6	71.4	26.4	4.0	39.0	27.2
	STDEV	18.59	24.23	17.22	15.33	13.32	15.33	19.35	4.35	20.31	12.52
	SEM	6.20	8.08	5.74	5.11	4.44	5.11	6.45	1.45	6.77	4.17

5

Entre las células tumorales viables, se detectó una variedad de antígenos de la superficie celular o intracelulares mediante citometría de flujo. La expresión de los antígenos se muestra en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Expresión de antígenos tumorales en muestras de tumor ovárico humano (%)

Tumor	FR/FBP	Mesotelina	Her-2	IL-13R α 2	EphA2	NY-ESO-1	MAGE1
1796TuTcE	99,20	4,72	72,30	35,60	17,60	19,20	7,39
1797TuTcE	99,50	4,29	99,80	24,60	4,57	60,80	0,59
1807TuTcE	99,90	6,53	89,90	34,00	9,76	44,50	0,85
1836 TuTcE	96,90	61,50	93,90	34,30	42,30	27,30	0,27
1884 TuTcE	98,20	4,50	42,00	18,60	12,90	11,50	14,50
1913 TuTcE	98,40	28,30	85,60	35,60	12,40	34,30	5,79
1922 Bellco	99,00	20,40	82,50	20,60	28,30	38,40	3,96
1934 TuTcE	88,30	2,58	12,30	3,42	8,27	5,65	29,10
1938Bellco	94,20	14,50	96,70	62,40	22,60	36,60	24,30
Media	97,07	16,37	75,00	29,90	17,63	30,92	9,64
SD	3,71	17,98	27,61	15,28	11,14	16,13	10,09
SEM	1,24	5,99	9,20	5,09	3,71	5,38	3,36

10

Entre las nueve muestras probadas, altas frecuencias (>70%) de células EpCAM⁺ eran FR/FBP⁺ y HER2⁺ (Tabla 6). Mesotelina, IL-13R α 2, NY-ESO-1, EphA2 y MAGE-1 se expresaban a frecuencias menores que FR y HER2. La expresión de MAGE-1 y mesotelina era muy variable entre muestras probadas, no mostrando algunas células niveles detectables de expresión.

15

La Tabla 7 proporciona los valores para la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los anticuerpos para antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 en comparación con su control de anticuerpo isotópico equivalente (Iso). Los antígenos que se expresaban a la mayor frecuencia de células tumorales EpCAM⁺, tales como FR/FBP y HER2, también se expresaban al nivel más alto, según se muestra mediante análisis de MFI.

20

Tabla 7
Expresión de antígenos tumorales en muestras de tumor ovárico humano (MFI)

Tumor	FR/FBP (Iso)	Mesotelina (Iso)	Her-2 (Iso)	IL-13R α 2 (Iso)	EphA2 (Iso)	NY-ESO-1 (Iso)	MAGE1 (Iso)
1796TuTcE	1982 (43,8)	178 (117)	300 (43,8)	142 (43,8)	96,1 (43,8)	262 (94,3)	189 (54,5)
1797TuTcE	7788 (30,7)	99,6 (76,2)	5340 (30,7)	118 (30,7)	65,7 (30,7)	344 (77,2)	165 (41,4)
1807TuTcE	4897 (55,3)	104 (71,3)	467 (55,3)	187 (55,3)	104 (55,3)	295 (86,8)	194 (55,8)
1836 TuTcE	13400 (50,5)	861 (149)	815 (50,5)	159 (50,5)	153 (50,5)	289 (80,5)	153 (48,9)
1884 TuTcE	1775 (49)	159 (133)	156 (49)	99,2 (49)	88,5 (49)	124 (68,6)	330 (48,8)
1913 TuTcE	2767 (44,6)	326 (150)	473 (44,6)	148 (44,6)	93,6 (44,6)	290 (140)	201 (57,3)
1922 Bellco	1603 (24,1)	300 (150)	338 (24,1)	78,6 (24,1)	102 (24,1)	333 (92)	261 (47,3)
1934 TuTcE	810 (58)	164 (129)	139 (58)	99,6 (58)	114 (58)	120 (76,2)	399 (52,6)
1938Bellco	588 (37)	151 (122)	687 (37)	207 (37)	91,5 (37)	675 (166)	516 (192)
media	3956,67 (43,67)	260,29 (121,28)	968,33 (43,67)	137,60 (43,67)	100,93 (43,67)	303,56 (97,96)	267,56 (66,51)
SD	4207,19 (11,25)	238,55 (29,27)	1654,63 (11,25)	42,76 (11,25)	23,60 (11,25)	161,48 (32,87)	123,79 (47,31)
SEM	1402,40 (3,75)	79,52 (9,76)	551,54 (3,75)	14,25 (3,75)	7,87 (3,75)	53,83 (10,96)	41,26 (15,77)

- 5 Conclusiones: Los resultados anteriores sugieren una oportunidad para la terapia basada inmunitariamente del cáncer ovárico. En particular, los niveles de expresión de FR/FBP y HER2 sugieren que estas moléculas pueden permitir una terapia casi universal entre pacientes con cáncer ovárico. FR es un muy posible antígeno para la orientación basada en su expresión casi ubicua entre células de cáncer ovárico dentro de un tumor y entre diferentes pacientes. Mesotelina, IL-13R α 2, NY-ESO-1, MAGE-1 y EphA2 también representan dianas razonables para la terapia basada inmunitariamente del cáncer ovárico.

10

En resumen, estos datos proporcionar una base lógica para orientarse a antígenos incluyendo FR/FBP, HER2, mesotelina, IL-13R α , NY-ESO-1, MAGE-1 y EphA2 para mujeres con cáncer ovárico.

- 15 Ejemplo 9. Análisis cuantitativo basado en PCR en tiempo real de la expresión génica en células de cáncer ovárico humano, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico

Objetivo: Comparar la expresión génica de los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 en células de cáncer ovárico humano, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico usando PCR en tiempo real (RT-PCR).

Materiales y métodos:

1. Antígenos: Her-2, IL-13R α 2, mesotelina, EphA2, FOLR1, MAGE-A1, NY-ESO-1

- 20 2. Sondas génicas de PCR y reactivos:

ensayo de expresión génica de HER2, Life Technologies, Parte nº Hs01001580_m1;

ensayo de expresión génica de MAGE-A1, Life Technologies, Parte nº Hs00607097_m1;

ensayo de expresión génica de IL-13R α 2, Life Technologies, Parte nº Hs00152924_m1;

ensayo de expresión génica de EphA2, Life Technologies, Parte nº Hs00171656_m1;

ES 2 662 333 T3

- ensayo de expresión génica de FOLR1, Life Technologies, Parte nº Hs01124179_g1;
- ensayo de expresión génica de NY-ESO-1, Life Technologies, Parte nº Hs00265824_m1;
- ensayo de expresión génica de mesotelina, Life Technologies, Parte nº Hs00245879_m1;
- ensayo de expresión génica de GAPDH, Life Technologies, Parte nº Hs02758991_g1;
- 5 mezcla madre de expresión génica de TaqMan; Life Technologies, parte nº 4369016;
- Aislamiento de ARN Rneasy Mini Kit (nº cat 74104, Qiagen); y
- Estuche de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad con inhibidor de ARNasa (nº cat 4374966, Life Technologies)
- 10 3. Líneas celulares: células de cáncer ovárico humano (AC) 882AC y 1031AC, células madre cancerosas (CSC) 882CSC y 1031 CSC, células hijas de cáncer ovárico (ADC) 882 ADC y 1031 ADC
4. Cultivo de células de cáncer ovárico humano (AC)
- Se cultivaron líneas celulares de cáncer ovárico 882AC y 1031AC en medio 5A de McCoy (Mediatech, Herndon, VA) provisto de 10% de suero bovino fetal (Omega Scientific, Inc.) y penicilina-estreptomicina-glutamina (100X) (Invitrogen). Todas las células se cultivaron en CO₂ al 5% y a 37°C en una incubadora celular (Forma Scientific, Inc.).
- 15 5. Cultivo de células madre de cáncer ovárico humano (CSC)
- Células de cáncer ovárico humano (882AC,1031AC) se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio DMEM/F12 (Invitrogen), que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) como medio de crecimiento y se sembraron a una densidad de 1x10⁶ células por matraz de cultivo celular de 75 cm² (Corning Inc.). Las células se ligaron y crecieron como una monocapa en matraces. A continuación, las monocapas se cambiaron a medio DMEM/F12 complementado con B-27 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico y 20 ng/ml de factor de crecimiento derivado del endotelio (Peprotech, Rocky Hill, NJ).
- 20 6. Cultivo de células hijas de cáncer ovárico humano (ADC)
- Células madre de cáncer ovárico humano (882CSC,1031CSC) se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio DMEM/F12 (Invitrogen), que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) como medio de crecimiento y se sembraron a una densidad de 1x10⁶ células por matraz de cultivo celular de 75 cm² (Corning Inc.). Las células se ligaron y crecieron como una monocapa en matraces en aproximadamente 2-3 semanas.
- 25 7. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y qPCR
- Se extrajo el ARN total de las líneas celulares 882AC, 882CSC, 882ADC y 1031AC, 1031CSC y 1031ADC usando Rneasy Mini Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. El ADN complementario se sintetizó usando transcripción inversa de ADNc High-Capacity® (nº cat. 4374966), Life Technologies, CA) siguiendo el protocolo del fabricante.
- 30 Las reacciones PCR en tiempo real se realizaron según las instrucciones del fabricante. La reacción consistía en 8,0 µl de ADNc (42 ng), 10 µl de TaqMan PCR Master Mix, 1,0 µl de agua libre de nucleasas y las siguientes sondas de PCR TaqMan de 1,0 µl (20x) para siete genes: Hs01001580_m1(HER2), Hs00607097_m1(MAGE-A1), Hs00152924_m1(IL-13Rα2), Hs00171656_m1(EphA2), Hs01124179_g1(FOLR1), Hs00265824_m1(NY-ESO-1), Hs00245879_m1 (mesotelina) así como un control interno Hs02758991_g1 (GAPDH).
- 35 Las reacciones se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real Bio-Rad iQ5 con los siguientes ciclos térmicos: un ciclo de 50°C durante 2 minutos y 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos u una renaturalización/extensión a 56°C durante 60 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos y una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. Se determinó una curva de fusión al final de cada reacción para verificar la especificidad de la reacción PCR. El análisis Ct Data se realizó usando el software Bio-Rad suministrado con el sistema IQ5 Cycler.
- 40

8. Análisis de datos usando el método $[2^{-\Delta(\Delta Ct)}]$

Las cantidades relativas para cada gen de antígeno se calcularon usando el método $[2^{-\Delta(\Delta Ct)}]$ comparativo. El valor Ct representa el número de ciclo al que la fluorescencia pasa el umbral definido. Los valores Delta Ct (delta $Ct = Ct_{\text{gen de prueba}} - Ct_{\text{media de genes de control}}$) se usaron para comparar la diferencia de expresión génica. Los valores Ct de los niveles de expresión de genes de antígenos se normalizaron hasta GAPDH y el método de Ct $[2^{-\Delta(\Delta Ct)}]$ comparativo se usó para evaluar la expresión génica.

Resultados: La expresión génica relativa de HER2 en 882AC (Fig. 1A), 882CSC (Fig. 1B) y 882ADC (Fig. 1C) era 0,4414, 1,16 y 1,67, respectivamente, sugiriendo que el gen HER2 se expresaba a un nivel alto en células madre de cáncer ovárico (CSC) y células hijas de cáncer ovárico (ADC). La expresión génica relativa de EphA2 en 882AC (Fig. 1A), 882CSC (Fig. 1B) y 882ADC (Fig. 1C) era 1,51, 1,69 y 4,06, respectivamente, sugiriendo que la expresión del gen EphA2 se expresaba a un nivel alto en células de cáncer ovárico (AC), células madre cancerosas (CSC) y células hijas de cáncer ovárico (ADC). La expresión génica relativa de mesotelina era baja en 882AC, 882CSC y 882ADC. La expresión génica relativa de IL13R α 2 era baja en 882CSC y 882ADC y es indetectable en 882AC. La expresión génica de FOLR1 era baja en células de control e indetectable en 882AC, 882CSC y 882ADC. Finalmente, la expresión génica de NY-ESO-1 era indetectable en las células de control, así como en 882AC, 882CSC y 882ADC.

Posteriormente, el nivel de expresión de los genes anteriores se comparaba entre 882AC, 882CSC y 882ADC. Según se muestra en la Figura 2, la expresión génica relativa de HER2 y EphA2 en células madre de cáncer ovárico (882CSC) era superior que en células de cáncer ovárico (882AC), mientras que la expresión génica relativa de mesotelina y MAGE-A1 en 882CSC era inferior que en 882AC. FOLR1 y NY-ESO-1 eran indetectables en 882AC, 882CSC y 882ADC. La expresión génica relativa de IL13R α 2 era baja tanto en 882CSC como en 882ADC y era indetectable en 882AC.

La expresión génica relativa de HER2, EphA2, mesotelina y MAGE-A1 era superior en células hijas (882ADC) que en una célula madre cancerosa (882CSC) y la expresión génica relativa de IL13R α 2 en 882ADC era inferior que en 882 CSC. FOLR1 y NY-ESO-1 eran indetectables en 882AC, 882CSC y 882ADC.

La expresión génica de los susodichos antígenos se evaluó en otras células de cáncer ovárico humano (1031AC), células madre cancerosas (1031CSC) y células hijas de cáncer ovárico (1031ADC). Según se muestra en la Figura 3, la expresión génica relativa de HER2 en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC era 0,6491, 0,6099 y 0,6799, respectivamente, sugiriendo que la expresión génica relativa de HER2 era baja. La expresión génica relativa de EphA2 en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC era 1,46, 2,265 y 2,93, respectivamente, sugiriendo que EphA2 tiene una expresión génica incrementada en una célula de cáncer ovárico (AC), una célula madre cancerosa (CSC) y una célula hija de cáncer ovárico (ADC), en comparación con una célula epitelial ovárica humana (HoEpic). La expresión génica relativa de MAGE-A1 en 1031AC y 1031ADC es 1,38 y 1,34, respectivamente, lo que es un poco superior a la expresión en la célula de control. La expresión génica relativa de mesotelina era inferior en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC y la expresión génica relativa de FOLR1, IL-13R α 2 era indetectable en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC. La expresión génica de NY-ESO-1 era indetectable tanto en la célula de control como en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC.

La expresión génica de los genes apuntados anteriormente se comparó entre 1031AC, 1031CSC y 1031ADC. Según se muestra en la Figura 4, la expresión génica de EphA2 en 1031CSC con relación a 1031AC es 1,54, sugiriendo que la expresión génica en 1031CSC es superior que en 1031AC. La expresión génica de HER2, mesotelina y MAGE-A1 en 1031CSC está a un nivel inferior que en 1031AC. Los niveles de expresión de HER2, EphA2, mesotelina y MAGEA1 en 1031ADC son superiores que en 1031CSC. La expresión génica de IL-13R α 2, FOLR1 y NY-ESO-1 es indetectable en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC.

Conclusiones:

1. Basándose en el valor Ct de q-PCR, HER2, EphA2, mesotelina y MAGE-AI se expresaron en células de cáncer ovárico (882AC, 1031AC), células madre de cáncer ovárico (882CSC, 1031CSC) y células hijas de cáncer ovárico (882ADC, 1031ADC). IL13R α 2 también se expresó en 882CSC y 882ADC, pero era indetectable bajo las condiciones experimentales usadas en la presente en 882AC, 1031AC, 1031CSC y 1031ADC. FOLR1 y NY-ESO-1 eran indetectables bajo las condiciones experimentales en células de cáncer ovárico (882AC, 1031AC), células madre cancerosas (882CSC, 1031CSC) o células hijas (882ADC, 1031ADC).

2. El nivel de expresión génica de HER2 y EphA2 en 882CSC era 1,122 y 2,62 veces superior en comparación con 882AC, mientras que la mesotelina y MAGE-A1 se expresaban en 0,5913 y 0,0174 en comparación con 882AC. La expresión génica relativa de HER2, EphA2, mesotelina y MAGEA1 en 882ADC era 1,45, 2,39, 10,85 y 15,45 veces superior en comparación con la expresión en 882CSC. La expresión génica de IL-13R α 2 en 882CSC era superior que en 882ADC.

3. El nivel de expresión génica de EphA2 era 1,54 veces superior en 1031 CSC en comparación con 1031AC, mientras que el nivel de expresión génica de HER2, mesotelina y MAGE-A1 en 1031CSC era 0,94, 0,94 y 0,39 en comparación con 1031AC. El nivel de expresión génica de HER2, EphA2, mesotelina y MAGE-A1 en 1031ADC era 1,11, 1,3, 1,35 y 1,82 veces superior en 1031ADC en comparación con 1031CSC.

5 4. La expresión génica de IL-13R α 2, FOLR1 y NY-ESO-1 era indetectable en 1031AC, 1031CSC y 1031ADC bajo las condiciones de reacción usada en la presente, sugiriendo que estos genes se expresaban a niveles inferiores en estas células.

Tomados conjuntamente, estos datos identifican distintivos moleculares de expresión génica únicos para los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 y proporcionan un marco para el diseño racional de una diana inmunoterapéutica para células de cáncer ovárico humano, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico.

10 Ejemplo 10. Análisis de la expresión de antígenos tumorales en células cancerosas de tumor ovárico humano, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico basándose en un ensayo de citometría de flujo

15 Objetivo: Utilizar análisis basado en citometría de flujo de perfiles de expresión de antígenos ICT 140 en células de cáncer ovárico humano primario, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico para la orientación inmunoterapéutica potencial.

Materiales y métodos

1. Reactivos

20 DMEM/F12: Invitrogen, N° cat 11330-057 (Lote n° 1184632, Lote n°1109388, Lote n° 891768);

5A de McCoy, 1X: Mediatech, Inc, n° cat 10-050-CV (Lote n° 10050090, Lote n° 10050088);

Complemento B-27 (50x): Invitrogen, n° cat12587-010 (Lote n°1192265, Lote n° 1153924, Lote n°1079052);

Suero bovino fetal: Omega Scientific, Inc. N° cat FB-11 (Lote n° 170108, Lote n°110300);

Penicilina-estreptomicina-glutamina: Invitrogen, n° cat 10378-016 (Lote n°1030595);

25 FGF humano-básico: PeproTech, n° cat100-18B (Lote n° 041208-1, Lote n°051108);

EGF humano: n° cat AF-100-15 (Lote n°0212AFC05, Lote n°0711AFC05, Lote n°0211AFC05-1, Lote n°0911AFC05-1);

BD Cytotfix/cytoperm, estuche de fijación y permeabilización. N° cat 51-6896KC (Lote n° 81617); y

30 Los anticuerpos usados para el ensayo de citometría de flujo eran como sigue: los anticuerpos marcados con PE contra EphA2 humano, FOLR1, mesotelina se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN); los anticuerpos contra NY-ESO-1 humano y MAGE-A1 eran de Invitrogen (Camarillo, CA); los anticuerpos marcados con PE contra HER2 y IL-13R α 2 humanos eran de Biolegend (San Diego, CA); los anticuerpos marcados con PE contra IL-13R α 2 humano eran de Abcam (Cambridge, MA); y los anticuerpos contra mesotelina humana eran de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX).

35 2. Líneas celulares

Células de cáncer ovárico humano primario (AC): 882AC, 1031AC, 1078AC, 1082AC, 1077AC, 1105AC y 1064AC;

Células madre de cáncer ovárico humano (CSC): 882CSC, 1031CSC, 1078CSC y 1082CSC;

Células hijas de cáncer ovárico humano (ADC): 882ADC, 1031ADC y 1078ADC, y

Célula de cáncer ovárico humano SKOV3 (American Type Culture Collection).

40

3. Cultivo de células de cáncer ovárico humano (AC)

5 Líneas de células de cáncer ovárico humano (AC) (882AC, 1031AC, 1078AC, 1082AC, 1077AC, 1105AC, 1064AC y SKOV3) se cultivaron en medio 5A de McCoy (Mediatech, Herndon, VA) complementado con 10% de suero bovino fetal (Omega Scientific, Inc.) y penicilina-estreptomina-glutamina (100X) (Invitrogen). Todas las células se cultivaron en CO₂ al 5% y a 37°C en una incubadora celular (Forma Scientific, Inc).

4. Cultivo de células madre de cáncer ovárico humano (CSC)

10 Células de cáncer ovárico humano (AC) (882AC, 1031AC, 1078AC, 1082AC) se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio DMEM/F12 (Invitrogen), que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) como medio de crecimiento y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células por matraz de cultivo celular de 75 cm² (Corning Inc.). Las células se ligaron y crecieron como una monocapa en los matraces. A continuación, estas células de la monocapa se cambiaron a medio DMEM/F12 complementado con B-27 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 20 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico y 20 ng/ml de factor de crecimiento derivado del endotelio (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

5. Cultivo de células hijas de cáncer ovárico humano (ADC)

15 Células madre de cáncer ovárico humano (ADC) (882ADC, 1031ADC, 1078ADC) se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco, medio DMEM/F12 (Invitrogen), que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS) como medio de crecimiento y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células por matraz de cultivo celular de 75 cm² (Corning Inc.). Las células se ligaron y crecieron como una monocapa en los matraces en aproximadamente 2-3 semanas.

20 6. Análisis por citometría de flujo

25 Las células de cáncer ovárico humano, las células madre cancerosas y las células hijas de cáncer ovárico ($0,5 \times 10^6$ o 1×10^6) se resuspendieron en FBS al 1%-PBS y se tiñeron con los siguientes anticuerpos marcados con PE específicos: anti-HER2, anti-IL-13R α 2, anti-mesotelina, anti-EphA2 y anti-FOLR1. Para la tinción de MAGE-A1, las células se pusieron en contacto en primer lugar con el anticuerpo monoclonal específico de MAGE-A1 y a continuación se marcaron con un 2º mAb conjugado a PE.

30 Para la tinción de antígenos intracelulares (NY-ESO-1), las células se permeabilizaron usando el estuche Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) y se tiñeron con un 2º anticuerpo conjugado a PE. El análisis por citometría de flujo se realizó usando un citómetro de flujo CyAn™ (Beckman Coulter) y los datos se analizaron usando el software Summit (Dako, Carpinteria, CA).

35 Resultados: En este estudio, se probó la expresión de los siete antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 en siete células de cáncer ovárico humano primario, cuatro células madre de cáncer ovárico humano y tres células hijas de cáncer ovárico humano usando un ensayo de FACS. La expresión de los antígenos tumorales en las muestras de tumor ovárico humano (en %) se proporcionan en las Tablas 8-10.

Tabla 8
Expresión de antígenos tumorales en muestras de tumor ovárico humano (%)

ID tumor	FOLR1	Mesotelina	HER2	IL13Rα2	EpHA2	NYESO1	MAGE1
882-CSC	12,36	2,24	84,33	15,67	75,59	0,1	0,11
882-AC	7,11	1,57	95,75	18,39	96,73	0,57	0,91
882-ADC	4,15	2,27	97,78	5,4	98,84	0,16	0,13
1031-CSC	13,01	2,12	49,93	9,67	84,61		
1031-AC	3,52	1,36	97,57	5,03	96,78	0,59	15,28
1031-ADC	4,77	2,49	98,59	5,06	95,45	69,98	
1078-CSC	56,83	2,58	83,94	31,47	50,24		
1078-AC	4,26	1,55	99,16	58,81	98,99		
1078-ADC	8,31	2,89	96,15	93,79	98,85		
1085AC	3,17	1,65	86,87	31,55	84,13	16,4	53,5
Media	11,749	2,072	89,007	27,484	88,021	14,63	13,99
SD	16,233	0,51437	14,98453	28,7606	15,5317	27,85	23,01
SEM	5,13	0,163	4,73	9,09	4,911	11,37	10,29

5 La Tabla 8 es un resumen de los datos de expresión para los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 en cuatro células de cáncer ovárico humano primario, tres células madre de cáncer ovárico humano y tres células hijas ováricas humanas. Los resultados indican que la expresión antigénica media de HER2, EphA2, IL13Rα2, NY-ESO-1, MAGE-A1, FOLR1 y mesotelina era 89,01%, 88,02%, 27,48%, 14,63%, 13,99%, 11,75% y 2,07%, respectivamente. La mesotelina se expresaba a bajos niveles en células de cáncer ovárico, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico. En contraste, HER2 y EphA2 se expresaban a altos niveles en células de cáncer ovárico, células madre cancerosas y células hijas de cáncer ovárico.

15 La Tabla 9 proporciona los valores de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los anticuerpos para algunos de los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 en comparación con su control de anticuerpo isotópico equivalente (Iso). Los resultados de MFI indicaban que las MFI de los anticuerpos isotópicos son inferiores que las MFI de anticuerpos antigénicos.

Tabla 9
Expresión de antígenos tumorales en muestras de tumor ovárico humano (MFI)

ID tumor	FR	FR (Iso)	Meso	Meso (Iso)	HER2	HER2 (Iso)	IL13Rα2	IL13Rα2 (Iso)	EpHA2	EpHA2 (Iso)
882-CSC	15,35	6,48	10,6	6,48	21,86	6,48	19,13	6,48	41,4	18,55
882-AC	17,4	10,28	8,33	10,28	22,69	10,28	18,9	10,28	137,9	28,94
882-ADC	53,65	26,03	102,4	12,85	89,58	16,96	32,75	14,78	314,05	22,88
1031-CSC	8,47	47,21	24,66	47,21	6,5	47,21	10,59	47,21	152,6	47,21
1031-AC	37,07	6,63	42,83	7,35	48,02	6,75	16,3	6,75	113,75	6,75
1031-ADC	9,92	2,86	28,75	2,86	29,52	3	10,85	4,41	91,6	4,41
1078-CSC	142,9	29,82	17,73	29,82	81,21	29,82	95,99	29,82	64,49	29,82
1078-AC	35,87	19,97	25,42	19,97	48,15	19,97	42,58	19,97	251,6	94,52
1078-ADC	31,22	9,05	15,49	9,05	50,9	9,05	53,6	9,05	49,2	9,05
Skov3	106,3	58,12	79,95	58,12	500	58,12	121,8	58,12	113,5	13,54
Media	45,81	21,645	35,61	20,399	89,843	20,764	42,249	20,687	133,01	27,567
SD	44,65	18,765	31,34	18,828	146,45	18,723	38,263	18,643	88,081	26,849
SEM	14,11	5,93	9,91	5,95	46,17	5,91	12	5,89	27,85	8,488

20

Como se muestra en la Tabla 10, HER2, IL13R α 2 y EpHA2 eran altamente expresados en 1082AC, 1082CSC, 1077AC, 1105AC y 1064AC, siendo sus niveles de expresión medios en estas líneas celulares 82,03%, 44,97% y 48,86%, respectivamente. HER2, EphA2 y FOLR1 también se expresaban al nivel superior en la célula de cáncer ovárico humano SKOV3. La mesotelina, NY-ESO-1 y MAGE-A1 se expresaban a niveles inferiores.

5

TABLA 10
Expresión de antígenos tumorales en muestras de tumor ovárico humano (%)

ID tumor	FR	Meso	HER2	IL13R α 2	EpHA2	NYESO1	MAGE1
1082-CSC		3,96	87,64	53,15			
1082-AC		5,22	98,25	7,25		0,66	0,17
1077-AC		1,55	83,63	88,73	14,02		
1105-AC		3,28	78,59	4,5	83,71		
1064-AC		1,27	62,05	71,22			
Media		3,056	82,032	44,97	48,86		
SD		1,659	13,306	37,853	49,28		
SEM		0,74	5,94	16,92	22,04		

ID tumor	FR	Meso	HER2	IL13R α 2	EpHA2	NYESO1	MAGE1
SKOV3	89,17	1,23	99,5	0,51	99,67		
Media	89,17	1,23	99,5	0,51	99,67		
SD	4,2	0,94	0,63	0,19	0,01		
SEM	2,98	0,54	0,36	0,11	0,009		

- 10 Conclusión: Las células de cáncer ovárico humano primario analizadas en los experimentos anteriores se aislaron de muestras de diversos pacientes. Los resultados descritos anteriormente demuestran que las células de cáncer ovárico, las células madre cancerosas y las células hijas de cáncer ovárico expresan HER2 y EphA2 a altos niveles y expresan IL13R α 2, NY-ESO-1, MAGE-A1 y FOLR1 a niveles moderados (la expresión está entre 27,49% y 11,75%). La mesotelina se expresa con un nivel de expresión inferior en estas células; sin embargo, cuando estos
- 15 datos se consideran en combinación con su nivel de expresión de ARN basado en un ensayo de qPCR, la mesotelina todavía se considera un buen candidato para la orientación a través de inmunoterapia.

Algunos de los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 eran regulados al alza en células madre de cáncer ovárico que en células de cáncer ovárico y células hijas basándose en los datos de FACS de la Tabla 8-10.

- 20 Tomados conjuntamente, los datos anteriores muestran que los antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 son buenas dianas inmunoterapéuticas para células de cáncer ovárico humano, células madre cancerosas, así como células hijas de cáncer ovárico.

Ejemplo 11. Análisis de la capacidad de unión de los péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1 con células T2

- 25 **Objetivo:** Evaluar la capacidad de unión de los péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1 y el péptido de control Mart1 con células T2.

Materiales y métodos:

1. Línea celular y péptidos

- 30 Células T2 deficientes en TAP que expresan HLA-A2 se obtuvieron de the American Type Culture Collection (ATCC) (n° cat CRL-1992, Manassas, VA) y se mantuvieron en medio Dulbecco modificado de Iscove (n° cat 31980-030, Invitrogen, Grand Island, NY) complementado con 20% de suero bovino fetal (n° cat FB-01, Omega Scientific Inc.) a 37°C con CO₂ al 5%. Todos los péptidos (Tabla 11) usados en este estudios se sintetizaron a partir de the American Peptide Company (Sunnyvale, CA). El péptido que se une a HLA-A*0201 péptido Melan A/Mart-1 (ELAGIGILTV (**SEQ ID NO:110**), n° cat 61013, Anaspec Inc, CA) se usó como un control positivo. Los péptidos del MHC, con más
- 35 de 95% de pureza, se sintetizaron usando técnicas en fase sólida automatizadas, se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase inversa y sus estructuras se verificaron mediante

espectrometría de masas. Los péptidos se obtuvieron en forma liofilizada, se disolvieron hasta una concentración final de 10 mg/ml en DMSO y se almacenaron a -20°C.

Tabla 11
Péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1

Antígeno	Epítipo peptídico del HLA-A2	Secuencia	Producto nº	Lote nº
HER2/neu	773-782	VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40)	362469	S1206012T
IL-13R α 2	345-352	WLPFGFILI (SEQ ID NO:49)	331052	1206054T
EphA2	883-891	TLADFDPRV (SEQ ID NO:66)	358414	S1206033T
FOLR1	191-199	EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28)	329542	SU11006T
NY-ESO-1	157-165	SLLMWITQC (SEQ ID NO:26)	315926	U02032T1
Mesotelina	531-539	VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17)	368371	1312092X
MAGE-A1	278-286	KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55)	348003	1312143T

2. Métodos

La afinidad de unión a péptidos del MHC de cada péptido del HLA-A2 y péptido de control Mart1 a moléculas del HLA-A*0201 se determinó usando el siguiente protocolo. La línea celular T2 (nº cat CRL-1992, ATCC, Manassas) (2×10^5) se incubó durante la noche a 37°C, CO₂ al 5% con péptido (75 µg/ml) en 100 µl de medio libre de suero AIM (nº cat 12055-091, Life Technologies) que contenía β 2-microglobulina humana (nº cat 126-11, Lee Biosolutions Inc, St Louis). Después de la incubación, las células se lavaron con PBS fría y a continuación, las moléculas de HLA-A2 superficiales se tiñeron con mAb de PE-anti-HLA-A2 humano de ratón (BD Biosciences, nº cat 558570) y PE-IgG2b de ratón, control isotipo κ (nº cat 555058, BD Biosciences, San Jose) durante 30 min a 4°C y se lavaron dos veces con PBS fría. Se determinó si estos péptidos del MHC se unían a HLA-A2 mediante la regulación al alza de moléculas del HLA-A2 sobre células T2 y se demostró al medir la intensidad de fluorescencia media (MFI) usando un citómetro de flujo CyAn (Beckman Coulter, Inc).

Resultados: En este estudio, se realizó el ensayo de unión a células T2 para validar la afinidad de unión de los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 HLA-A2 y el péptido de control MART1 a moléculas del HLA-A2. La afinidad de unión relativa de los respectivos péptidos se calculó a partir de las intensidades de fluorescencia medias (MFIs) como sigue: El índice de fluorescencia (IF) de afinidad de unión relativa de los respectivos péptidos se calculó usando la siguiente fórmula: $MFI(\text{péptido}) - MFI(\text{células no tratadas}) / MFI(\text{células no tratadas})$. Las afinidades de unión relativas >1,5 se consideraban fuertes; de 1,5 a 1,0, intermedias; y <1,0, bajas. La unión a HLA-A2 se muestra como un incremento en la MFI de HLA-A2.

Según se muestra en la Figura 5A, los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 sintetizados se unían a moléculas del HLA-A*0201 con diferentes afinidades: los péptidos EphA2 p883 y mesotelina p531 aparentemente regulaban al alza las moléculas de HLA-A*0201 y mostraban altas afinidades a moléculas de HLA-A*0201, mientras que FOLR1p191 tenía una baja afinidad para HLA-A*0201.

Según se muestra en la Figura 5B, la unión de estos péptidos, excepto FOLR1 p191, a la línea celular T2 se demostraba por un incremento en el índice de MFI. Los índices de MFI de estos péptidos, excepto FOLR1 p191, son mayores de 1,5, indicando una alta afinidad de unión. El control positivo, el péptido Mart1, tenía un índice de MFI de 3,82. El índice de MFI de FOLR1 p191 es menor de 1 indicando una unión de menor afinidad.

Conclusión: Los resultados anteriores demuestran que los péptidos del HLA-2 de la Vacuna Ejemplar 1 (HER2p773, IL-13R α 2p345, EphA2p883, NY-ESO-1p157, MAGEA1p278 y mesotelinap531) tiene una unión de alta afinidad con células T2, mientras que el péptido FOLR1p191 tiene una menor capacidad de unión a estas células. Estos datos sugieren que estos péptidos se pueden usar para impulsar células dendríticas HLA-A2 humanas y se pueden usar en pacientes HLA-A2.

Ejemplo 12. Evaluación de la citotoxicidad contra células madre de cáncer ovárico humano

Objetivo: Evaluar la citotoxicidad de CTLs, inducida por péptidos del HLA-A2, sobre células madre de cáncer ovárico humano ICT 140 HLA-A2(+).

A fin de desarrollar una nueva estrategia inmunoterapéutica para células de cáncer ovárico y células madre cancerosas, se propusieron los péptidos del HLA-A2 de antígenos de la Vacuna Ejemplar 1 como dianas

potenciales. Se estableció como hipótesis que los péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1 podrían inducir respuestas inmunitarias específicas antigénicamente.

- 5 Para probar esta hipótesis, células T CD8⁺ efectoras se aislaron y se cocultivaron con DC HLA-A2⁺ impulsadas con tres péptidos de la Vacuna Ejemplar 1: HER2 p773, IL-13Rα2 p345 y EphA2 p883, así como HER2 p339 para inducir CTLs antigénicamente específicos. Posteriormente, se evaluó la citotoxicidad contra células diana HLA-A2⁺ 882 CSC y 1031 CSC.

Materiales y métodos

10 1. Generación de células dendríticas humanas

Se generaron DCs derivadas de monocitos humanos usando métodos descritos previamente. Brevemente, se aislaron monocitos de PBMC mediante inmunoselección magnética usando el estuche de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep (Stem cell Technologies) basándose en las instrucciones del fabricante, a continuación se cultivaron en 5×10^7 /ml en 20 ml de medio libre de suero GMP CellGenix DC (N° cat 20801-0500, Cellgenix) complementado con 1000 unidades/ml de GM-CSF humano recombinante (N° cat AF-300-03, Peprotech, Inc) e IL-4 humana recombinante (N° cat AF-200-04, Peprotech, Inc) y las células se recogieron después de 3 o 6 días de cultivo. Las DCs se lavaron y se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 5×10^6 células/pocillo de IFN-γ (1000 unidades/ml) y a continuación se añadió lípido monofosforilado A (MPLA, 20-50 μg/ml) (N° cat L6895, Sigma, St. Louis) a los pocillos para madurar las DC durante 24 h o 48 h. Antes de algunos ensayos, las DCs se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido.

2. Inducción de CTL y detección de CD8⁺ específicos para Mart-1 mediante tetrámeros de HLA-A*0201/Mart1

A fin de evaluar las respuestas inmunitarias antigénicamente específicas, células T CD8⁺ se aislaron de aféresis reciente o congelada mediante selección positiva usando el estuche de aislamiento de CD8 positivos Dynabeads® CD8 (Life Technologies, Grand Island, NY) y se cocultivaron con mDC autólogas durante cuatro semanas. Se añadieron DCs semanalmente. Brevemente, las mDCs se impulsaron con péptidos sintéticos (10 μg/μl) durante 6-8 horas a 37°C y a continuación se trataron con 20 μg/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 25 min a 37°C y CO₂ al 5%. Las mDCs (5×10^4 células/pocillo) se cocultivaron con células T CD8⁺ autólogas (5×10^5 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos a 37°C, CO₂ al 5% en un volumen final de 200 μl de medio CTL (IMDM con asparagina 0,24 mM, L-arginina 0,55 mM, L-glutamina 1,5 mM y 10% de suero AB humano termoinactivado). La mitad del medio se reemplazó cada dos días por medio de cultivo reciente que contenía 40 IU/ml de IL-2 y 20 ng/ml de IL-7, la 3^a y 4^a semana 40 U/ml de IL-2 se reemplazaron por 25 ng/ml de IL-15. En el medio de cultivo, también se podían añadir péptidos al pocillo de cultivo en una concentración final de 1-2 μg/ml.

Para evaluar la expansión de CTL son tratar, se usó el péptido Melan A/Mart-1 (ELAGIGILTV (**SEQ ID NO:110**); Anaspec Inc, CA) como péptido de control positivo. El tetrámero CD8⁺ Mart1 se tiñó con el tetrámero de HLA-A*0201 conjugado a APC específico (Beckman Coulter, Brea, CA) basándose en la instrucción del fabricante. Brevemente, los CTLs (5×10^5) se tiñeron con los 10 μl de tetrámero durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación se lavaron con PBS y finalmente se tiñeron con anticuerpo marcado con PE anti-CD8 humano (BD Biosciences) durante 30 min a 4°C y se analizaron mediante citometría de flujo CyAn (Beckman Coulter, Inc).

3. Ensayo de destrucción

La citotoxicidad contra células diana (882CSC y 1031CSC) por CTLs que reconocen los péptidos HER2p339, HER2p773, IL-13Rα2p345 y EphA2p883 se evaluó usando DDAO-SE y el método de la caspasa-3 escindida. 882CSC y 1031CSC se marcaron con 1 μM de Cell Trace™ Far Red DDAO-SE (Life Technologies, Grand Island, NY) durante 15 min a 37°C y se lavaron con PBS dos veces siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células diana marcadas con DDAO-SE se mezclaron con células efectoras en una relación 1:10 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%. Las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron con solución Fix/Perm (BD Biosciences) y a continuación se tiñeron durante 30 minutos a 4°C con 10 μl de anticuerpo monoclonal anti-caspasa-3 escindida marcado con PE, seguido por análisis citométrico de flujo con Cyan (Beckman Coulter, Inc).

Resultados: Los resultados de los estudios de citotoxicidad contra una célula madre cancerosa humana 882CSC y 1031 CSC indicaban que los CTLs específicos de los péptidos HER2p339, HER2 p773, IL-13Rα2p345 y EphA2p883 pueden reconocer y someter a lisis eficazmente a células diana 882CSC y 1031CSC que expresan estos epítomos antigénicos de HER2p339, HERp773, IL-13Rα2p345 y EphA2p883.

Conclusión: El ensayo de destrucción demostraba que los CLTs específicos de los péptidos HER2 p773, IL-13Rα2p345 y EphA2p883 pueden reconocer y someter a lisis eficazmente a células madre de cáncer ovárico

humano 882CSC y 1031CSC y, así, apoya el desarrollo de la Vacuna Ejemplar 1 para orientarse a células de cáncer ovárico humano y células madre de cáncer ovárico.

Ejemplo 13. Análisis de conjuntos de datos de micromatrices de los perfiles de expresión de genes ICT140 y la correlación entre la expresión de ARN y la supervivencia global (OS)

5 Objetivo: Comparar la expresión génica de genes que codifican los antígenos de los que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 en cáncer ovárico humano y tejido normal a partir de conjuntos de datos de micromatrices de TCGA y determinar si la expresión de genes ICT140 está asociada a una supervivencia global (OS) escasa en pacientes con cáncer ovárico seroso de alto grado.

10 Antecedentes: El objetivo de los estudios de obtención de perfiles de expresión génica es identificar distintivos de expresión génica entre tejido tumoral y normal e identificar la correlación entre la expresión génica y el resultado clínico tal como supervivencia global (OS) a fin de descubrir biomarcadores potenciales para el tratamiento (p. ej., para el uso como una diana inmunoterapéutica).

15 Métodos: El proyecto The Cancer Genome Atlas (TCGA) ha analizado la expresión de ARN, la expresión de microARN, la metilación de promotores y el número de copias de ADN en 586 cistoadenocarcinomas ováricos serosos de alto grado que se perfilaron en la plataforma Affymetrix U133A y se preprocesaron con el software dChip (versión 12/5/2011) según se describe en el manual (Nature, 2011:609; Proc Natl Acad Sci USA2001;9:31).

20 GSE9891 contiene los datos de expresión y los datos clínicos de 285 muestras de cáncer ovárico y se ha depositado en the Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE9891) (Clin Cancer Res 2008; 14:5198).

25 El conjunto de datos de micromatrices se analizó con respecto a la expresión de ARN de genes que codifican antígenos de los que se derivan los péptidos de la vacuna ICT140, en muestras de cáncer ovárico humano. Además, este ejemplo comparaba la correlación entre la expresión de ARN y la supervivencia global (OS) de pacientes con cáncer ovárico.

30 Se usaron herramientas de análisis de la expresión génica de tcga-data.nci.nih.gov/tcga/, cancergenome.nih.gov y oncomine.org para examinar la expresión de ARN de genes ICT140 en 586 muestras de cáncer ovárico seroso humano en el conjunto de datos del TCGA.

35 El método de Kaplan-Meier se usó para estimar la correlación entre la expresión de ARN y la supervivencia global (OS) y la prueba de rangos logarítmicos se empleó para comparar la OS a través del grupo. Todos los análisis se realizaron usando la herramienta trazador de Kaplan-Meier basada en Internet (kmplot.com). Las curvas de supervivencia global y el número en riesgo se indicaban bajo la gráfica principal. También se calcularon la relación de peligro (HR; e intervalos de confianza de 95%) y los valores P del rango log.

40 Resultados: Según se muestra en la Figura 7, los valores de expresión de ARNm de HER2, IL-13R α 2, MAGE-A1, EphA2, FOLR1 y NY-ESO-1 en el conjunto de datos de micromatrices de cáncer ovárico del TCGA eran 1,025, 1,463, 1,252, 1,46, 1,696 y 1,552, respectivamente, indicando que la expresión de estos gen en tejido de cáncer ovárico es superior que en tejido normal. El valor de expresión de mesotelina (MSLN) era -1,464, indicando que la expresión de mesotelina en tejido de cáncer ovárico es inferior que en tejido normal.

45 La correlación entre la expresión de ARN de genes de la Vacuna Ejemplar 1 (es decir, genes que codifican proteínas de las que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1) y la supervivencia global (OS) se evaluó en pacientes de cáncer ovárico usando un conjunto de datos de micromatrices de TCGA. El análisis implicaba comparar la supervivencia en grupos de pacientes con expresión de ARN "alta" y "baja" de estos genes. Para el conjunto de datos del TCGA, los resultados de Kaplan-Meier de la supervivencia global (OS) con los grupos de pacientes de expresión "alta" y "baja" se muestra en la Figura 8. Los resultados de la Figura 8 muestran que los grupos de
50 pacientes con "alta" expresión de ARN de los genes HER2, EphA2, FOLR1, MSLN (mesotelina) y MAGE-A1 tenían una escasa supervivencia global (OS) con significación estadística ($p < 0,05$), mientras que no había una diferencia significativa entre la supervivencia global (OS) y la expresión de ARN de genes IL-13R α 2 y NY-ESO-1.

55 A fin de validar la correlación entre la supervivencia global (OS) y la expresión de ARN de IL-13R α 2 y NY-ESO-1, se examinó el conjunto de datos de GSE9891 y encontraron que los grupos de pacientes con "alta" expresión de ARN de IL-13R α 2 y NY-ESO-1 tenían escasa supervivencia global (OS) (Figura 9).

60 Conclusión: Estos hallazgos demuestran que HER2, EphA2, FOLR1, MSLN, MAGEA1, IL-13R α 2 y NY-ESO-1 (los genes que codifican proteínas de las que se derivan los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1) están asociados con una escasa supervivencia global (OS) en pacientes con cáncer ovárico de alto grado, basándose en los conjunto de datos TCGA y GSE9891. Estos datos proporcionan la base para el diseño racional de nuevas estrategias que incluyen inmunoterapia.

Ejemplo 14. Ensayo ELISPOT de IFN- γ de la respuesta de células T antigénicamente específica

Objetivo: Efectuar un ensayo de ELISPOT de IFN- γ para determinar la respuesta de células T antigénicamente específica a HER2p339 y los tres péptidos de la Vacuna Ejemplar 1: HER2p743, IL-13R α 2p345 y EphA2p883

- 5 A fin de desarrollar una nueva generación de dianas inmunoterapéuticas para células de cáncer ovárico y células madre de cáncer ovárico, se propusieron los siguientes péptidos del HLA-A2 antigénicos como dianas potenciales. Se estableció como hipótesis que los péptidos del HLA-A2 de ICT 140 podrían inducir una respuesta inmunitaria antigénicamente específica.
- 10 Para probar esta hipótesis, se aislaron células T CD8⁺ efectoras y se cocultivaron con DC HLA-A2⁺ impulsadas con HER2 p339 y tres péptidos de ICT 140 HER2p773, IL-13R α 2p345, EphA2p883 para inducir CTLs antigénicamente específicos. A continuación, se evaluó la respuesta de células T antigénicamente específica en un ensayo de ELISPOT de IFN- γ .

Materiales y métodos:

- 15 Generación de células dendríticas humanas

Se generaron DC derivadas de monocitos humanos usando métodos descritos previamente. Brevemente, se aislaron monocitos de PBMC mediante inmunoselección magnética usando el estuche de enriquecimiento de monocitos humanos EasySep (Stem cell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a continuación se cultivaron en 5×10^7 /ml en 20 ml de medio libre de suero GMP CellGenix DC (N° cat 20801-0500, Cellgenix) complementado con 1000 unidades/ml de GM-CSF humano recombinante (N° cat AF-300-03, Peprotech, Inc) e IL-4 humana recombinante (N° cat AF-200-04, Peprotech, Inc). Las células se recogieron después de 3 o 6 días de cultivo. Las DCs se lavaron y se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración de 5×10^6 células/pocillo de IFN- γ (1000 unidades/ml) y a continuación se añadió lípido monofosforilado A (MPLA, 20-50 μ g/ml) a los pocillos para madurar las DC durante 24 h o 48 h. Antes de algunos ensayos, las DCs se congelaron y se almacenaron en nitrógeno líquido.

20

25

Inducción de CTL y detección de CD8⁺ específicos para Mart-1 mediante tetrámeros de HLA-A*0201/Mart1

A fin de evaluar las respuestas inmunitarias antigénicamente específicas, células T CD8⁺ se aislaron de aféresis reciente o congelada mediante selección positiva usando el estuche de aislamiento de CD8⁺ positivos Dynabeads® CD8 (Life Technologies, Grand Island, NY) y se cocultivaron con mDC autólogas durante cuatro semanas. Se añadieron DCs semanalmente. Brevemente, las mDCs se impulsaron con péptidos sintéticos (10 μ g/ μ l) durante 6-8 horas a 37°C y a continuación se trataron con 20 μ g/ml de mitomicina C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 25 min a 37°C y CO₂ al 5%. Las mDCs (5×10^4 células/pocillo) se cocultivaron con células T CD8⁺ autólogas (5×10^5 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos a 37°C, CO₂ al 5% en un volumen final de 200 μ l de medio CTL (IMDM con asparagina 0,24 mM, L-arginina 0,55 mM, L-glutamina 1,5 mM y 10% de suero AB humano termoinactivado). La mitad del medio se reemplazó cada dos días por medio de cultivo reciente que contenía 40 IU/ml de IL-2 y 20 ng/ml de IL-7, la 3ª y 4ª semana 40 U/ml de IL-2 se reemplazaron por 25 ng/ml de IL-15. También se podían añadir péptidos al pocillo de cultivo en una concentración final de 1-2 μ g/ml.

30

35

Ensayo de ELISPOT de IFN- γ

40 Se evaluaron las respuestas inmunitarias antigénicamente específicas mediante el estuche Elispot de IFN- γ (BD Biosciences) siguiendo métodos descritos previamente. Brevemente, 1×10^5 células CTL se cocultivaron con $7,5 \times 10^4$ células T2 impulsadas con o sin 10 μ g/ml de péptidos y se sembraron en placas de 96 pocillos durante 20 horas. Células CTL sin células T2 y CTL más 5 μ g/ml de PHA se fijaron como controles negativos y positivos, respectivamente. Las manchas coloreadas, que representan células productoras de citocinas, se contaron bajo un microscopio de disección. Los resultados se evaluaron mediante un sistema lector de ELISPOT automatizado usando software KS ELISPOT 4.3.

45

Resultados: Según se muestra en la Figura 10, los CTLs producen más IFN- γ contra células T2 cargadas con los péptidos en comparación con el control de T2 (sin péptidos). Los resultados del ensayo ELISPOT de IFN- γ indicaban que tres péptidos de HER2p339 y ICT140 de CTLs específicos de los péptidos HER2 p773, IL-13R α 2p345 y EphA2p883 pueden reconocer eficazmente T2 impulsadas con estos antígenos y reforzar la respuesta inmunitaria de células T.

50

Conclusión: El ensayo ELISPOT de IFN- γ demostraba que los péptidos HER2p339 y los péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 HER2 p773, IL-13R α 2p345 y los CTL específicos de péptidos EphA2p883 pueden reconocer eficazmente

55

estos antígenos que contienen epítomos e inducir una respuesta inmunitaria de células T2. Este resultado forma la base para desarrollar adicionalmente una diana inmunoterapéutica para células de cáncer ovárico humano y células madre de cáncer ovárico así como células hijas de cáncer ovárico.

Ejemplo 15. Evaluación de citotoxicidad contra células de cáncer ovárico humano

- 5 Objetivo: Evaluar la citotoxicidad de CTLs, inducida por los siete péptidos del HLA-A2 de la Vacuna Ejemplar 1 sobre células de cáncer ovárico humano HLA-A2(+) del péptido de la Vacuna Ejemplar 1.

10 Métodos: Células T CD8⁺ efectoras se aislaron y se cocultivaron con DC HLA-A2+ impulsadas con los siete péptidos de la Vacuna Ejemplar 1 siguientes: HER2 p773, IL-13R α 2 p345, EphA2 p883, FOLR1 p191, NY-ESO-1 p157, mesotelina p531 y MAGE-A1 p278 para inducir CTLs antigénicamente específicos. Posteriormente, se evalúa la citotoxicidad contra células diana de cáncer ovárico HLA-A2+. Los métodos que se usarán en el experimento se describen en el Ejemplo 12.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el uso en el tratamiento del cáncer ovárico que comprende una mezcla de epítomos peptídicos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I de siete antígenos procedentes de mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1 y EphA2,
- 5 en donde los epítomos peptídicos del MHC clase I de los siete antígenos comprenden las siguientes secuencias peptídicas:
- SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina;
- SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1;
- 10 EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP;
- VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu;
- WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R $\alpha 2$;
- KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y
- TLADFDPV (SEQ ID NO:66) de EphA2.
- 15 2. La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que el epítomo peptídico del MHC clase I es un epítomo del HLA-A2.
3. La composición para el uso según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además al menos un epítomo peptídico del MHC clase I de al menos uno de los siete antígenos siguientes: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1.
- 20 4. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además al menos un epítomo peptídico del MHC clase I procedente de un antígeno asociado a un tumor, en donde el antígeno asociado a un tumor no es mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1, EphA2, p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina o hTERT.
- 25 5. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además al menos un epítomo peptídico del MHC clase II.
- 30 6. Una composición para el uso en el tratamiento del cáncer ovárico que comprende células dendríticas aisladas, en donde las células dendríticas presentan secuencias peptídicas sobre su superficie celular, en donde las secuencias peptídicas comprenden epítomos peptídicos del MHC clase I de los siete antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1 y EphA2, en donde los epítomos peptídicos del MHC clase I comprenden las siguientes secuencias peptídicas:
- 35 SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina;
- SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1;
- EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP;
- VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu;
- WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R $\alpha 2$;
- 40 KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y
- TLADFDPV (SEQ ID NO:66) de EphA2.
7. La composición para el uso según la reivindicación 6, en la que el epítomo peptídico del MHC clase I es un epítomo peptídico del HLA-A2.

- 5 8. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, que comprende además células dendríticas que presentan al menos un epítipo del MHC clase I de al menos uno de los siete antígenos siguientes: p53, k-Ras, Ep-CAM, MUC1, survivina, hTERT y WT1.
9. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende una cantidad eficaz de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 10 10. La composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el cáncer ovárico es cáncer ovárico epitelial.
11. La composición para el uso según la reivindicación 9 o 10, que comprende además un agente quimioterapéutico, en particular en la que el agente quimioterapéutico es ciclofosfamida.
- 15 12. Un procedimiento que comprende:
- cultivar células mononucleares derivadas de la médula ósea de un paciente con cáncer ovárico *in vitro* bajo condiciones en las que las células mononucleares se vuelven adherentes a un recipiente de cultivo;
- seleccionar las células mononucleares adherentes;
- 20 cultivar las células mononucleares adherente en presencia de una o más citocinas bajo condiciones en las que las células se diferencian en células que presentan antígeno;
- cultivar las células que presentan antígeno en presencia de péptidos, en donde los péptidos comprenden secuencias de aminoácidos correspondientes a epítopos peptídicos del MHC clase I de los siete antígenos siguientes: mesotelina, NY-ESO-1, FBP, HER-2/neu, receptor $\alpha 2$ de IL-13, MAGE-A1 y EphA2, bajo condiciones en las que las células presentan los péptidos sobre moléculas de histocompatibilidad principal clase I,
- 25 en donde los epítopos peptídicos del MHC clase I comprenden las siguientes secuencias peptídicas:
- SLLFLLFSL (SEQ ID NO:15) o VLPLTVAEV (SEQ ID NO:17) de mesotelina;
- SLLMWITQC (SEQ ID NO:26) de NY-ESO-1;
- EIWTHSYKV (SEQ ID NO:28) de FBP;
- VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:40) de HER2/neu;
- 30 WLPFGFILI (SEQ ID NO:49) de IL-13R $\alpha 2$;
- KVLEYVIKV (SEQ ID NO:55) de MAGE-A1; y
- TLADFDPRV (SEQ ID NO:66) de EphA2.

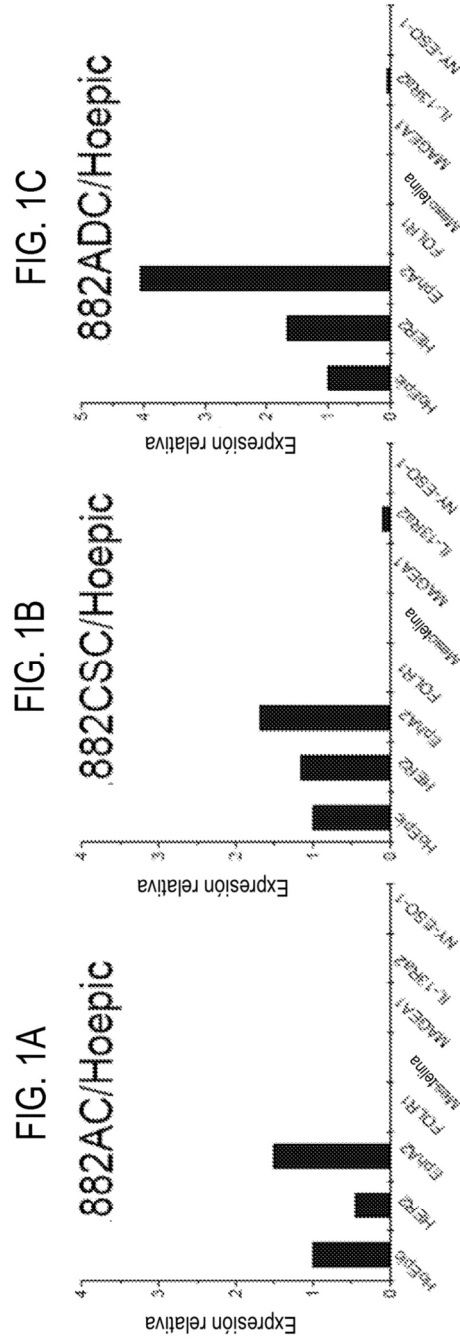


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

	HoEpic(Ct)	882AC(Ct)	882CSC(Ct)	882ADC(Ct)	882AC/Hoepic	882CSC/Hoepic	882ADC/Hoepic
GAPDH	24.77	22.38	22.53	25.03	$2^{-\Delta(\Delta Ct)}$	$2^{-\Delta(\Delta Ct)}$	$2^{-\Delta(\Delta Ct)}$
HER2	30.23	29.01	27.77	29.74	0.4414	1.16	1.67
EphA2	29.95	26.96	26.94	28.18	1.51	1.69	4.06
Mesotelina	31.18	38.97	39.88	38.94	0.000856	0.00051	0.0055
MageA1	N/A	33.43	39.42	37.97			
FOLR1	33.77	N/A	N/A	N/A			
IL-13Ra2	35.21	N/A	36.36	39.97		0.0947	0.0439
NYESO-1	N/A	N/A	N/A	N/A			

FIG. 2A

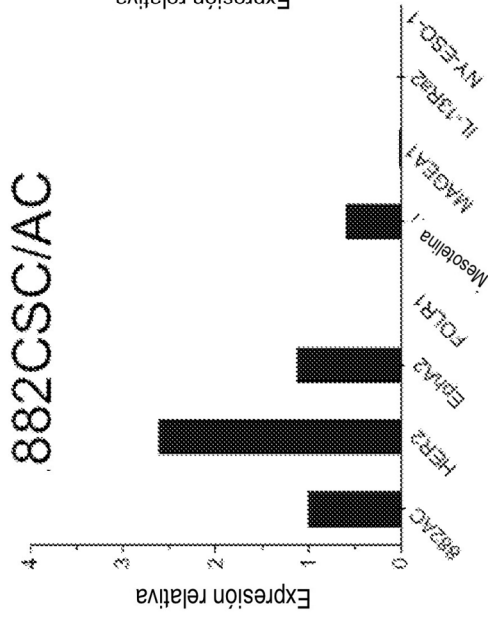
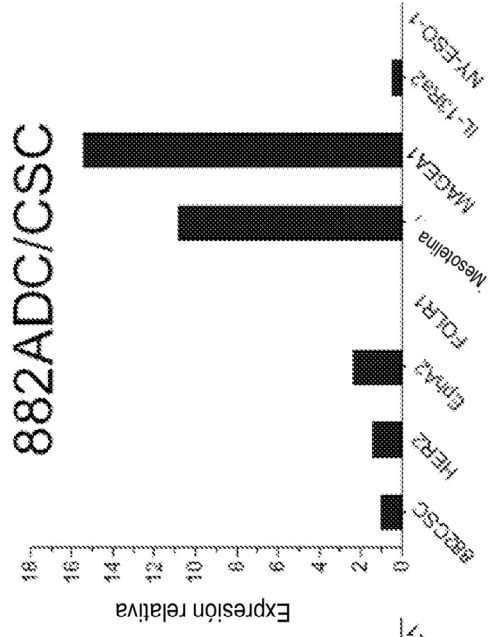
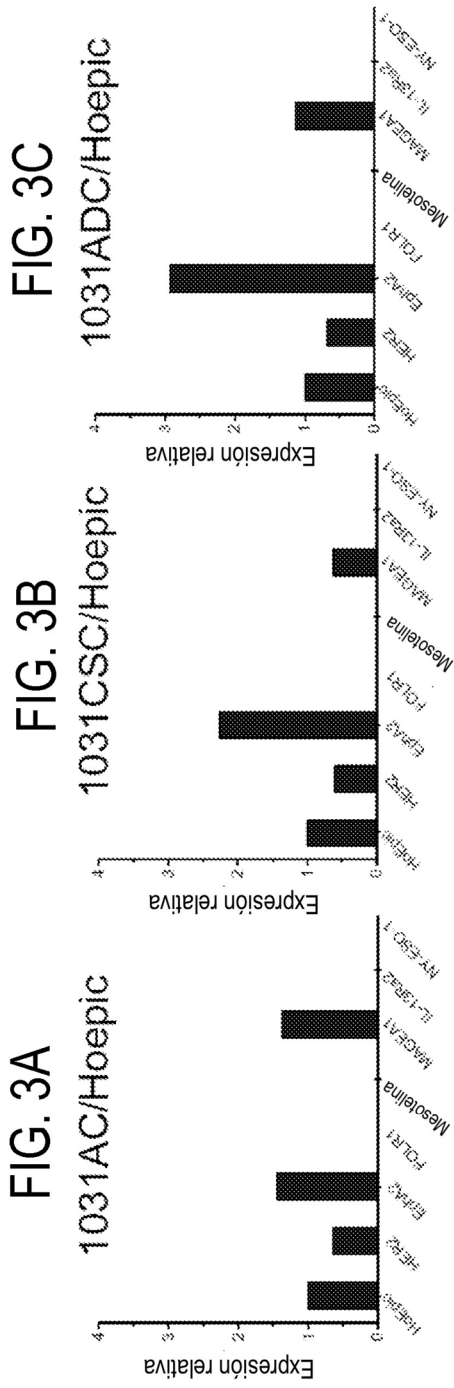


FIG. 2B



	882AC(Ct)	882CSC(Ct)	882ADC(Ct)	882CSC/AC	882ADC/CSC
	22.38	22.53	25.03	2 ^{Δ(ΔCt)}	2 ^{Δ(ΔCt)}
GAPDH	22.38	22.53	25.03		
HER2	29.01	27.77	29.74	2.62	1.45
EphA2	26.96	26.94	28.18	1.122	2.39
Mesoteline 1	38.97	39.88	38.94	0.5913	10.85
MageA1	33.43	39.42	37.97	0.0174	15.45
FOLR1	N/A	N/A	N/A		
IL-13Ra2	N/A	36.36	39.97		0.4655
NYESO-1	N/A	N/A	N/A		



	HoEpic(Ct)	1031AC(Ct)	1031CSC(Ct)	1031ADC(Ct)	1031AC/Hoepic	1031CSC/Hoepic	1031ADC/Hoepic	2 ^{-Δ(ΔCt)}	2 ^{-Δ(ΔCt)}	2 ^{-Δ(ΔCt)}
GAPDH	23.23	22.63	21.86	23.11						
HER2	28.93	29	28.43	29.42	0.6491	0.6099	0.6799			
EphA2	28.19	27.04	25.75	26.52	1.46	2.265	2.93			
Mesotolina	29.63	37.66	37.08	37.79	0.0025	0.00237	0.0032			
MageA1	38.07	36.99	37.47	37.75	1.38	0.63	1.14			
FOLR1	33.01	N/A	N/A	N/A						
IL-13Ra2	34.51	N/A	N/A	N/A						
NYESO-1	N/A	N/A	N/A	N/A						

	1031AC	1031CSC	1031ADC
IL-13Ra2	FOLR1	FOLR1	FOLR1
NY-ESO-1	NY-ESO-1	NY-ESO-1	NY-ESO-1
IL-13Ra2	IL-13Ra2	IL-13Ra2	IL-13Ra2
34.91	N/A	N/A	N/A
34.28	N/A	N/A	N/A
34.34	N/A	N/A	N/A

FIG. 4B

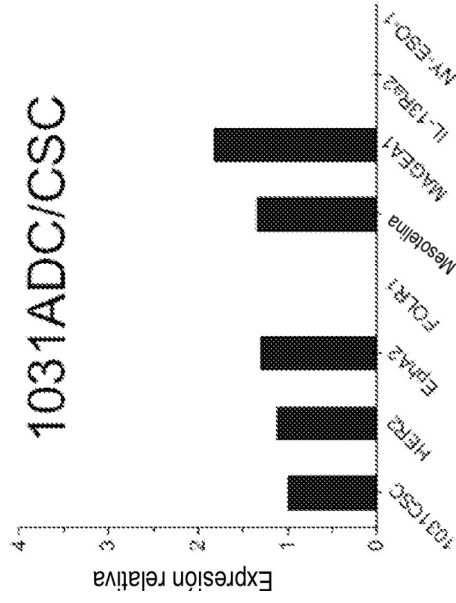
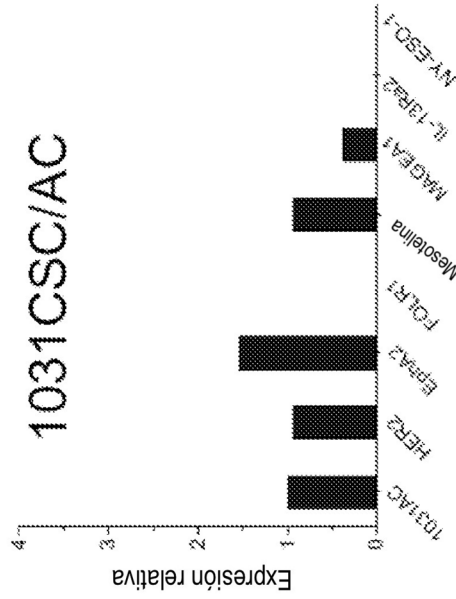


FIG. 4A



	1031AC(Ct)	1031CSC(Ct)	1031ADC(Ct)	1031CSC/AC 2 ^{Δ(ΔCt)}	1031ADC/CSC 2 ^{Δ(ΔCt)}
GAPDH	22.63	21.96	23.11		
HER2	29	28.43	29.42	0.94	1.11
EphA2	27.04	25.75	26.52	1.54	1.3
Mesotelina	37.66	37.08	37.79	0.94	1.35
MageA1	36.99	37.47	37.75	0.39	1.82
FOLR1	N/A	N/A	N/A		
IL-13Ra2	N/A	N/A	N/A		
NYESO-1	N/A	N/A	N/A		

FIG. 5A

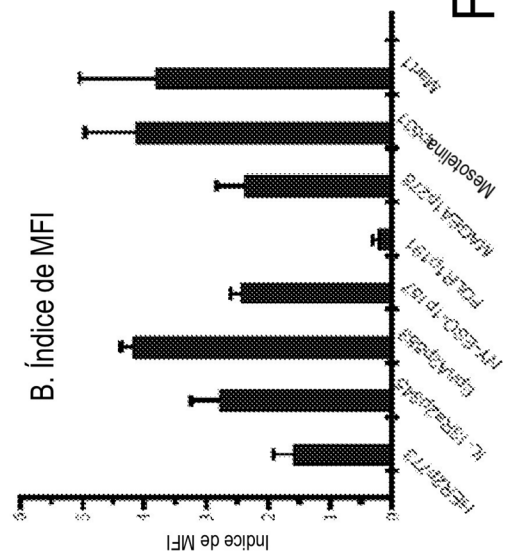
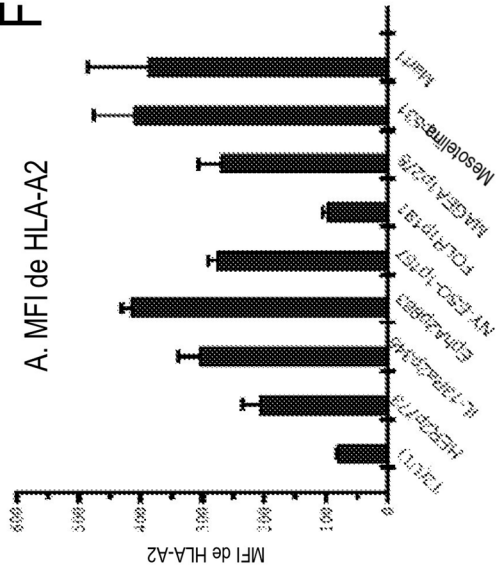
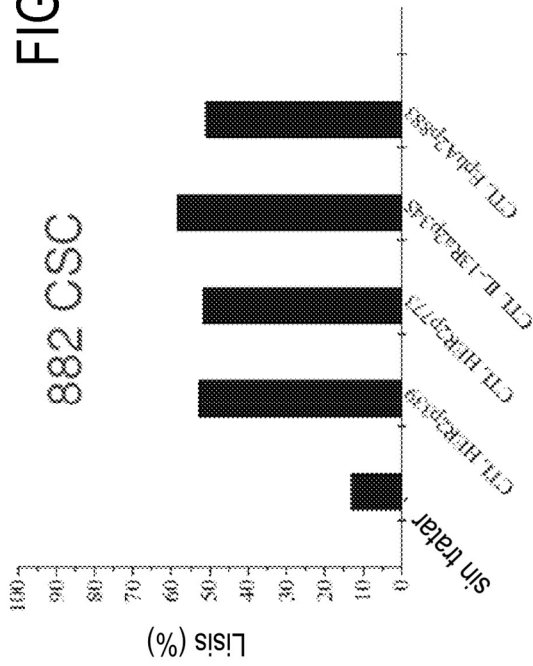


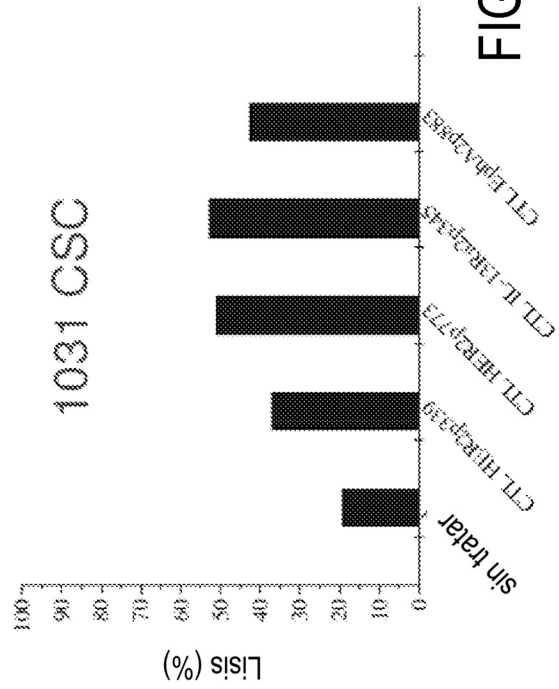
FIG. 5B

FIG. 6A



Control	CTLs	Lysis(%)
882CSC (UT)	HER2p339	52.91
13.05%	HER2p773	51.78
	IL-13ra2p345	58.38
	EpHA2p883	51.09

FIG. 6B



Control	CTLs	Lysis(%)
1031CSC (UT)	HER2p339	37.07
19.15%	HER2p773	51.31
	IL-13ra2p345	53.01
	EpHA2p883	42.74

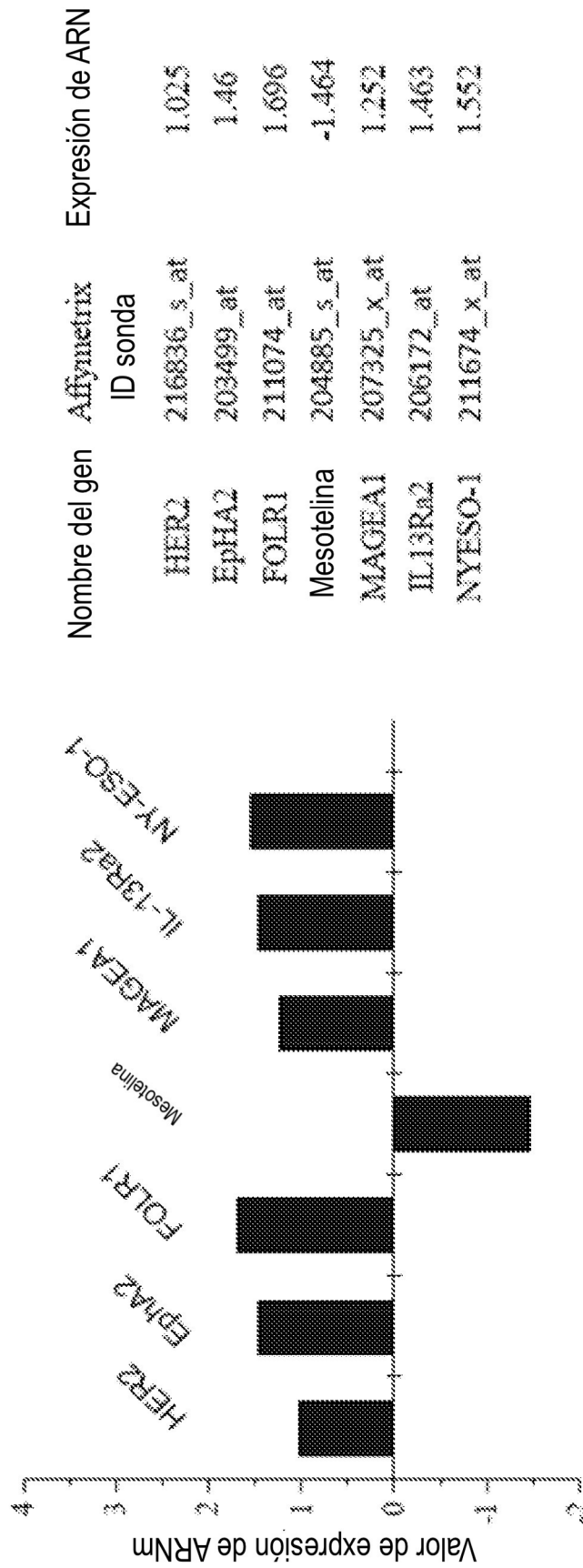


FIG. 7

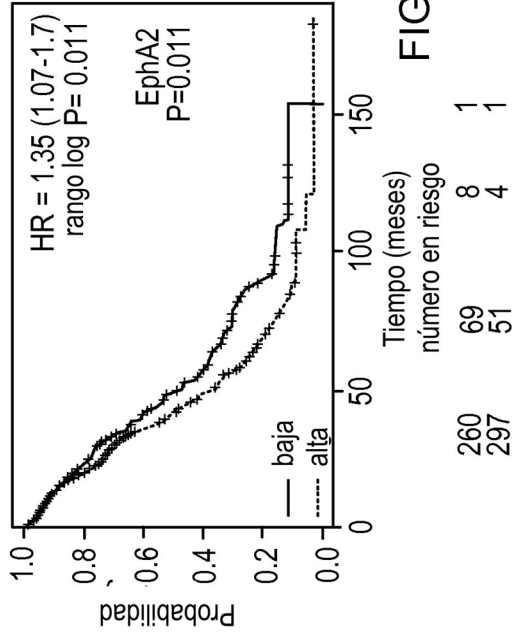


FIG. 8B

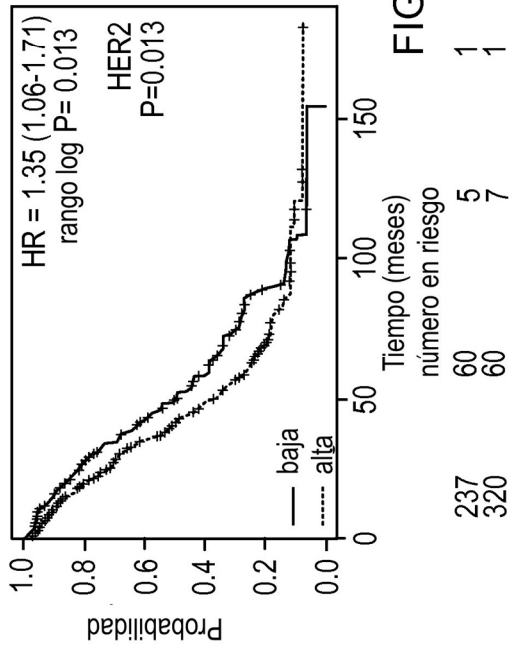


FIG. 8A

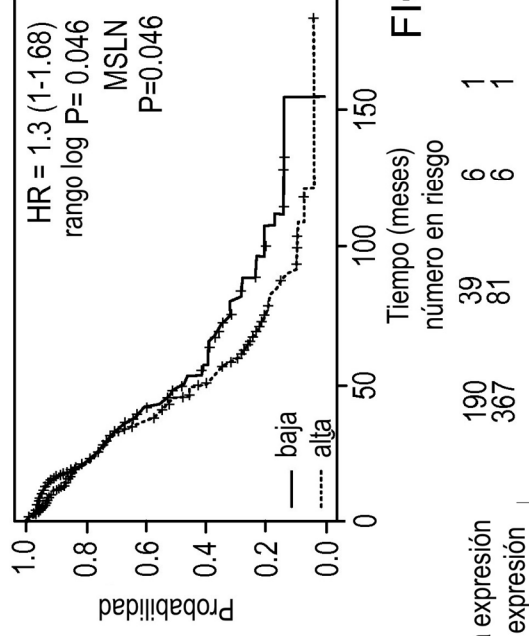


FIG. 8D

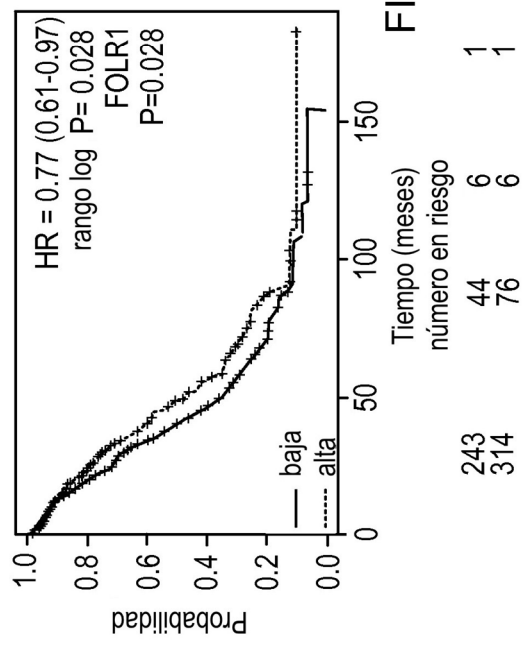


FIG. 8C

— Baja expresión
- - - - - Alta expresión

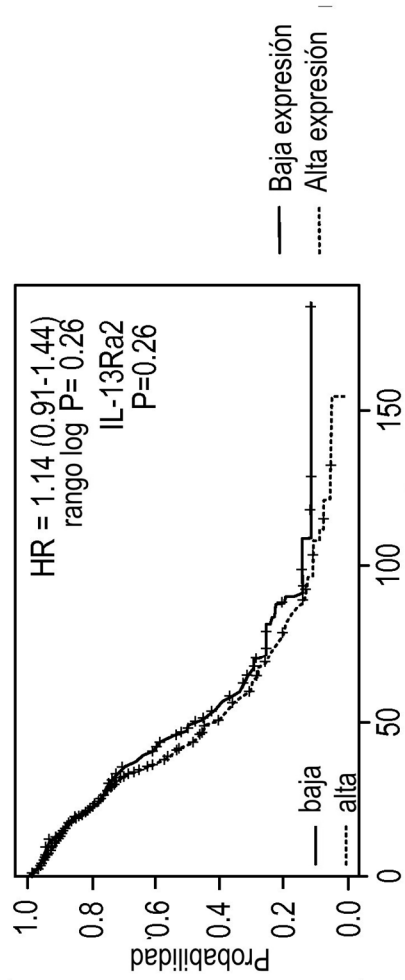


FIG. 8F

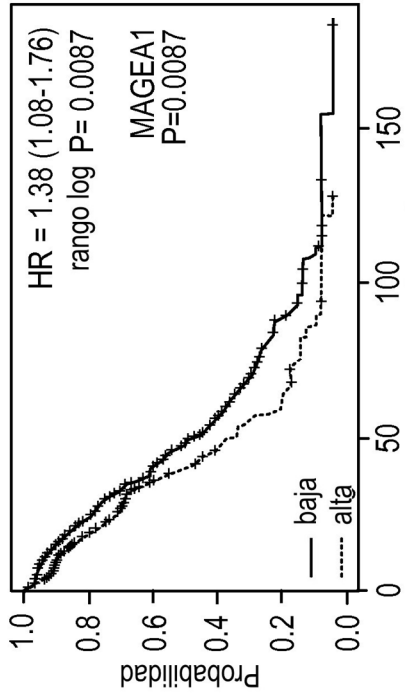


FIG. 8E

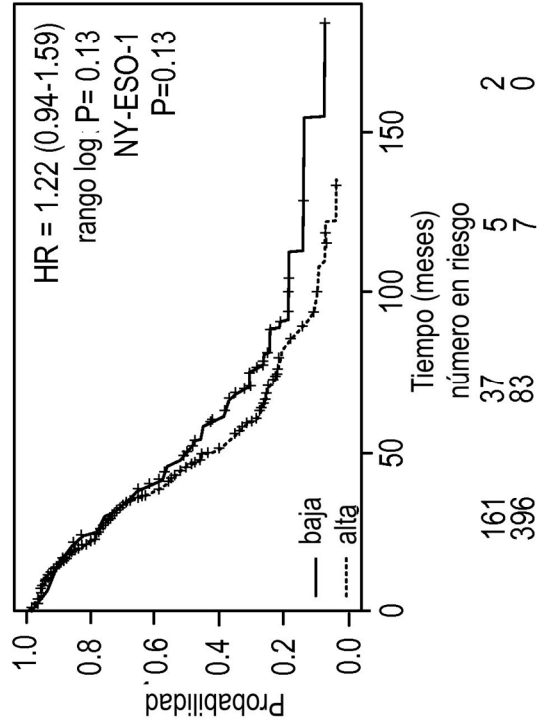
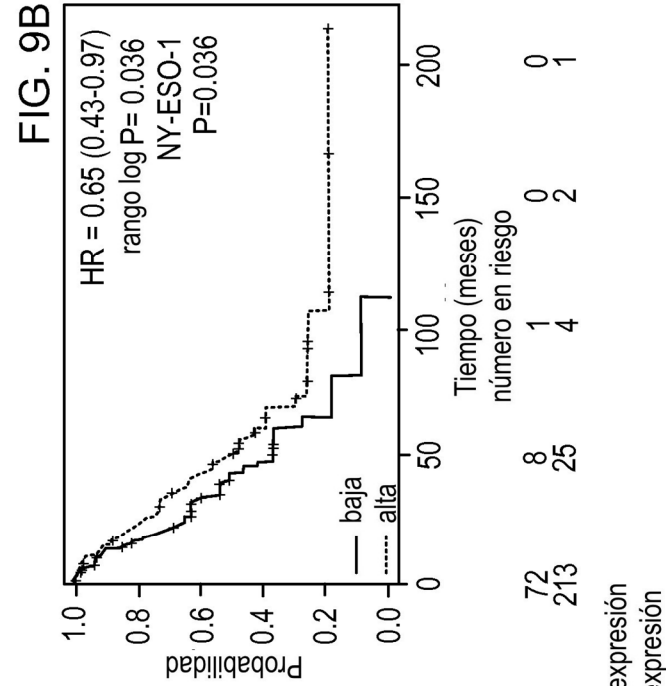
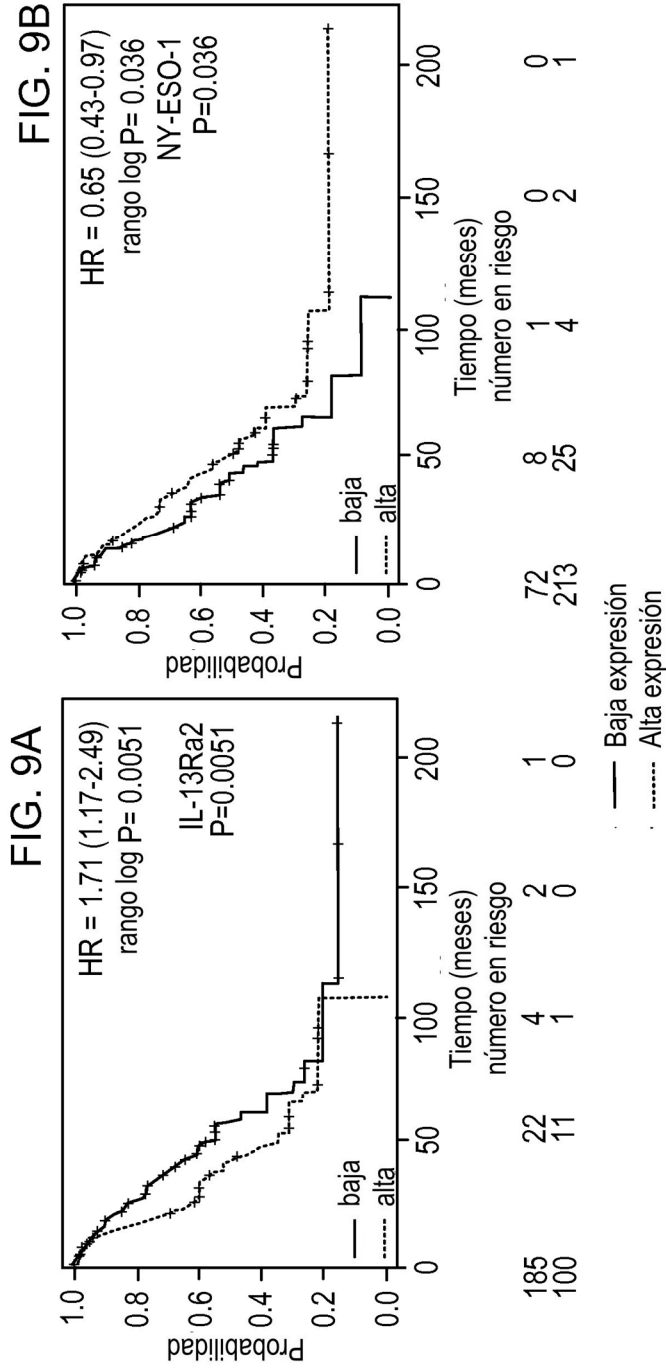


FIG. 8G

Nombre del gen	ARN (alto)**	ARN (bajo)*	HR	rango log P
HER2	320	237	1.35(1.06-1.71)	0.013
EphA2	297	260	1.35(1.07-1.7)	0.011
FOLR1	314	243	0.77(0.61-0.97)	0.028
MSLN	367	190	1.3(1-1.68)	0.046
MAGEA1	178	379	1.38(1.08-1.76)	0.0087
IL-13Ra2	323	234	1.14(0.91-1.44)	0.26
NYESO-1	396	161	1.22(0.94-1.59)	0.13

ANR (alto)**: alta expresión de ARN
 ANR (bajo)*: baja expresión de ARN
 HR: relación de peligro



Nombre del gen	ARN (alto)**	ARN (bajo)*	HR	rango log P
IL-13Ra2	100	185	1.7(1.17-2.49)	0.0051
NYESO-1	213	72	0.65(0.43-0.97)	0.036
	ANR (alto)**: alta expresión de ARN	ARN (bajo)*: baja expresión de ARN	HR: relación de peligro	

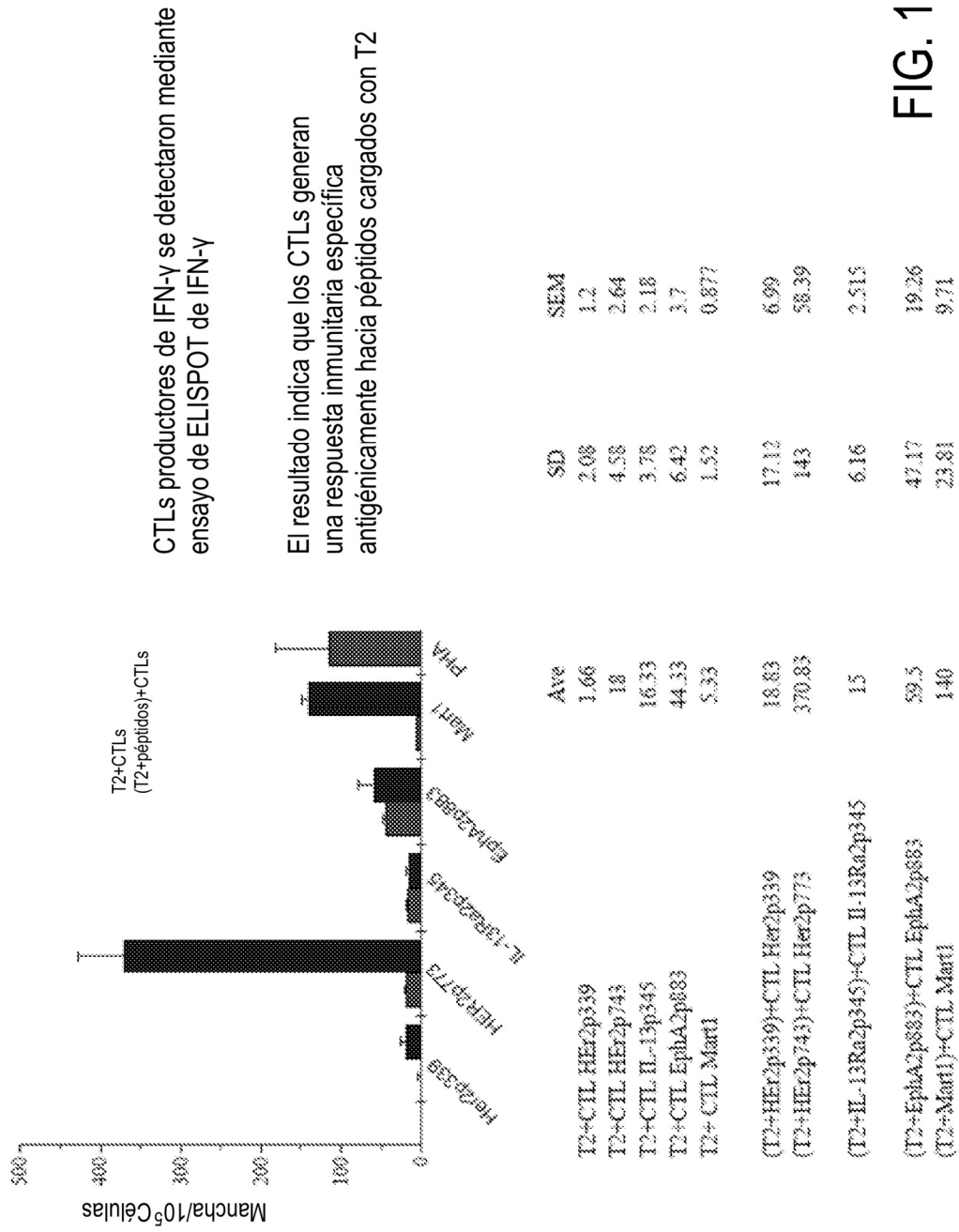


FIG. 10