(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 664 325**

(51) Int. CI.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2013 PCT/US2013/020058**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103658**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2013 E 13700352 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2800762**

(54) Título: **Epítopos de CTL naturales y agonistas del antígeno tumoral de MUC1**

(30) Prioridad:

03.01.2012 US 201261582723 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2018

(73) Titular/es:

THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes of Health 6011 Executive Boulevard, Suite 325 MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US

(72) Inventor/es:

SCHLOM, JEFFREY y
TSANG, KWONG-YOK

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Epítopos de CTL naturales y agonistas del antígeno tumoral de MUC1.

Antecedentes de la invención

MUC1 (CD227) es una glucoproteína de las membranas de tipo I compuesta por heterodímeros de una gran subunidad N-terminal (MUC1-N) c-+ovalentemente unida a una pequeña subunidad C-terminal (MUC1-C). MUC1-N es completamente extracelular, está densamente glucosilada y compuesta casi por completo por el número variable de 20 aminoácidos del dominio de repeticiones en tándem (VNTR). MUC1-C consiste en un dominio extracelular corto, un dominio transmembrana y un extremo o dominio citoplásmico (MUC1-CD).

MUC1 normalmente se expresa en la superficie apical de las células epiteliales y en un pequeño subconjunto de células no epiteliales tales como células hematopoyéticas y células T activadas. Su función principal en los epitelios sanos es proveer lubricación y una barrera física contra agentes químicos y microbianos. Su función fisiológica en otros tipos de células no está clara.

Se ha demostrado que muchos carcinomas humanos (como de ovario, mama, páncreas, colorrectal y de próstata) y tumores malignos hematológicos (mieloma múltiple y algunos linfomas no Hodgkin de células B) expresan MUC1 en forma excesiva y aberrante. En contraste con su expresión en racimos en los tejidos normales, MUC1 se distribuye uniformemente en toda la superficie de las células tumorales. Asimismo, MUC1 en general está glucosilada en forma deficiente en tumores, exponiendo epítopos nuevos y potencialmente antigénicos del núcleo de la proteína al sistema inmune. La expresión y la segregación de MUC1 también se han asociado con mal pronóstico y gran potencial metastásico.

Dado que MUC1 es un antígeno asociado a tumores, se han evaluado muchas estrategias que emplean MUC1 como una diana potencial de vacunas terapéuticas contra el cáncer durante los últimos 20 años para el uso de MUC1 como diana potencial para vacunas contra el cáncer. Los ensayos clínicos han ensayado proteínas, péptidos, adyuvantes, vehículos, células dendríticas cultivadas *ex vivo* (DC), lisados, fusiones DC, liposomas, virus de la viruela, adenovirus, levadura y lectinas de tipo C seleccionando las DC.

La mayoría de los ensayos clínicos que emplean MUC1 como diana para inmunoterapia han inscrito a pacientes con enfermedad metastásica avanzada que no pudieron alcanzar respuestas completas a largo plazo. Un factor en este resultado podría ser que la mayoría de estos ensayos clínicos se centraron en el dominio VNTR para montar una respuesta humoral o inmune mediada por las células contra MUC1. Una cantidad importante de subunidades N-terminales que contienen el dominio VNTR, diseminadas por la sangre durante la progresión del tumor, podría explicar parcialmente la falta de respuesta inmune contra las células tumorales que expresan MUC1 en su superficie.

MUC1 -C es la subunidad C-terminal de MUC1. Después de la escisión de MUC1, a pesar de la subunidad extracelular más grande, MUC1-C sigue anclado a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana (TD) de uno solo pase (28 aminoácidos). Se ha demostrado que MUC1-C, y no MUC1, es la forma predominante de la proteína en varias líneas celulares de tumores diferentes y muestras cancerosas, probablemente debido a la diseminación de la subunidad N-terminal. Además, MUC1-C se distribuye uniformemente sobre toda la superficie de las células tumorales, mientras que la subunidad N-terminal se agrura en 1 o 2 puntos, recuperando la conducta normal de MUC1 en el epitelio sano. Cabe destacar que se ha demostrado que algunas muestras de tejido pueden teñirse de modo positivo ante la presencia de MUC1-C, pero de modo negativo para la subunidad N-terminal.

En los últimos años, se han acumulado datos rápidamente con respecto a la función de MUC1-C como un oncogén. Los residuos de 72 aminoácidos de MUC1-CD se han asociado con un intervalo destacado de funciones de señalización intracelular, que implica interacciones con varios componentes mitocondriales, citoplásmicos de la membrana plasmática y nucleares. MUC1-CD es una diana para varias cinasas, como la proteína cinasa de 70 kD asociada con la cadena ζ (ZAP-70), la isoforma δ de la proteína cinasa C (PKCδ), la glucogén sintasa cinasa 3β (GSK-3β) y las tirosina cinasas c-Src y Lck. La fosforilación de MUC1-CD puede además ocurrir en respuesta a la activación de varios receptores de los factores de crecimiento de la superficie celular, incluido el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas y miembros de la familia ErbB. Aparte de la fosforilación, MUC1-CD puede además unir directamente varias proteínas y receptores tales como β-catenina, el receptor de estrógenos α y las proteínas de choque térmico. La transfección de MUC1-C es suficiente para inducir la transformación y conferir actividades oncogénicas previamente atribuidas a la proteína MUC1 de longitud total, tal como mayor tasa de crecimiento, crecimiento celular independiente del anclaje y resistencia a agentes quimioterapéuticos. La señalización de MUC1-C activada por c-Src ha estado implicada en la disrupción de las uniones de cadherina E adherens y adhesiones focales de integrina que estimulan la motilidad celular del cáncer, la invasión y la metástasis, sugiriendo una posible función de MUC1-C en la transición mesenquimal-epitelial. También se ha demostrado que los péptidos de MUC1 intracelulares específicos inhiben la progresión del cáncer. Finalmente, se ha demostrado que MUC1-C media el crecimiento de células madre pluripotentes, y que su expresión podría utilizarse como marcador para identificar y aislar células no diferenciadas.

Existe el deseo de identificar nuevos epítopos de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos y péptidos agonistas mejoradores de MUC1-C.

Compendio de la invención

La invención da a conocer un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 2, con la salvedad que se excluyen los péptidos con la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 23 y 25 del documento WO/2013/025972 A1. En otro aspecto, la invención da a conocer un ácido nucleico, una célula que comprende el péptido, ácido nucleico o vector y composiciones de estos.

La invención también da a conocer composiciones para usar a fin de mejorar la respuesta inmune en un sujeto.

La invención da a conocer también linfocitos estimulados con la composición *ex vivo* para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

La invención da a conocer células dendríticas tratadas con la composición *ex vivo* para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

La invención da a conocer células T transferidas en modo adoptivo estimuladas *in vitro* con la composición para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

La invención también da a conocer un kit para uso en la inhibición de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

La invención también da a conocer una primera composición y una segunda composición para uso en la inhibición de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto, en donde la primera composición se administra al sujeto como vacuna sensibilizadora y la segunda composición se administra al sujeto como una o más vacunas de refuerzo.

Breve descripción de las distintas vistas de los dibujos

Las figuras 1A-C son gráficos que muestran la producción de IFN-γ por parte de las líneas de células T específicas de péptidos naturales y péptidos agonistas. IFN-γ (pg/ml) se representa en el eje γ, y la concentración de péptido (pg/ml) de cada uno de (A) P1172 o P1172(1Y); (B) P1177 o P1177(10V); y (C) P1240 y P1240(1Y) se representa en el eje x.

Las figuras 2A-B son gráficos que muestran la lisis de la línea de células T específica de péptidos de HLA-A3^{+}, células diana de MUC1^{+} que emplean las líneas de células T T-P432-3F10K (A) y T-P483-2L3F (B). En cada una de las figuras, el porcentaje de lisis se encuentra en el eje y, y en el eje x se encuentra (a) la línea de células T sola, (b) la línea de células T más K562-A3, y (c) la línea de células T más K562-A3 más el correspondiente péptido A3.

La figura 3 es un gráfico que muestra la estabilidad de los complejos de péptido/HLA-A2 (para cada uno de los péptidos VNTR-1, VNTR-2, VNTR-3, VNTR-4 y VNTR-5). El porcentaje de los complejos restantes se encuentra en el eje y, y el tiempo en horas se encuentra en el eje x.

Descripción detallada de la invención

La invención da a conocer péptidos que comprenden un epítopo de linfocitos T citolíticos (CTL) humanos del antígeno asociado con el tumor humano (TAA) mucina 1 (MUC1) y sus análogos, que se pueden usar en la prevención con vacunas o terapia del cáncer. En particular, la invención da a conocer péptidos que comprenden un epítopo de CTL humano de MUC1-C y sus análogos.

En una primera realización, el péptido inventivo comprende la secuencia de aminoácidos de XLAIVYLIAL (SEC. ID. NÚM: 3), en donde X puede ser cualquier aminoácido pero es preferiblemente alanina o tirosina. Cuando X de SEC. ID. NÚM: 3 es alanina, el péptido corresponde al epítopo de CTL en las posiciones 1172-1181 de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 1). Cuando X de SEC. ID. NÚM: 3 es tirosina, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 2).

En la segunda realización, el péptido inventivo comprende la secuencia de aminoácidos de YLIALAVCQX (SEC. ID. NÚM: 6), en donde X puede ser cualquier aminoácido pero es preferiblemente cisteína o valina. Cuando X de SEC. ID. NÚM: 6 es cisteína, el péptido corresponde al epítopo de CTL en las posiciones 1177-1186 de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 4). Cuando X de SEC. ID. NÚM: 6 es valina, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 5).

En una tercera realización, el péptido inventivo comprende la secuencia de aminoácidos de XLSYTNPAV (SEC. ID. NÚM: 9), en donde X puede ser cualquier aminoácido pero preferiblemente es serina o tirosina. Cuando X de SEC. ID. NÚM: 9 es serina, el péptido corresponde al epítopo de CTL en las posiciones 1240-1248 de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 7). Cuando X de SEC. ID. NÚM: 9 es tirosina, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 8).

En una cuarta realización, el péptido inventivo comprende $ALX_1IVYLIAX_2$, (SEC. ID. NÚM: 11), en donde X_1 y X_2 pueden ser cualquier aminoácido pero preferiblemente X_1 es alanina o fenilalanina y X_2 es leucina o lisina. Cuando X_1 de SEC. ID. NÚM: 11 es alanina y X_2 de SEC. ID. NÚM: 11 es leucina, el péptido corresponde al epítopo de CTL en las posiciones 1172-1181 de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 1). Cuando X_1 de SEC. ID. NÚM: 11 es fenilalanina y X_2 de SEC. ID. NÚM: 11 es lisina, el péptido corresponde a un epítopo agonista potenciador de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 10).

En una quinta realización, el péptido inventivo comprende $SX_1X_2RSPYEK$ (SEC. ID. NÚM: 15), en donde X_1 y X_2 pueden ser cualquier aminoácido pero preferiblemente X_1 es treonina o leucina y X_2 es ácido aspártico, tirosina o fenilalanina. Cuando X_1 de SEC. ID. NÚM: 15 es treonina y X_2 de SEC. ID. NÚM: 15 es ácido aspártico, el péptido corresponde al epítopo de CTL en las posiciones 1223-1231 de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 12). Cuando X_1 de SEC. ID. NÚM: 15 es leucina y X_2 de SEC. ID. NÚM: 15 es tirosina, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 13). Cuando X_1 de SEC. ID. NÚM: 15 es leucina y X_2 de SEC. ID. NÚM: 15 es fenilalanina, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 14).

En una sexta realización, el péptido inventivo comprende $X_1X_2APPAHX_3V$ (SEC. ID. NÚM: 26), en donde X_1, X_2 y X_3 pueden ser cualquier aminoácido pero preferiblemente X_1 es serina o tirosina, X_2 es treonina o lisina, y X_3 es asparagina o glicina. Cuando X_1, X_2 y X_3 de SEC. ID. NÚM: 26 son serina, treonina y asparagina, respectivamente, el péptido corresponde a un epítopo de CTL del número variable de región de repeticiones tándem (VNTR) de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 27). Cuando X_1, X_2 y X_3 de SEC. ID. NÚM: 26 son serina, treonina y glicina, respectivamente, el péptido corresponde a un epítopo de CTL de la región VNTR de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 28). Cuando X_1, X_2 y X_3 de SEC. ID. NÚM: 26 son tirosina, lisina y glicina, respectivamente, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de la región VNTR de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 29).

En una séptima realización, el péptido inventivo comprende $X_1X_2DTRPAPX_3$ (SEC. ID. NÚM: 30), en donde X_1, X_2 y X_3 pueden ser cualquier aminoácido pero preferiblemente X_1 es alanina o tirosina, X_2 es prolina o leucina, y X_3 es glicina o valina. Cuando X_1, X_2 y X_3 de SEC. ID. NÚM: 30 son alanina, prolina y glicina, respectivamente, el péptido corresponde a un epítopo de CTL de la región VNTR de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 31). Cuando X_1, X_2 y X_3 de SEC. ID. NÚM: 30 son tirosina, leucina y valina, respectivamente, el péptido corresponde a un epítopo agonista mejorador de la región VNTR de MUC1 (SEC. ID. NÚM: 32).

El péptido inventivo puede comprender una de las secuencias de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 1-15 y 26-32 y uno o más residuos flanqueantes. Los residuos flanqueantes deben escogerse de modo tal de no interferir con la capacidad del péptido de inducir una respuesta inmune (p. ej., actividad de CTL). Los lineamientos para la selección de dichos residuos son provistos por la secuencia relevante del MUC1 propiamente dicho. Por ejemplo, uno puede escoger residuos para uso en el péptido que son idénticos a, o que tienen propiedades similares a, los residuos en las correspondientes posiciones de la proteína MUC1 (preferiblemente MUC1 humana).

Cuando el péptido comprende un epítopo de CTL presente en la secuencia MUC1 natural (p. ej., SEC. ID. NÚM: 1, SEC. ID. NÚM: 4, SEC. ID. NÚM: 7, SEC. ID. NÚM: 12, SEC. ID. NÚM: 27, SEC. ID. NÚM: 28 y SEC. ID. NÚM: 31), el péptido convenientemente no tiene más de 20 (p. ej., no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11 o no más de 10) residuos de aminoácidos. En una realización, los residuos de aminoácidos adicionales, si están presentes, provienen de MUC1 (p. ej., región MUC1-N, MUC1-C o VNTR). En este sentido, el péptido inventivo puede ser un fragmento de la proteína MUC1 (p. ej., región MUC1-N, MUC1-C o VNTR) que comprende no más de 20 aminoácidos contiguos de la proteína MUC1 (p. ej., región MUC1-N, MUC1-C o VNTR), en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 1, SEC. ID. NÚM: 4, SEC. ID. NÚM: 7, SEC. ID. NÚM: 12, SEC. ID. NÚM: 27, SEC. ID. NÚM: 28 y SEC. ID. NÚM: 31. Los residuos de aminoácidos adicionales de la proteína MUC1 se pueden posicionar o bien en un extremo o en ambos extremos de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 1, SEC. ID. NÚM: 4, SEC. ID. NÚM: 7, SEC. ID. NÚM: 12, SEC. ID. NÚM: 27, SEC. ID. NÚM: 28 y SEC. ID. NÚM: 31.

En particular, el péptido inventivo puede comprender no más de 11 (p. ej., no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, no más de 1 o 0) residuos de aminoácidos en el término C de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 1, SEC. ID. NÚM: 4, SEC. ID. NÚM: 7, SEC. ID. NÚM: 12, SEC. ID. NÚM: 27, SEC. ID. NÚM: 28 y SEC. ID. NÚM: 31, y/o no más de 11 (p. ej., no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, no más de 1 o 0) residuos de aminoácidos en el término N de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 1, SEC. ID. NÚM: 4, SEC. ID. NÚM: 7, SEC. ID. NÚM: 12, SEC. ID. NÚM: 27, SEC. ID. NÚM: 28 y SEC. ID. NÚM: 31, en donde el péptido inventivo tiene no más de 20 residuos de aminoácidos en total.

Cuando el péptido comprende un epítopo agonista mejorador de MUC1 (p. ej., SEC. ID. NÚM: 2, SEC. ID. NÚM: 5, SEC. ID. NÚM: 8, SEC. ID. NÚM: 10, SEC. ID. NÚM: 13, SEC. ID. NÚM: 14, SEC. ID. NÚM: 29 o SEC. ID. NÚM: 32), el péptido puede tener cualquier longitud adecuada, en una realización, el péptido no tiene más de 20 (p. ej., no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11 o no más de 10) residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos adicionales, si están

presentes, preferiblemente son de proteína MUC1 (p. ej., MUC1-C) o se basan en la secuencia de MUC1 descrita en este documento. Los residuos de aminoácidos adicionales se pueden posicionar en cualquier extremo o en ambos extremos de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 2, SEC. ID. NÚM: 5, SEC. ID. NÚM: 8, SEC. ID. NÚM: 10, SEC. ID. NÚM: 13, SEC. ID. NÚM: 14, SEC. ID. NÚM: 29 o SEC. ID. NÚM: 32.

En otra realización, la invención da a conocer un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de MUC1 o su fragmento, en donde uno o más de los correspondientes residuos de aminoácidos se han reemplazado con uno o más de los epítopos agonistas mejoradores de MUC1 (p. ej., SEC. ID. NÚM: 2, SEC. ID. NÚM: 5, SEC. ID. NÚM: 8, SEC. ID. NÚM: 10, SEC. ID. NÚM: 13, SEC. ID. NÚM: 14, SEC. ID. NÚM: 29 o SEC. ID. NÚM: 32). Por ejemplo, el polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de MUC1 de longitud total o su fragmento, en donde la alanina en la posición 1172 ha sido reemplazada por tirosina (correspondiente al epítopo agonista mejorador de la SEC. ID. NÚM: 2).

El péptido se puede preparar por cualquier método, como sintetizando el péptido o expresando un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos apropiada en una célula y recogiendo el péptido de la célula. También se puede emplear una combinación de dichos métodos. Los métodos para sintetizar péptidos nuevos y los métodos para producir péptidos en forma recombinante se conocen en la técnica (véanse, p. ej., Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3era ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994).

La invención también da a conocer un ácido nucleico que codifica el péptido. El ácido nucleico puede comprender ADN o ARN, y puede ser monocatenario o bicatenario. A su vez, el ácido nucleico puede comprender análogos o derivados de nucleótidos (p. ej., inosina fosforotioato nucleótidos y similares). El ácido nucleico puede codificar el péptido solo o como parte de una proteína de fusión. El ácido nucleico que codifica el péptido se puede proveer como parte de un constructo que comprende el ácido nucleico y elementos que permiten la administración del ácido nucleico a una célula y/o la expresión del ácido nucleico en una célula. Dichos elementos incluyen, por ejemplo, vectores de expresión, promotores y secuencias de transcripción y/o traducción. Los vectores, promotores, secuencias de transcripción/traducción y otros elementos adecuados, además de métodos para preparar dichos ácidos nucleicos y constructos, se conocen en la técnica (p. ej., Sambrook et al., *supra*; y Ausubel et al., *supra).*

La invención da a conocer también un vector que comprende el ácido nucleico. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen plásmidos (p. ej., plásmidos de ADN), levadura (p. ej., *Saccharomyces*) y vectores víricos como virus de la viruela, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociado, herpes virus, polio virus, alfavirus, baculorvirus y Sindbis virus. Cuando el vector es un plásmido (p. ej., plásmido de ADN), el plásmido puede formar complejo con quitosán. Preferiblemente, el vector es un virus de la viruela seleccionado del grupo que consiste en orthopox, viruela aviar, (avipox, fowlpox), viruela del mapache, viruela del conejo, viruela caprina (p. ej., viruela de oveja), leporipox y suipox (p. ej., viruela porcina). Los ejemplos preferidos de virus de la viruela aviar incluyen fowlpox, viruela de la paloma y viruela del canario, como ALVAC. Los ejemplos preferidos de virus orthopox incluyen vaccinia, vaccinia Ankara modificado (MVA), Wyeth, NYVAC, TROYVAC, Dry-Vax, POXVAC-TC (Schering-Plough Corporation), y sus derivados. Por ejemplo, los derivados de la cepa de Wyeth incluyen, entre otros, derivados que carecen de un gen K1L funcional.

Cuando el vector es para administración a un hospedante (p. ej., un ser humano), el vector (p. ej., virus de la viruela) preferiblemente tiene baja eficiencia replicativa en una célula diana (p. ej., no se produce más de aproximadamente 1 progenie por célula o más preferiblemente, no más de 0,1 progenie por célula). La eficiencia de replicación se puede determinar fácilmente en forma empírica, determinando la titulación del virus después de la infección de la célula diana.

Además del ácido nucleico que codifica el péptido, el vector puede también comprender uno o más genes que codifican una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras, factor estimulante de colonas de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), citocinas u otras moléculas que pueden potenciar la respuesta inmune (p. ej., antígenos asociados a tumores adicionales, como antígeno específico de próstata (PSA) y antígeno carcinoembrionario (CEA) o sus versiones modificadas tales como CEA-6D). El ácido nucleico que codifica el péptido, además de cualquier otro gen o genes exógenos, preferiblemente se inserta en un sitio o región (región de inserción) en el vector (p. ej., virus de la viruela) que no afecta la viabilidad vírica del virus recombinante resultante. Dichas regiones pueden identificarse fácilmente ensayando segmentos de ADN del virus para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar seriamente la viabilidad vírica del virus recombinante.

El gen de timidina cinasa (TK) es una región de inserción que se puede usar fácilmente y está presente en muchos virus. En particular, el gen de TK se ha hallado en todos los genomas de virus de la viruela examinados. Otros sitios de inserción adecuados se describen en la publicación de la solicitud de patente internacional WO 2005/048957. Por ejemplo, en viruela aviar, las regiones de inserción incluyen, aunque sin limitarse a ello, el fragmento BamHI J, el

fragmento EcoRI-HindIII, el fragmento BamHI, el fragmento EcoRV-HindIII, los sitios de inserción de secuencia única larga (LUS) (p. ej., FPV006/FPV007 y FPV254/FPV255), el sitio de inserción FP14 (FPV060/FPV061) y el sitio de inserción 43K (FPV107/FPV108). En vaccinia, los sitios de inserción incluyen, entre otros, 44/45, 49/50 y 124/125.

Cuando el vector es un virus de viruela aviar recombinante, el virus que comprende un ácido nucleico que codifica el péptido y/u otro gen o genes exógenos) (p. ej., que codifican una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras), el ácido nucleico que codifica el péptido puede insertarse en una región (p. ej., la región FP14) y el gen o los genes exógenos pueden insertarse en otra región (p. ej., la región BamHI J).

El vector inventivo puede incluir promotores y elementos reguladores adecuados, como un elemento regulador o potenciador de la transcripción. Cuando el vector es un vector del virus de la viruela, se pueden usar promotores del virus de la viruela, incluidos entre otros el promotor de vaccinia 7,5K, el promotor de vaccinia 30K, el promotor de vaccinia 40K, el promotor de vaccinia 13, el promotor sintético temprano/tardío (sE/L), el promotor 7.5, el promotor HH, el promotor 11K y el promotor Pi. Si bien los promotores suelen ser promotores constitutivos, también se pueden emplear promotores inducibles en los vectores de la invención. Dichos sistemas inducibles permiten la regulación de la expresión génica.

También se da a conocer en este documento una célula que comprende el péptido, ácido nucleico que codifica el péptido, o vector. Las células adecuadas incluyen células procariotas y eucariotas, p. ej., células mamíferas, de levadura, hongos y bacterias (como *E. coli*). La célula puede estar *in vitro,* como es útil para investigación o para la producción del péptido, o la célula puede estar *in vivo.* La célula puede ser una célula presentadora de antígeno pulsada por péptidos. Las células presentadoras de antígenos adecuadas incluyen, aunque sin limitarse a ello, células dendríticas, linfocitos B, monocitos, macrófagos y similares.

En una realización, la célula es una célula dendrítica. Las células dendríticas de diferentes etapas de maduración se pueden aislar en base a los marcadores de expresión de la superficie celular. Por ejemplo, las células dendríticas maduras son menos capaces de capturar proteínas nuevas para presentación, pero son mucho mejores para estimular el desarrollo y la diferenciación de células T en reposo. Por lo tanto, las células dendríticas maduras pueden ser de importancia. Las células dendríticas maduras se pueden identificar por su cambio en morfología y por la presencia de varios marcadores. Dichos marcadores incluyen, entre otros, marcadores de la superficie celular como B7.2, CD40, CD11 y MHC de clase II. Alternativamente, la maduración se puede identificar observando o midiendo la producción de citocinas proinflamatorias.

Las células dendríticas se pueden recoger y analizar usando citofluorografía típica y técnicas y dispositivos de clasificación celular, como el clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos específicos de antígenos de la superficie celular de distintas etapas de maduración de células dendríticas se comercializan.

El péptido, el ácido nucleico, el vector o la célula se pueden aislar. El término "aislar" tal como se emplea en este documento, abarca compuestos o composiciones que se han extraído de un entorno biológico (p. ej., una célula, tejido, medio de cultivo, fluido corporal, etc.) o que de otro modo aumentaron en pureza en algún grado (p. ej., aislados de un medio de síntesis). Los compuestos y composiciones aislados, por lo tanto, pueden producirse de manera sintética o natural.

El péptido, ácido nucleico, vector o célula se pueden formular como una composición (p. ej., composición farmacéutica) que comprende el péptido, ácido nucleico, vector o célula y un vehículo (p. ej., un vehículo farmacéuticamente aceptable). Asimismo, el péptido, ácido nucleico, vector, célula o composición de la invención se puede usar en los métodos descritos en este documento solo o como parte de una formulación farmacéutica.

La composición (p. ej., composición farmacéutica) puede comprender más de un péptido, ácido nucleico, vector o célula, o composición de la invención. Alternativamente o además, la composición puede comprender uno o más agentes farmacéuticamente activos o fármacos. Los ejemplos de dichos otros agentes farmacéuticamente activos que pueden ser adecuados para uso en la composición farmacéutica incluyen agentes antineoplásicos (p. ej., fármacos quimioterapéuticos), antibióticos, fármacos antivíricos, fármacos antifúngicos, ciclofosfamida y sus combinaciones. Los antineoplásicos adecuados incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, nitrógeno mostazas, antagonistas de folato, antagonistas de purina, antagonistas de pirimidina, venenos del huso, inhibidores de topoisomerasa, agentes inductores de apoptosis, inhibidores de angiogénesis, podofilotoxinas, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, interferón, asparginasa, tamoxifeno, leuprolida, flutamida, megestrol, mitomicina, bleomicina, doxorrubicina, irinotecán, taxol, geldanamicina (p. ej., 17-AAG) y diversos péptidos antineoplásicos y anticuerpos conocidos en la técnica.

El vehículo puede ser cualquiera de aquellos convencionalmente utilizados y se limita solamente a consideraciones físico-químicas como solubilidad y ausencia de reactividad con el compuesto(s) activo y la ruta de administración. Los expertos en la técnica conocen los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en este documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, y el público puede adquirirlos fácilmente de fuentes comerciales. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno químicamente inerte al agente(s) activo y uno que no posea efectos colaterales perjudiciales ni toxicidad bajo las condiciones de uso.

La elección del vehículo se determinará en parte por el péptido, ácido nucleico, vector, célula particular o la composición de estos en la invención y por otros agente activos o fármacos utilizados, además de por el método particular que se emplee para administrar el péptido, ácido nucleico, vector, célula o composición de estos.

La composición adicional o alternativamente puede comprender una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras. Se puede usar cualquier molécula inmunoestimuladora/reguladora, tal como interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-12 , interferón (IPN)-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-α, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD70, RANTES, G-CSF, OX-40L, 41 BBL, anti-CTLA-4 y sus combinaciones. Preferiblemente, la composición comprende una combinación de B7.1, ICAM-1 y LFA-3 (también denominado TRICOM). La molécula o moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras se pueden administrar en la forma de vectores (p. ej., un vector vírico recombinante, como un vector del virus de la viruela) que comprende un ácido nucleico que codifica una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras. Por ejemplo, la molécula o moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras (p. ej., IL-12) se pueden administrar en la forma de un plásmido de ADN con o sin quitosán. Alternativamente, la molécula o moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras se pueden administrar como una proteína (p. ej., proteína recombinante), como una proteína (p. ej., IL-12 recombinante) combinada con quitosán.

En una realización de la invención, la composición comprende un primer vector recombinante que comprende el ácido nucleico que codifica el péptido inventivo y un segundo vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica B7.1, ICAM-1 y LFA-3. En otra realización, el ácido nucleico que codifica el péptido inventivo y el ácido nucleico que codifica B7.1, ICAM-1 y LFA-3 están en el mismo vector recombinante. El primero y/o el segundo vectores pueden además comprender un ácido nucleico que codifica otro antígeno asociado a un tumor (p. ej., CEA), su versión modificada (p. ej., CEA-6D) o uno de sus epítopos.

La invención da a conocer un método para transducir células dendríticas con el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una composición de estos, y opcionalmente moléculas, inmunoestimuladoras/reguladoras, como por ejemplo, B7-1, ICAM-1 y LFA-3. En un aspecto de la invención, las células dendríticas transducidas con el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones al hospedante generan una respuesta inmune, como la activación de una respuesta de las células T citotóxicas.

En una primera realización, la invención provee el péptido, ácido nucleico, vector, célula o composición para uso en mejorar la respuesta inmune en un sujeto. El péptido, ácido nucleico, vector, célula de la invención, o una de sus composiciones, se pueden usar para prevenir el desarrollo de un cáncer que expresa MUC1, particularmente en un individuo que conlleva un riesgo mayor de desarrollar dicho cáncer que otros individuos, o para tratar a un paciente que padece un cáncer que expresa MUC1. El péptido, ácido nucleico, vector, célula de la invención, o una de sus composiciones, se pueden usar para tratar a un sujeto con cáncer que expresa MUC1 en cualquier estadio.

En una segunda realización, la invención provee células dendríticas tratadas con uno o más de la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones, para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC 1 en un sujeto.

En una quinta realización, la invención provee linfocitos estimulados con la composición *ex vivo* para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

La invención también provee células T transferidas en forma adoptiva estimuladas *in vitro* con una o más de la cantidad terapéuticamente eficaz del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones para uso en el tratamiento de un cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

El cáncer que expresa MUC 1 puede ser cualquier cáncer que exprese MUC1, entre otros, carcinomas humanos (como de ovario, mama, páncreas, colorrectal, de pulmón, tiroides, gástrico, de cabeza y cuello, y de próstata) y tumores hematológicos (mieloma múltiple y algunos linfomas no Hodgkin de células B).

El péptido, ácido nucleico, vector, célula o una composición de estos se pueden administrar al hospedante por cualquier método. Por ejemplo, el péptido o el ácido nucleico que codifica el péptido (p. ej., como un vector) se pueden introducir en una célula (p. ej., en un hospedante) por cualquiera de diversas técnicas, como poniendo en contacto la célula con el péptido, el ácido nucleico o una de sus composiciones, que comprende el ácido nucleico como parte de un constructo, como se describe en la presente invención, lo que permite la administración y expresión del ácido nucleico. Los protocolos específicos para introducir y expresar ácidos nucleicos en células se conocen en la técnica (véanse*, p. ej.,* Sambrook et al. (eds.), *supra*; y Ausubel et al., *supra).*

Los métodos adecuados para administrar péptidos, ácidos nucleicos, vectores, células y composiciones a hospedantes (sujetos) se conocen en la técnica. El hospedante (sujeto) puede ser cualquier hospedante adecuado, como un mamífero (p. ej., un roedor, como un ratón, rata, hámster o cobaya, conejo, gato, perro, cerdo, cabra, vaca, caballo, primate o ser humano).

Por ejemplo, el péptido, ácido nucleico o vector (p. ej., virus de la viruela recombinante) se puede administrar a un hospedante por exposición de células tumorales al péptido, ácido nucleico o vector *ex vivo* o por inyección del

péptido, ácido nucleico o vector al hospedante. El péptido, ácido nucleico, vector (p. ej., virus de la viruela recombinante) o combinación de vectores, célula y composición se pueden administrar directamente (p. ej., se pueden administrar localmente) por inyección directa en la lesión cancerosa o tumor o por aplicación tópica (p. ej., con un vehículo farmacéuticamente aceptable).

El péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se pueden administrar solos o combinados con adyuvantes, incorporados en liposomas (como se describe, p. ej., en las patentes de Estados Unidos núm. 5.643.599, 5.464.630, 5.059.421 y 4.885.172), con citocinas, con modificadores de la respuesta biológica (p. ej., interferón, interleucina -2 (IL-2) y factores estimulantes de colonias (CSF, GM-CSF y G-CSF), u otros reactivos de la técnica que se conocen por potenciar la respuesta inmune.

Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen aluminio, sales de aluminio, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sílice y aluminio, fosfato de calcio, adyuvante de Freund incompleto, QS21, MLP-A y RIBI DETOX™.

Un adyuvante particularmente preferido para uso en la invención es la citocina GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un adyuvante de vacuna eficaz debido a que potencia el procesamiento y la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas. Los estudios experimentales y clínicos sugieren que GM-CSF recombinante puede reforzar la inmunidad del hospedante directamente en una variedad de inmunógenos.

GM-CSF se puede administrar usando un vector vírico (p. ej., vector del virus de la viruela) o como una proteína aislada en una formulación farmacéutica. GM-CSF se puede administrar al hospedante antes, durante o después de la administración inicial del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones para potenciar la respuesta inmune específica de antígenos en el hospedante. Por ejemplo, la proteína GM-CSF recombinante se puede administrar al hospedante cada día de vacunación con el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones y durante cada día de los siguientes 3 días (es decir, un total de 4 días). Se puede emplear cualquier dosis adecuada de GM-CSF. Por ejemplo, se pueden administrar dosis diarias de 50-500 µg (p. ej., 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg e intervalos de estas dosis) de GM-CSF recombinante. GM-CSF se puede administrar por cualquier método adecuado (p. ej., por vía subcutánea) y, preferiblemente, se administra en o cerca del sitio de vacunación de un hospedante con el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones.

En una realización, el péptido inventivo se puede conjugar con péptidos cooperadores o con moléculas vehículo grandes para potenciar la inmunogenicidad del péptido. Estas moléculas incluyen, aunque sin limitarse a ello, péptido de gripe, toxoide tetánico, epítopo de toxoide tetánico CD4, Pseudomonas exotoxina A, poli-L-lisina, un extremo lipídico, secuencia de señalización del retículo endoplasmático (ER) y similares.

El péptido inventivo también se puede conjugar a una molécula de inmunoglobulina que usa métodos aceptados en la técnica. La molécula de inmunoglobulina puede ser específica de un receptor de superficie presente en las células del tumor, pero ausente o en muy bajas cantidades en las células normales. La inmunoglobulina también puede ser específica de un tejido específico (p. ej., tejido de mama, ovario, colon o próstata). Dicho conjugado péptido-inmunoglobulina permite dirigir el péptido hacia un tejido y/o célula específico.

El péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se administran a un hospedante (p. ej., mamífero tal como un ser humano) en una cantidad eficaz para generar respuesta inmune específica de MUC1, preferiblemente una respuesta inmune celular. La eficacia del péptido, ácido nucleico, vector o célula como un inmunógeno se puede determinar por parámetros *in vivo* o *in vitro* conocidos en la técnica. Estos parámetros incluyen, entre otros, ensayos de citotoxicidad específicos de antígenos, regresión de tumores que expresan MUC1 o epítopos de MUC1, inhibición de células cancerosas que expresan MUC1 o epítopos de MUC1, producción de citocinas y similares.

Se puede administrar al hospedante cualquier dosis del péptido, ácido nucleico, vector o célula, o una de sus composiciones. La dosis adecuada variará dependiendo de factores tale como la edad, el peso, la estatura, el sexo, el estado médico general, los antecedentes médicos, la progresión de la enfermedad y la carga del tumor del hospedante, y será determinada por el médico. Por ejemplo, el péptido se puede administrar en una dosis de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg (p. ej., 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, e intervalos de estas dosis) por vacunación del hospedante (p. ej., mamífero, como un ser humano), y preferiblemente aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por vacunación. Se pueden administrar varias dosis (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) (p. ej., durante un periodo de semanas o meses). En una realización, se administra una dosis todos los meses durante 3 meses.

Cuando el vector es un vector vírico, una dosis adecuada puede incluir aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^{12} (p. ej., 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10}, 1×10^{11}, y sus intervalos) unidades formadoras de placas (pfus), aunque se puede administrar una dosis menor o mayor a un hospedante. Por ejemplo, aproximadamente se pueden administrar 2×10^8 pfus (p. ej., en un volumen de aproximadamente 0,5 ml).

Las células de la invención (p. ej., células T citotóxicas) se pueden administrar a un hospedante en una dosis entre aproximadamente 1×10^5 y 2×10^{11} (p. ej., 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10}, y sus intervalos) células por

infusión. Las células se pueden administrar en, por ejemplo, una a tres (p. ej., dos) infusiones. Además de la administración de las células, el hospedante puede recibir la administración de un modificador de la respuesta biológica, como interleucina 2 (IL-2). Cuando las células que se han de administrar son células T citotóxicas, la administración de las células T citotóxicas puede estar seguida de la administración del péptido, ácido nucleico, vector o una de sus composiciones con el fin de cebar las células T citotóxicas para expandir más el número de células T *in vivo.*

Cuando las células que se han de administrar son células dendríticas, la cantidad de células dendríticas administradas al sujeto variará dependiendo del estado del sujeto, y será determinada por el médico teniendo en cuenta todos los factores apropiados. Preferiblemente, aproximadamente $1x10^6$ a aproximadamente $1x10^{12}$ (p. ej., aproximadamente $1x10^7$, aproximadamente $1x10^8$, aproximadamente $1x10^9$, aproximadamente $1x10^{10}$ o aproximadamente $1x10^{11}$ incluidos intervalos de cualquiera de los números de células descritos en este documento) células dendríticas por seres humanos adultos. Estas cantidades podrán variar dependiendo de la edad, el peso, la talla, el estado y el sexo del sujeto, el tipo de tumor a tratar, la ruta de administración, si el tratamiento es regional o sistémico, y otros factores. Los expertos en la técnica deben ser capaces de derivar fácilmente dosis y esquemas apropiados de administración para adaptarlos a las circunstancias y necesidades específicas del sujeto.

La invención da a conocer un método para generar linfocitos T citotóxicos específicos de péptidos *in vivo, ex vivo* o *in vitro* por estimulación de linfocitos con una cantidad eficaz del péptido, ácido nucleico, vector o célula de la invención, solo o en una composición con una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/o adyuvante, o en una formulación de liposomas. Los linfocitos pueden ser de cualquier fuente, p. ej., sangre periférica, tejidos de tumores, ganglios linfáticos y efusiones, tales como fluido pleural o fluido de ascitis.

Los linfocitos T citotóxicos específicos de péptido de MUC1 son inmunorreactivos con MUC1. Preferiblemente, los linfocitos T citotóxicos inhiben la aparición de células tumorales y cáncer, e inhiben el desarrollo o destruyen las células tumorales que expresan MUC1 o sus epítopos. Los linfocitos T citotóxicos, además de ser específicos de antígenos, pueden restringirse a la clase I de MHC. En una realización, los linfocitos T citotóxicos se restringen a la clase I de MHC, HLA-A2. En otra realización, los linfocitos T citotóxicos se restringen a la clase I de MHC, HLA-A3. Los linfocitos T citotóxicos tienen un fenotipo $CD8^+$.

En una realización, los linfocitos se extraen del hospedante y se estimulan *ex vivo* con el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones para generar linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T citotóxicos se pueden administrar al hospedante con el fin de mejorar la respuesta inmune al cáncer, inhibiendo de este modo el cáncer. Por consiguiente, los linfocitos de la invención se estimulan *ex vivo* con el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones para generar linfocitos T citotóxicos, y (c) administrar linfocitos T citotóxicos al hospedante, en donde se inhibe el cáncer.

En otra realización, los linfocitos dentro del hospedante se estimulan por administración al hospedante del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones para generar linfocitos T citotóxicos, en donde los linfocitos T citotóxicos mejoran una respuesta inmune al cáncer, inhibiendo de este modo el cáncer.

La invención incluye un protocolo de sensibilización y refuerzo. En particular, el protocolo incluye una "sensibilización" inicial con una composición que comprende uno o más vectores recombinantes que codifican el péptido inventivo y opcionalmente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos, seguida de uno o preferiblemente múltiples "refuerzos" con una composición que contiene el péptido inventivo o uno o más vectores del virus de la viruela codifican el péptido inventivo y opcionalmente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos.

La vacuna de sensibilización inicial puede comprender uno o más vectores. En una realización, se utiliza un solo vector (p. ej., vector del virus de la viruela) para administrar el péptido inventivo y una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos. En otra realización, dos o más vectores (p. ej., vectores del virus de la viruela) comprenden la vacuna de sensibilización, que se administran simultáneamente en una sola inyección.

Las vacunas de refuerzo también pueden comprender uno o más vectores (p. ej., vectores del virus de la viruela). En una realización, se utiliza un solo vector para administrar el péptido inventivo y una o más de las moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos de las vacunas de refuerzo. En otra realización, dos o más vectores comprenden la vacuna de refuerzo, que se administran simultáneamente en una sola inyección.

Se pueden emplear distintos vectores (p. ej., vectores del virus de la viruela) para proveer un protocolo de sensibilización/refuerzo heterólogo usando vectores que porten diferentes conjuntos de moléculas terapéuticas para inoculaciones en diferentes intervalos de tiempo. Por ejemplo, en una combinación de sensibilización/refuerzo

heteróloga, se usa una primera composición del vector del virus orthopox para sensibilizar y una segunda composición del vector del virus de la viruela aviar para el refuerzo.

El esquema de administración de los vectores (p. ej., vectores del virus de la viruela) por lo general implica la administración repetida del vector de refuerzo. El vector de refuerzo se puede administrar 1-3 veces (p. ej., 1, 2 o 3 veces) en cualquier periodo de tiempo adecuado (p. ej., cada 2-4 semanas) durante cualquier longitud de tiempo adecuada (p. ej., 6-12 semanas por un total de por lo menos 5-15 vacunas de refuerzo). Por ejemplo, la vacuna primaria puede comprender una vacuna recombinante o un vector MVA seguida de múltiples vacunas de refuerzo con un vector de viruela aviar. En una realización particular, el hospedante recibe una vacuna con el vector de sensibilización, seguida cada 2 semanas con el vector de refuerzo durante 6 semanas, seguido cada 4 semanas con el vector de refuerzo y continuando con el vector de refuerzo por un periodo de tiempo que dependerá de la progresión de la enfermedad.

La invención da a conocer también un kit que contiene por lo menos un primer vector recombinante (p. ej., vector del virus de la viruela) que ha incorporado en su genoma o porción del mismo un ácido nucleico que codifica el péptido inventivo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El primer vector recombinante (p. ej., vectores del virus de la viruela) también puede comprender uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos. Además del primer vector recombinante, el kit puede tener un segundo vector recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados con tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El kit provee además recipientes, agujas para inyección e instrucciones de cómo usar el kit. En otra realización, el kit provee además un adyuvante tal como GM-CSF y/o instrucciones para uso de un adyuvante comercialmente disponible con los componentes del kit.

El péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se pueden administrar a un hospedante por diversas rutas que incluyen, aunque sin limitarse a ello, subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa e intratumoral. Cuando tienen lugar múltiples administraciones, estas pueden ser en uno o más sitios en un hospedante.

La administración del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones puede ser "profiláctica" o "terapéutica." Cuando es profiláctica, el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se provee antes de la formación de un tumor para permitir que el sistema inmune del hospedante luche contra un tumor al que el hospedante tiene susceptibilidad de desarrollar. Por ejemplo, los hospedantes con susceptibilidad hereditaria al cáncer son un grupo preferido de pacientes tratados con dicha inmunización profiláctica. La administración terapéutica del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones previene, palia o demora el cáncer que expresa MUC1. Cuando se provee en forma terapéutica, el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se proveen durante o después del diagnóstico del cáncer que expresa MUC1.

Cuando el hospedante ya ha sido diagnosticado con el cáncer que expresa MUC1, el péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se pueden administrar con otros tratamientos terapéuticos como quimioterapia o radioterapia.

En una realización preferida, la administración del péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones a un hospedante resulta en una célula del hospedante que expresa el péptido inventivo y opcionalmente una o más moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos que fueron administrados conjuntamente. El péptido inventivo (es decir, antígeno de MUC1) se puede expresar en la superficie celular de la célula hospedante infectada. Una o más de las moléculas inmunoestimuladoras/reguladoras y/u otros antígenos asociados a tumores (p. ej., CEA), sus versiones modificadas y sus epítopos inmunogénicos se pueden expresar en la superficie celular o pueden ser segregados activamente por la célula hospedante. La expresión del antígeno de MUC1 y de la molécula inmunoestimuladora/reguladora proporciona el péptido restringido de MHC necesario a las células T específicas y la señal apropiada a las células T para ayudar en el reconocimiento de antígenos y la proliferación o expansión clonal de las células T específicas de antígenos. El resultado general es un aumento de la regulación del sistema inmune. Preferiblemente, el aumento de la regulación de la respuesta inmune es un incremento en los linfocitos T cooperadores específicos y/o los linfocitos citotóxicos, capaces de inactivar o inhibir el desarrollo de una célula de cáncer (p. ej., cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de próstata).

Existe una diversidad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica para los métodos inventivos. Las siguientes formulaciones para administración parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal son ilustrativas y no son limitativas en modo alguno. El experto en la técnica apreciará que estas rutas de administración del péptido, ácido nucleico, vector, célula o composición de la invención se conocen, y aunque se

puede emplear más de una ruta para administrar un compuesto particular, una ruta particular puede proporcionar una repuesta más inmediata y más eficaz que otra.

Las formulaciones inyectables están entre aquellas formulaciones preferidas de acuerdo con la presente invención. Los expertos en la técnica conocen los requerimientos para vehículos farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables (véanse, p. ej., Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker and Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4ta ed., páginas 622-630 (1986)).

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas y no acuosas, isotónicas, estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que tornan la formulación isotónica con la sangre del receptor a la que está destinada, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes. El péptido, ácido nucleico, vector, célula o una de sus composiciones se pueden administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, como un líquido o mezcla de líquidos estériles, incluidos agua, disolución salina, dextrosa acuosa y disoluciones azucaradas relacionadas, un alcohol, como etanol, isopropanol o glicoles de alcohol hexadecílico, como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol cetales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres como poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un glicérido o éster de ácido graso o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, como un jabón o detergente, agente de suspensión como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que se pueden utilizar en formulaciones parenterales, incluyen aceites de petróleo, animales, vegetables y sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen aceite de cacahuete, soja, sésamo, algodón, maíz, oliva, vaselina y aceites minerales. Los ácidos grasos adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. Etil oleato e isopropil miristato son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos como por ejemplo haluros de dimetil dialquil amonio y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfonatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietileno-propileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-b-aminopropionatos y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina y (e) mezclas de estos.

Se pueden emplear conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones por lo general oscila entre aproximadamente 5% y aproximadamente 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácido graso de polietileno sorbitán, como sorbitán monooleato y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados de una sola dosis o de múltiples dosis, como ampollas y viales, y se pueden conservar en un estado liofilizado que requiere solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos.

Los siguientes ejemplos ilustran en más detalle la invención pero, desde ya, no deben interpretarse como limitativos de su alcance en modo alguno.

Ejemplo 1

Se emplearon los siguientes materiales y métodos para los experimentos que se analizan en los Ejemplos 2-5.

Cultivos celulares La línea celular de adenocarcinoma de mama humano de MCF-7 (HLA-A2$^+$/MUC1$^+$), la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano CF-PAC-1 (HLA-A2$^+$/MUC1$^+$), la línea celular de melanoma SK-Mel-24 (HLA-A2$^+$/MUC1$^-$) y la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano ASPC-1 (HLA-A2$^-$/MUC1$^+$) se adquirieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantuvieron en medio completo DMEM (Mediatech, Inc., Manassas, VA) enriquecido con 10% suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 0,5 µg/ml anfotericina B (Mediatech, Inc.) y 0,01 µg/ml de insulina recombinante humana (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Todos los cultivos estuvieron libres de *Mycoplasma*. La línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 (Anderson et al., J. Immunol., 151: 3407-3419 (1993)) que expresa HLA-A*0201 (K562/A*0201) (Storkus et al., J. Immunol., 138: 1657-1659 (1987)) se obtuvo de C. Britten (Johannes Gutenberg University of Mainz, Mainz, Alemania) y se cultivó en medio completo RPMI-1640 con 10%

suero bovino fetal inactivado por calor, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 0,5 µg/ml y 0,7 mg/ml G418. El mutante de eliminación del transporte de la línea celular 174CEM-T2 (T2) (Hogan et al., J. Exp. Med., 168: 725-736 (1988)) fue provisto por el Dr. Peter Cresswell (Yale University School of Medicine, New Haven, CT). Las células C1R-A2 y las células T2 estuvieron libres de *Mycoplasma* y se mantuvieron en medio completo RPMI-1640 y medio completo de Dulbecco modificado por Iscove (Mediatech, Inc.), respectivamente.

Péptidos Se exploró la secuencia de aminoácidos de MUC1- C para compatibilidades con los motivos de consenso para unión a HLA-A2 usando el algoritmo de ordenador de BioInformatics and Molecule Analysis Section of NIH (Parker et al., J. Immunol., 152: 163-175 (1994)), que clasifica potenciales péptidos de unión a MHC de acuerdo con la mitad del tiempo de disociación predictiva de los complejos de péptido/MHC. American Peptide Company (Sunnyvale, CA) sintetizó siete péptidos 9-mer o 10-mer y sus análogos a partir de MUC1-C. La pureza de los péptidos fue >90%.

Análisis citométrico de flujo El análisis citométrico de flujo de un solo color fue descrito anteriormente en Guadagni et al., Cancer Res., 50: 6248-6255 (1990). En síntesis, se lavaron las células 3 veces con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) fría de Dulbecco libre de $Ca2^+$ y $Mg2^+$ y luego se tiñeron durante 1 h a 4°C usando anticuerpos monoclonales conjugados a FITC anti-HLA-A2,28 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA), anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 (BD Biosciences, San Jose, CA). Se usó IgG2a de ratón, k FITC (BD Biosciences) como control de isotipo. Las células luego se lavaron 3 veces con PBS fría libre de $Ca2^+$ y $Mg2^+$, se resuspendieron en el mismo tampón y se analizaron de inmediato usando un software FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y CellQuest (BD Biosciences). Los resultados se generaron a partir de datos recopilados de 10.000 células vivas y se expresaron como porcentaje de células positivas e intensidad media de fluorescencia (MFI). El valor MFI se compiló en una escala logarítmica y se usó para expresar niveles de fluorescencia determinados midiendo el promedio de todas las células en el diagrama de puntos de fluorescencia.

El procedimiento para análisis citométrico de flujo de dos colores fue similar a aquel para el análisis de un solo color las siguientes excepciones. Las células dendríticas se analizaron usando las siguientes combinaciones de anticuerpos: anti-MHC clase II FITC/anti-CD11c APC; anti-clase I FITC/anti-CD80 ficoerirtrina (PE); anti-clase I FITC/anti-CD83 PE; anti-clase I FITC/anti-CD86 PE; anti-clase I FITC/anti-clase II PE; anti-clase I FITC/anti-CD58 PE; anti-clase I FITC/anti-CD54 PE. IgG1 de ratón, k FITC, IgG1 ratón, k PE y IgG2a de ratón, k Se usaron FITC como controlos de isotipos; > 96% de las DC fueron $CD11c^+$ y MHC de clase II^+. Los anticuerpos a MHC de clase II se adquirieron de Serotec (Oxford, Reino Unido) y otros anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences.

Péptido de unión a HLA-A2 La unión de P1172, P1177, P1240 y sus análogos a moléculas de HLA-A2 se evaluó por aumento de regulación de expresión de HLA-A2 sobre las células T2A2, según lo demostrado por citometría de flujo (Nijman et al., Eur. J. Immunol., 23: 1215-1219 (1993)).

Cultivo de DC de PBMC Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada de pacientes con $HLA\text{-}A2^+$ inscritos en el ensayo clínico PANVAC-VF. Las PBMC se separaron usando gradiente de medio de separación de linfocitos (MP Biomedicals, Aurora, OH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boyum, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Supl., 97: 51-76 (1968)). Las DC se prepararon a partir de PBMC, según lo descrito en Sallusto et al., J. Exp. Med., 179: 1109-1118 (1994)).

Generación de líneas de células T Se generaron CTL específicos de MUC1-C por una modificación del protocolo descrito por Tsang et al., J. Natl. Cancer Inst., 87: 982-990 (1995). Se generaron líneas de células T específicas de P1172, P1172(1Y), P1177 y P1177(10V) a partir de 2 pacientes con carcinoma de colon vacunados con la vacuna basada en MUC1 -CEA. Se generaron líneas de células T específicas de P1240 y P1240(1Y) a partir de un paciente con carcinoma de ovario y un paciente con carcinoma de mama que también recibieron la vacuna basada en MUC 1-CEA. CD40L o DC autólogas maduras con levadura, que se generaron como se describió previamente, se usaron como células presentadoras de antígenos (APC). Las PBMC obtenidas el día 70 post-vacunación se añadieron a las APC y se pulsaron con 12,5 µg/ml del correspondiente péptido en una relación efectora:APC de 10:1. Las DC autólogas se usaron como APC para 3 ciclos de estimulación *in vitro* (IVS). Se usaron células B transformadas con EBV autólogas irradiadas (23.000 rad) como APC después del tercer ciclo de IVS. Para re-estimulación con células B transformadas con EBV, se usaron péptidos a una concentración de 12,5 µg/ml para pulsar las células B transformadas con EBV autólogas en una relación efectora:APC de 1:3. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO_2. Los cultivos se enriquecieron luego con IL-2 humana recombinante en una concentración de 20 U/ml durante 7 días; el medio que contenía IL-2 se reabasteció cada 3 días. La incubación de 3 días con péptido y 7 días con suplemento de IL-2 constituyó un ciclo de IVS.

Tinción de tetrámero Se prepararon tetrámero de estreptavidina- P1172(1Y) marcado con /HLA-A*0201, tetrámero de P1177(10V) marcado con PE/HLA-A*0201, tetrámero P1240 marcado con PE/HLA-A*0201 y tetrámero P1240(1Y) marcado con PE/HLA-A*0201 por Tetramer Core Facility (Atlanta, GA). VIH gag marcado con PE (SEC. ID. NÚM: 25)/tetrámero HLA-A*0201 se obtuvo de Beckman Coulter (Fullerton, CA) y se usó como control negativo. Se tiñeron PBMC (1×10^6) con 1 µl de tetrámero y anticuerpo anti-CD8-FITC (BD Biosciences) durante 30 min a

temperatura ambiente en la oscuridad, se lavaron dos veces con tampón FACS y se analizaron usando los softwares FACScan y CellQuest. Los resultados se generaron a partir de los datos compilados de 100.000 células.

Ensayo citotóxico Se marcaron células diana con 50 µCi de oxiquinolina marcada con ^{111}In (Medi-Physics Inc., Arlington, IL) durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadieron células diana (3 x 10^3) en 100 µl de medio completo RPMI-1640 a cada uno de los 96 pocillos de las placas de ensayo de fondo plano. Las células efectoras se suspendieron en 100 µl de medio completo RPMI-1640 enriquecido con 10% suero AB humano combinado y se añadieron a las células diana. Las placas luego se incubaron a 37°C en 5% CO_2 durante 4 o 16 h. Se cosechó el sobrenadante para recuento gamma con el uso de marcos cosechadores (Skatron, Inc., Sterling, VA). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado, y se calcularon las desviaciones estándar. Se calculó la lisis específica de acuerdo con la fórmula (todos los valores en cpm):

$$\% \text{ lisis} = \frac{\text{Liberación observada - liberación espontánea}}{\text{Liberación total - liberación espontánea}} \text{ x } 100$$

La liberación espontánea se determinó a partir de los pocillos a los que se les añadieron 100 µl de medio completo RPMI-1640. La radiactividad liberable total se obtuvo después del tratamiento de las dianas con 2,5% Triton X-100.

Detección de citocinas Sobrenadantes de células T estimuladas durante 24 horas con DC autólogas pulsadas con péptido o células B transformadas con EBV autólogas en un medio libre de IL-2 en diversas concentraciones de péptido se estudiaron para segregación de IFN-γ por kit de ELISA (BioSource International, Camarillo, CA). Los resultados se expresan en pg/ml.

Análisis estadístico Se calculó la significación estadística usando una prueba de la T de Student de 2 colas y el software StatView (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la determinación de epítopos CTL de la subunidad MUC1-C y sus análogos.

La secuencia de aminoácidos primaria de la subunidad MUC1-C (correspondiente a los residuos 1098 a 1254 de la secuencia MUC1) se analizó para los motivos de consenso para los péptidos de unión a HLA-A2. Se identificaron y sintetizaron dos péptidos 10-mer (designados P1172 y P1177) y un péptido 9-mer (designado P1240) se (ver Tabla 1). Se generaron tres análogos de epítopos naturales P1172, P1177 y P1240 (P1172(1Y), P1177(10V) y P1240(1Y), respectivamente) por sustitución de un solo aminoácido en los residuos de aminoácidos de las posiciones 1 y 10. Cada uno de los análogos tuvo una afinidad pronosticada superior para las moléculas de HLA-A2 que los correspondientes epítopos naturales.

Un péptido con una afinidad superior hacia las moléculas de HLA-A2 (NGEP P703) (Cereda et al., Cancer Immunol. Immunother., 59: 63-71 (2010)) y un péptido de HLA-A3 específico (CAP-7) se usaron en los ensayos como controles positivo y negativo, respectivamente.

Tabla 1. Unión de péptidos de MUC1 a moléculas de HLA-A2.

Péptido*	Secuencia de aminoácidos	SEC. ID. NÚM:	Posición del aminoácido en MUC1	Unión T2#
P1172	ALAIVYLIAL	1	1172-1181	248,6
P1172(1Y)	YLAIVYLIAL	2	1172-1181	245,1
P1177	YLIALAVCQC	4	1177-1186	211,2
P1177(10V)	YLIALAVCQ**V**	5	1177-1186	299,1
P1240	SLSYTNPAV	7	1240-1248	325,8
P1240(1Y)	**Y**LSYTNPAV	8	1240-1248	342,1

Péptido*	Secuencia de aminoácidos	SEC. ID. NÚM:	Posición del aminoácido en MUC1	Unión T2[#]
NGEP (P703) (control positivo)	GLFDEYLEMV	16	NA	481,93
CAP-7 (control negativo)	HLFGYSWYK	17	NA	109,1

*Los péptidos se usaron en una concentración de 12,5 µg/ml.

[#]Resultados expresados como intensidad media de fluorescencia (MFI).

El péptido NGEP (P703) es un péptido de unión a HLA-A2.

El péptido CAP-7 es un péptido de CEA de unión a HLA-A3

P1177, P1172 y P1240 demostraron una mayor afinidad hacia moléculas de HLA-A2 que el control negativo. Los péptidos análogos P1177(10V) y P1240(1Y) demostraron una mayor afinidad hacia moléculas de HLA-A2 que los correspondientes péptidos naturales P1177 y P1240.

La estabilidad de los complejos de péptido/HLA-A2 de los análogos y péptidos naturales se analizaron determinando el porcentaje de los complejos restantes en las moléculas de HLA-A2 en diferentes puntos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8 y 10 h). El péptido análogo P1177(10V) demostró una avidez superior para las moléculas de clase I que el péptido natural P1177 en cada punto de tiempo. No se observaron diferencias entre P1172(1Y) y P1172, y P1240(1Y) y P1240 en términos de mitad del tiempo de disociación.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la caracterización adicional de los epítopos de CTL de la subunidad MUC1-C y sus análogos.

La inmunogenicidad de P1172, P1177, P1240 y sus correspondientes análogos se investigó en más detalle evaluando su capacidad de generar CTL específicas *in vitro.* Las PBMC de un paciente con carcinoma de colon (paciente 1) y un paciente con cáncer de mama (paciente 2) vacunados con vacunas recombinantes-CEA-MUCl-TRICOM y viruela recombinante -CEA-MUCl-TRICOM se usaron para establecer líneas de células $CD8^+$ específicas contras estos péptidos naturales y agonistas de MUC1-C. Las líneas de células T generadas usando P1172, P1172(1Y), P1177 y P1177(10V) del paciente 1 se denominaron T-1-P1172, T-1-1172(1Y), T-1-P1177 y T-1-P1177(10V), respectivamente. Las líneas de células T del paciente 2 que usan P1240 y P1240(1Y) se denominaron T-2-P1240 y T-2-P 1240(1Y), respectivamente.

Para evaluar la especificidad de estas líneas de células T, se efectuó un ensayo de liberación de IFN-γ usando células B autólogas irradiadas pulsadas con el péptido correspondiente. Se estimularon las células T con células B autólogas irradiadas con el correspondiente péptido e una relación APC:célula T de 2:1. Las células T se usaron a una concentración de $5x10^5$/ml. Se recogieron los sobrenadantes de un cultivo de 24 horas y se estudió la segregación de IFN-γ. Las líneas celulares T-1-PI172(1Y), T-1-P1177(10V) y T-2-P1240(1Y) produjeron niveles superiores de IFN-γ en comparación con las líneas de células T generadas usando los correspondientes péptidos naturales (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de IFN-γ por líneas de células T específicas de MUC1-C estimuladas con células B pulsadas por péptidos.

Línea de células T	Péptido	IFN-γ (pg/ml)
T-1-P1172	P1172	158,3
T-1-P1172(1Y)	P1172(1Y)	605,0
T-1-P177	P1177	666,4

Línea de células T	Péptido	IFN-γ (pg/ml)
T-1-P1177(10V)	P1177(10V)	>1.000
T-4-P1240	P1240	437,3
T-4-P1240(1Y)	P1240(1Y)	>1.000

Se realizaron luego estudios para comparar la capacidad de los péptidos naturales y de los péptidos agonistas, en distintas concentraciones, de activar las células T específicas del péptido agonista. En cada concentración de péptido, la pulsación de las APC con los péptidos agonistas P1172(1Y), P1177(10V) y P1240(1Y) condujo a un mayor nivel de producción de IFN-γ por parte de la línea de células T específica del péptido agonista, en comparación con los péptidos naturales P1172, P1177 y P1240 (ver Fig. 1 A-C).

Se estableció luego una línea de células T adicional a partir de las PBMC de otro paciente (paciente 3) con cáncer de colon del mismo ensayo clínico descrito previamente, usando P1177 y P1177(10V), denominados T-3-P1177 y T-3-P1177(10V), respectivamente. T-3-P1177(10V) produjo niveles superiores de IFN-γ a T-3-P1177 (> 1.000 pg/ml frente a 456 pg/ml).

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la inmunogenicidad de los epítopos de MUC1 CTL y los péptidos análogos mejoradores en pacientes con cáncer.

La frecuencia de las células $CD8^+$ T específicas de MUC1-C en las líneas de células T T-1-P1172, T-1-1172(1Y), T-1-P1177, T-1-P1177(10V), T-2-P1240 y T-2-P1240(1Y) se investigó usando tetrámero P1172(1Y)/HLA-A*0201, tetrámero P1177(10V)/HLA-A*0201, tetrámero P1240(1Y)/HLA-A*0201 y anticuerpo anti-CD8. Se generó una frecuencia mayor de células $CD8^+$ T específicas de MUC1-C en las líneas de células T específicas de epítopos agonistas T-1-P1172(1Y), T-3-P1177(10V) y T-2-P1240(1Y), en comparación con las líneas de células T que usan el correspondiente péptido natural (6,38% frente a 1,53%, 6,18% frente a 3,53% y 6,6% frente a 1,6%, respectivamente).

Estas líneas de células T se ensayaron luego para actividad citotóxica contra una línea celular de carcinoma de mama $MUC1^+$/$HLA\text{-}A2^+$ (MCF-7) y una línea celular de cáncer pancreático $MUC1^+$/$HLA\text{-}A2^+$ (CF-PAC-1). Se usaron una línea celular de melanoma $MUC1^-$/$HLA\text{-}A2^+$ (SK-MEL-24) y una línea celular de cáncer de páncreas $MUC1^+$/$HLA\text{-}A2^-$ (ASPC-1) como controles negativos. La expresión de HLA-A2 y MUC1-C de estas líneas celulares de tumores se evaluó por citometría de flujo (ver la Tabla 3).

Tabla 3. Expresión de MUC1 y HLA-A2 en líneas celulares de tumores humanos establecidos.

Líneas celulares de tumores	Expresión de MUC1*	Expresión de HLA-A2*
MCF-1	48,4 (363,8)	85,9 (36,8)
CF-PAC-1	75,6 (120,7)	99,9 (192,3)
ASPC-1	56,6 (86,7)	Negativa
SK-MEL-24	2,9 (100,7)	99,7 (466,6)
*Valores expresados como porcentaje de células positivas (MFI).		

Se llevó a cabo un ensayo de liberación de ^{111}In de 16 horas usando líneas celulares de células T específicas del epítopo MUC1-C. Se lisaron células MCF-7 por la línea de células T específicas del epítopo agonista hasta un grado mayor que la línea de células T específica del correspondiente epítopo natural. Tal como estaba previsto, no se observó lisis contra las células SK-MEL-24 (ver Tabla 4).

Tabla 4. Lisis de células de tumores $MUC1^+$ por líneas de células T agonistas de MUC1-C y líneas de células T generadas con epítopos naturales.

Línea de células T	Relación E:T	MCF-7 (HLA-A2$^+$/MUC-1$^+$)$^{\#}$	SK-MEL (HLA-A2$^+$/MUC-1$^-$)$^{\#}$
T-1-P1172	50:1	26,4 (2,72)	8,0 (2,1)
	25:1	3,9 (1,78)	ND
T-1-P1172(1Y)	50:1	40,7 (10,5)*	0
	25:1	25,5 (3,40)*	ND
T-1-P177	50:1	53,6 (6,34)	4,6 (0,86)
	25:1	38,5 (0,69)	ND
T-1-P1177(10V)	50:1	54,4 (2,98)	0
	25:1	46,2 (3,22)*	ND
T-4-P1240	50:1	9,2 (1,11)	ND
	25:1	8,4 (0,21)	0,8 (0,12)
T-4-P 1240(1Y)	50:1	25,9 (2,1)*	ND
	25:1	20,8 (1,52)*	1,3 (0,47)

*p<0,01 por la prueba de la t del agonista frente a los epítopos naturales. $^{\#}$Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica (desviación estándar). ND = no realizado

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la especificidad y la restricción de HLA-A2 para citólisis de CTL en las líneas de células T generadas usando los péptidos inventivos.

Se seleccionaron células T-1-P1177(10V) y T-2-P1240(1Y) puesto que las líneas celulares produjeron altos niveles de IFN-γ, un alto porcentaje de células $^+$ T de tetrámeros y mayor inactivación de células tumorales.

Para confirmar la especificidad y la restricción de HLA-A2 para citólisis de CTL, se usaron células T-1-P1177(10V) y T-2-P1240(1Y) en un ensayo de inhibición de la diana en frío, con células CF-PAC-1 como dianas. Se emplearon células CF-PAC-1 marcadas con ^{111}In y células K562/A2.1 no marcadas a 1:10. Las células K562/A2.1 se incubaron durante 2 horas con o sin péptido (25 µg/ml).

La adición de células K562/A2.1 no marcadas pulsadas con los péptidos P1177(10V) y P1240(1Y) disminuyó la actividad de CTL de las células T-1-P1177(10V) y T-2-P1240(1Y) contra los controles CF-PAC-1 de 21,1% a 4,0% de lisis, y de 13,5% a 1,7% de lisis, respectivamente, en una relación 25:1 efectora:diana (Tabla 5).

Tabla 5. Inhibición de lisis de CF-PAC-1 por líneas de células T específicas de MUC1-C.

Células diana	Célula T específica del agonista MUC1-C (T-4-1777-10V)[#]
CF-PAC-1	21,2 (5,2)
CF-PAC-1 + K562/A2.1	16,9 (0,8)
CF-PAC-1 + K562/A2.1 + P1177(10V)	4,0 (1,5)*
Célula diana	Célula T específica del agonista MUC1-C (T-4-1240-1Y)[#]
CF-PAC-1	13,5 (5,1)
CF-PAC-1 + K562/A2.1	11,9 (2,3)
CF-PAC-1 + K562/A2.1 + P1240(1Y)	1,7 (1,2)*
*p<0,01 por la prueba de la t de lisis con o sin péptido. [#] Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica en una relación 25:1 E:T (SD).	

Se realizaron experimentos de bloqueo de anticuerpos para determinar si la lisis estaba restringida por HLA-A2. En un ensayo de liberación de ^{111}In de 16 horas, se incubaron células CF-PAC-1 durante 1 hora en medio que no contenía anticuerpo, UPC-10 (10 µg/ml) o anti-HLA-A2 (10 µg/ml). Se demostró que la actividad de CTL de T-1-P1177(10V) y T-2-P1240(1Y) contra las células CF-PAC-1 está restringida por HLA-A2, como se indica mediante la inhibición de la lisis con el anticuerpo anti-HLA-A2 pero no con el anticuerpo control UPC-10 (Tabla 6).

Tabla 6. Inhibición específica de HLA-A2 de lisis de células tumorales por líneas de células T.

Tratamiento de T-4-P1177(10V)	Lisis[#]
Ninguno	23,4 (1,9)
Anti-HLA-A2	7,4 (1,7)*
UPC-10 (control negativo)	20,8 (3,1)
Tratamiento de T-4-P1240(lY)	Lisis[#]
Ninguno	16,6 (1,2)
Anti-HLA-A2	5,6 (2,0)*
UPC-10 (control negativo)	13,6 (1,5)
*p<0,01 por prueba de la t de lisis con o sin péptido. [#]Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica en una relación 25:1 E:T (SD).	

Estos resultados demostraron que las células T específicas de MUC1-C generadas usando células de tumores de lisis de epítopos agonistas expresan de forma endógena MUC-1 nativo en un modo específico de antígenos y restringido por HLA-A2.

Ejemplo 6

Se usaron los siguientes materiales y métodos para los experimentos analizados en los Ejemplos 7-9.

Pacientes Se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer de ovario en un ensayo clínico previamente descrito de una vacuna vírica basada en CEA y MUC1 (PANVAC-V/F) (Gulley et al., Clin. Cancer Res., 14: 3060-3069 (2008)). PANVAC consiste en vectores de vaccinia recombinante V) y viruela aviar (F) que expresan CEA, MUC1 y tres moléculas co-estimuladoras (B7.1, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y el antígeno asociado a la función de los linfocitos 3 (LFA-3)). Se administró con vaccinia como sensibilización, y viruela aviar como inyecciones de refuerzo semana por medio durante el primer mes y mensualmente de allí en más.

Las PBMC de un donante sano de HLA-A3$^+$ se usaron como una población de referencia donde se indica. Un comité de revisión institucional del Centro Clínico de los National Institutes of Health había aprobado el procedimiento, y se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Cultivos celulares Se adquirieron la línea celular de carcinoma de ovario humano SKOV3 (HLA-A3$^+$ y MUC1$^+$) y las líneas celulares de carcinoma pancreático CFPAC1 (HLA-A3$^+$ y MUC1$^+$) y ASPC-1 (HLA-A3$^+$ y MUC1$^-$) de American Type Culture Collection (Manassas, VA). Todos los cultivos celulares estaban libres de micoplasma y se mantuvieron en medio completo (RPMI 1640 enriquecido con 10% suero de ternero fetal, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y L-glutamina 2mM) (Mediatech, Herndon, VA). Se transfectaron células C1RA3 y K562-A3: C1R (obsequio del Dr. WE Biddison (NINDS, NIH, Bethesda, MD)) y K562 (ATCC) con un vector HLA-A3 para expresar HLA-A3 por NCI-Fredrick Eukaryotic Expression Group (Frederick, MD). Se mantuvieron en medio RPMI completo enriquecido con 0,2 mg/ml de G-418 (Mediatech).

Péptidos La secuencia de aminoácidos MUC1-C se exploró para compatibilidades con los motivos de consenso para los péptidos de unión a HLA-A3, usando el algoritmo de ordenador desarrollado por Parker et al. para clasificar los potenciales péptidos de unión a MHC de conformidad con la mitad del tiempo de disociación pronosticada de los complejos de péptido/MHC (Parker et al., J. Immunol., 152: 163-175 (1994)). American Peptide Company (Sunnyvale, CA) sintetizó siete análogos de péptidos 9-mer o 10-mer a partir de MUC1-C con sustituciones de aminoácidos a fin de aumentar la afinidad de unión. La pureza de los péptidos fue >90%.

Cultivo de células dendríticas de PBMC Se obtuvo sangre periférica de pacientes, y las PBMC se aislaron por centrifugación en un gradiente de densidad (Medio de separación de linfocitos, ICN Biochemicals, Aurora, VA). Se generaron células dendríticas (DC) usando una modificación del procedimiento previamente descrito (Yokokawa et al., Int. J. Cancer, 121: 595-605 (2007)). Se desarrollaron las DC en medio AIM-V que contenía 100 ng/ml GM-CSF y 20 ng/ml IL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Después de 5 días en cultivo, las DC se maduraron por adición de 1 µg/ml de CD40L y 1 µg/ml de potenciador (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) durante 24 horas. O bien se utilizaron inmediatamente para la primera estimulación *in vitro* de las PBMC (IVS1), o se congelaron en alícuotas para uso futuro.

Generación de líneas de células T Se usó una versión modificada del protocolo descrito por Tsang et al., J. Nat. Cancer Inst., 87: 982-990 (1995) para generar linfocitos T citotóxicos específicos de MUC1-C. Se pulsaron DC autólogas irradiadas con 12,5 µg/ml de péptido durante 2 h y luego las PBMC se añadieron en una relación 10:1. Después de 3 días, se añadió IL-2 humana (20 células, unidades/ml). Las células se volvieron a estimular cada 7 días. Después de la tercera estimulación *in vitro* (IVS), las células volvieron a ser estimuladas usando células B autólogas transformadas por el virus de Epstein-Barr como células presentadoras de antígenos, en una relación de 3:1.

Citometría de flujo Se efectuó un análisis citométrico de flujo (FACS) como se describió previamente (Yokokawa et al., *supra).* En síntesis, el anticuerpo GAP-A3 con un anticuerpo conjugado a FITC secundario anti-humano de cabra se usó para HLA-A3, y el anticuerpo DF3 se usó para MUC-1 extracelular. Se efectuó un análisis FACS de cuatro colores en las líneas de células T, tiñendo durante 40 minutos a 4°C con CD8-PE, CD45RA-PECy7, CD62L-FITC y CXCR3-APC (BD Biosciences, San Jose, CA). Se adquirieron 1x10^5 células en LSRII (BD), y los datos se analizaron usando el software FlowJo 9.0.1 (Tree Star Inc, Ashland, OR). Se usaron los controles de isotopos apropiados, y las células muertas se excluyeron del análisis.

Tinción de tetrámeros Se prepararon tetrámeros HLA-A3-P432-3F10K y HLA-A3-P483-2L3F marcados con ficoeritrina (PE) por NIH Tetramer Core Facility (Atlanta, GA), y el tetrámero negativo humano de clase I MHC marcado con PE (Kit núm. T01044) se obtuvo de Beckman Coulter Inc (Sykesville, MD). El tetrámero negativo no tiene especificidad conocida y no se une a las células CD8$^+$ T humanas de ningún alelo de HLA. Los tetrámeros se usaron en una dilución 1:100, y las células se tiñeron durante 45 minutos a 4°C. Se adquirieron 1x10^5 células en LSRII (BD), y los datos se analizaron usando el software FlowJo 9.0.1 (Tree Star Inc, Ashland, OR).

Ensayo de citotoxicidad y ensayo de inhibición de dianas en frío Para determinar la inactivación mediada por las células T, se empleó un ensayo de liberación de ^{111}Indio de 16 horas (Tsang et al., *supra).* Se marcaron

$2x10^6$ células diana con 60µCi óxido de ^{111}In (GE Health care, Viena, VA) a 37°C por 20 minutos, y se usó a 3000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo redondo. Se añadieron células T en diferentes relaciones. Todos los ensayos se realizaron en medio RPMI sustituido con 10% suero bovino fetal, glutamina y antibiótico (Mediatech, Manassas, VA). La liberación espontánea se determinó incubando las células diana con medio solo, y la lisis completa por incubación con 2,5% Triton X-100. La lisis se calculó usando la fórmula (todos los valores en cpm):

$$\% \text{ lisis} = \frac{\text{Liberacion observada (cpm) - liberación espontánea}}{\text{Liberación completa (cpm) - liberación espontánea}} \times 100$$

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la diana en frío añadiendo células K562-A3 o células K562-A3 pulsadas por péptido en una relación de 1:10 a los pocillos (Yokokawa et al., *supra).*

Detección de citocinas 2 ,$2x10^6$ células Ty $5,5x10^6$ células B autólogas pulsadas con el péptido P432-3F10K o P483-2L3F se incubaron durante 24 h en 5 ml de medio por pocillo. Los sobrenadantes se analizaron por tecnología Multi-array (Meso Scale Diagnostics, Gaitersburg, MD) para detección de citocinas.

Ensayo ELISPOT La medición de respuestas inmunes de CD8 en pacientes con HLA-$A3^+$ se efectuó a través del ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISPOT) usando una modificación del procedimiento descrito en Arlen et al., Cancer Immunol. Immunother., 49: 517-529 (2000). El ensayo se realizó usando células K562-A3 como las APC. ELISPOT mide la frecuencia con que las células T liberan IFNγ en respuesta a la estimulación con un péptido. Se usaron P432-3F10K, P483-2L3F, ningún péptido o un péptido de VIH gag (SEC. ID. NÚM: 25; un control negativo). Se compararon las PBMC pre y post vacunación de cada paciente. Se calificó una respuesta positiva como un incremento ≥2-en células que segregan IFNy. Las manchas se analizaron usando un contador ImmunoSpot (Cellular Technology Ltd, Shaker Heights, OH).

Análisis estadístico Para evaluación estadística, se usó la prueba de Mann-Whitney no paramétrica entre dos grupos (Software GraphPad, La Jolla, CA). Un valor $P < 0,05$ se consideró significativo.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la determinación de los epítopos de CTL de la subunidad MUC1-C y sus análogos.

La secuencia de aminoácidos de MUC1-C se exploró para compatibilidades con los motivos de consenso para los péptidos de unión a HLA-A3 con el fin de identificar posibles epítopos de células $CD8^+$ T que podrían usarse para inmunoterapia. Dado que la unión pronosticada de los epítopos naturales era baja, se prepararon siete nuevos péptidos con unión pronosticada superior al receptor de células T (ver la Tabla 7).

Tabla 7. Unión de péptidos agonistas y naturales de MUC1-C a la molécula de HLA-A3.

Péptido*	Secuencia	SEC. ID. NÚM:	Posición de aminoácidos en MUC1	Unión pronosticada #
432 natural	ALAIVYLIAL	1	1172	5,4
P432-3F10K	AL**F**IVYLIA**K**	10	1172	900
483 natural	STDRSPYEK	12	1223	3.0
P483-2L3Y	S**LY**RSPYEK	13	1223	300
P483-2L3F	S**LF**RSPYEK	14	1223	300
423 natural	LLVLVCVLVA	18	1163	1,35
P423-6I/1 0K	LLVLV**I**VLV**K**	19	1163	270
P423-10K	LLVLVCVLV**K**	20	1163	180

Péptido*	Secuencia	SEC. ID. NÚM:	Posición de aminoácidos en MUC1	Unión pronosticada #
440 natural	GQLDIFPAR	21	1192	4.00
P440-3F/7I/9K	G**L**LDIFPA**K**	22	1192	200
452 natural	GQLDIFPAR	23	1204	2,43
P452-2L/9K	G**L**LDIFPA**K**	24	1204	405

Estos péptidos se investigaron por su capacidad de generar linfocitos T citotóxicos (CTL). Se generaron CTL por estimulaciones *in vitro* de las PBMC, que luego se utilizaron en un ensayo de toxicidad con células C1RA3 pulsadas por péptidos como dianas. Las líneas celulares generadas con dos péptidos, denominadas T-432-3F10K y T-483-2L3F (correspondientes a P432-3F10K y P483-2L3F, respectivamente), demostraron una activad altamente citotóxica, y estos péptidos se usaron en experimentos subsiguientes.

Para determinar la frecuencia de células $CD8^+$ T específicas de MUC1-C en las líneas de células T generadas con los péptidos P432-3F10K y P483-2L3F, se usó el análisis del tetrámero HLA-A3-P432-3F10K y del tetrámero HLA-A3-P483-2L3F. Después de 6 ciclos IVS, 20% y 16% de las células T se unieron al tetrámero P432-3F10K y al tetrámero P483-2L3F, respectivamente. 0,01% y 0,04% de las células se unieron a un tetrámero negativo.

Para ensayar la capacidad de los péptidos de MUC1-C de inducir la producción de citocinas, líneas de células T específicas de P432-3F10K y P483-2L3F ($1,1 \times 10^6$ células T /ml) de dos pacientes del ensayo clínico de cáncer de ovario PANVAC descritas en el Ejemplo 6 se incubaron durante 24 horas con células B autólogas pulsadas con P432-3F10K o P483-2L3F durante 24 horas. Se evaluaron los niveles de citocina en sobrenadantes de células estimuladas y no estimuladas. Como se expone en la Tabla 8, hubo un incremento en varias citocinas de tipo I después de la estimulación.

Tabla 8. Producción de citocinas por líneas de células T específicas de MUC1-C generadas a partir de pacientes con cáncer de ovario que usan los péptidos P432-3F10K y P483-2L3F.

Paciente	Péptido	IVS	IL-2*	IL-12p70*	IFNγ*	IL-6*	TNFα*
I	P432-3F10K	7	40	5	350	16	180
	P483-2L3F	7	7	5	180	12	46
II	P432-3F10K	8	3	7	50	80	130
	P483-2L3F	8	15	9	2590	150	470
*Valores expresados en pg/ml							

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la capacidad de los péptidos inventivos de inhibir las células cancerosas.

Después de 4 o 6 IVS, las líneas de células T específicas de péptidos de dos pacientes con cáncer se examinaron en un ensayo citotóxico. La línea celular de carcinoma de ovario humano SKOV3, y la línea celular de carcinoma pancreático ASPC-1 se tiñeron con anticuerpos contra HLA-A3 y MUC1 para análisis FACS. SKOV expresó HLA-A3 (99%) y MUC1 (94%), mientras que ASPC-1 fue MUC1 positiva (71%), pero no expresó HLA-A3.

Las líneas celulares de cáncer se incubaron con indio radiactivo (^{111}In), y se usaron en un ensayo de citotoxicidad con las líneas celulares T-432-3F10K y T-483-2L3F específicas. Las células T inactivaron específicamente las células tumorales que expresan MUC1 y HLA-A3, pero no las células que expresan MUC1 sin HLA-A3.

Además, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de dianas en frío con la línea celular de carcinoma pancreático CF-PAC-1 (HLA-A3$^+$ y MUC1$^+$) como una diana, y las células K562-A3 pulsadas por péptidos como dianas frías. Estas células presentan eficientemente péptidos, y cuando se añaden en una relación 1:10 bloquean la lisis de las células tumorales, mientras que las células K562-A3 que no habían sido expuestas a péptido no afectaron la lisis de los tumores cuando se añadieron en la misma concentración (véanse las Fig. 2A-B). La relación célula T:diana fue 25:1.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra la inmunogenicidad de los péptidos inventivos en pacientes con cáncer.

Las PBMC de tres pacientes del ensayo de vacunas clínicas se estimularon durante 2 ciclos de IVS con las células dendríticas autólogas expuestas al péptido P432-3F10K o P483-2L3F, y una semana después de la última estimulación las células se sometieron a análisis FACS después de la tinción con CD8-FITC (20 µl) y o bien P432-3F10K/P483-2L3F-tetrámero-PE (1 µl) o el tetrámero negativo-PC (1 µl) durante 45 minutos.

Como se expone en las Tablas 9 y 10, 20-60% de las células se unieron a los tetrámeros después de 2 estimulaciones. Los resultados de las Tablas 9 y 10 se expresan como la frecuencia de las células tetrámero positivas de todas las células CD8$^+$ T.

Tabla 9. Identificación de células CD8+ T específicas de P432-3F10K con tetrámeros en las PBMC de pacientes con cáncer.

Muestra	P432-3F10K-tetrámero (%)	Tetrámero negativo (%)
Pre-vacunación de pacientes con cáncer		
III	44,5	0,30
IV	22,0	0,18
V	31.5	0,08
Post-vacunación de pacientes con cáncer		
III	59,9	3,4
IV	23,8	0,25
V	22,0	0,30

Tabla 10. Identificación de células CD8+ T específicas de P483-2L3F con tetrámeros en las PBMC de pacientes con cáncer.

Muestra	P483-2L3F-tetrámero (%)	Tetrámero negativo (%)
Pre-vacunación de pacientes con cáncer		
III	64,7	0,00
IV	45,5	0,50
V	53,5	0,15
Post-vacunación de pacientes con cáncer		
III	80,9	0,46

Muestra	P483-2L3F-tetrámero (%)	Tetrámero negativo (%)
IV	65,7	0,47
V	43,8	0,24

Para evaluar la presencia de células $CD8^+$ T reactivas a los péptidos P432-3F10K y P483-2L3F en las PBMC de pacientes con carcinoma inscritos en el ensayo de vacuna clínicas, se llevó a cabo un análisis IFNγ ELISPOT. Los péptidos P432-3F10K y P483-2L3F se usaron en un ensayo ELISPOT a una concentración de 25 µg/ml para determinar la frecuencia del precursor de células T específicas. Se usaron células K562-A3 pulsadas con péptido como APC en una relación efectora:APC de 1:2. Se usaron péptido de VIH y ningún péptido como controles.

Como se expone en la Tabla 11, 5 de 11 pacientes exhibieron producción de IFNγ específica tras la estimulación con el péptido P432-3F10K en las PBMC pre-vacunación y tres meses post-vacunación. Ningún paciente tuvo una reacción específica al péptido P483-2L3F, y el paciente I no pudo ser evaluado debido a que contaba con muy pocas PBMC.

Tabla 11. Frecuencia del precursor de células T específicas de P432-3F10K y P483-2L3F en sangre periférica de pacientes con tumores que expresan MUC1 y CEA antes y después de las vacunas con PANVAC.

Paciente	Punto de tiempo	P432-3F10K	P483-2L3F
Paciente II	Pre	1/6316	<1/200000
	Post	1/2372	<1/200000
Paciente III	Pre	1/6522	<1/200000
	Post	1/5455	<1/200000
Paciente IV	Pre	1/2000	<1/200000
	Post	1/1322	<1/200000
Paciente V	Pre	<1/200000	<1/200000
	Post	<1/200000	<1/200000
Paciente VI	Pre	1/4511	<1/200000
	Post	1/21429	<1/200000
Paciente VII	Pre	<1/200000	<1/200000
	Post	<1/200000	<1/200000
Paciente VIII	Pre	<1/200000	<1/200000
	Post	<1/200000	<1/200000
Paciente IX	Pre	<1/200000	<1/200000
	Post	<1/200000	<1/200000

Paciente	Punto de tiempo	P432-3F10K	P483-2L3F
Paciente X	Pre	<1/200000	<1/200000
	Post	<1/200000	<1/200000
Paciente XI	Pre	1/4196	<1/200000
	Post	1/7229	<1/200000

Ejemplo 10

Los siguientes materiales y métodos se usaron para los experimentos analizados en los Ejemplos 11 y 12.

Unión del péptido a HLA-A2 Se evaluó la unión de pVNTR1, pVNTR2, pVNTR4 y sus análogos (pVNTR3 y pVNTR5) a moléculas HLA-A2 por aumento de la expresión de HLA-A2 en las células T2A2, como se demuestra por citometría de flujo (Nijman et al., Eur. J. Immunol., 23: 1215-1219 (1993)).

Generación de líneas de células T Se generaron CTL específicas de MUC1-C por una modificación del protocolo descrito por Tsang et al., J. Nat. Cancer Inst., 87: 982-990 (1995). Las líneas de células T específicas de pVNTR3, pVNTR5 se generaron a partir de un paciente de próstata vacunado con una vacuna basada en PSA. Las DC autólogas maduradas con levadura o CD40L, generadas como se describió previamente, se usaron como las células presentadoras de antígenos (APC). Las PBMC obtenidas el día 94 post-vacunación se añadieron a las APC y se pulsaron con 12,5 µg/ml del correspondiente péptido en una relación efectora:APC de 10:1. Las DC autólogas se usaron como APC para 3 ciclos de estimulación *in vitro* (IVS). Las células B autólogas transformadas con EBV irradiadas (23.000 rad) se usaron como las APC después del tercer ciclo de IVS. Para re-estimulación con células B transformadas con EBV, se usaron péptidos en una concentración de 12,5 µg/ml para pulsar las células B autólogas transformadas con EBV en una relación efectora:APC de 1:3. Los cultivos se incubaron durante 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% CO_2. Los cultivos se enriquecieron luego con IL-2 humana recombinante en una concentración de 20 U/ml durante 7 días; el medio que contenía IL-2 se reabasteció cada 3 días. La incubación de 3 días con péptido y el suplemento de IL-2 de 7 días constituyeron un ciclo de IVS.

Ensayo citotóxico Se marcaron células diana con 50 µCi de oxiquinolina marcada con ^{111}In (Medi-Physics Inc., Arlington, IL) durante 15 min a temperatura ambiente. Las células diana (3×10^3) en 100 µl de medio completo RPMI-1640 se añadieron a cada uno de los 96 pocillos de placas de ensayo con fondo plano. Las células efectoras se suspendieron en 100 µl de medio completo RPMI-1640 enriquecido con 10% suero AB humano combinado y se añadieron a las células diana. Las placas luego se incubaron a 37°C en 5% CO_2 durante 4 o 16 h. Se recogió el sobrenadante para recuento gamma con el uso de marcos cosechadores (Skatron, Inc., Sterling, VA). Las determinaciones se realizaron por triplicado y se calcularon las desviaciones estándar. Se calculó la lisis específica de acuerdo con la siguiente fórmula (todos los valores en cpm):

$$\% \text{ lisis} = \frac{\text{Liberación observada - liberación espontánea}}{\text{Liberación total - liberación espontánea}} \times 100$$

La liberación espontánea se determinó a partir de pocillos a los que se les añadieron 100 µl de medio completo RPMI-1640. La radiactividad liberable total se obtuvo después del tratamiento de las dianas con 2,5% Triton X-100.

Cultivos celulares La línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 (HLA-$A2^+$/$MUC1^+$), la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano CF-PAC-1 (HLA-$A2^+$/$MUC1^+$), la línea celular de melanoma SK-Mel-24 (HLA-$A2^+$/$MUC1^-$) y la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano ASPC-1 (HLA-$A2^-$/$MUC1^+$) se adquirieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se mantuvieron en medio completo DMEM (Mediatech, Inc., Manassas, VA) enriquecido con 10% suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 0,5 µg/ml anfotericina B (Mediatech, Inc.) y 0,01 µg/ml insulina recombinante humana (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Todos los cultivos estuvieron libres de *Mycoplasma.*

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra la determinación de los epítopos de CTL de la región MUC1 VNTR y sus análogos.

La secuencia de aminoácidos MUC1 VNTR se exploró para compatibilidades con los motivos de consenso para los péptidos de unión a HLA-A2 con el fin de identificar posibles epítopos de células $CD8^+$ T que pudieran utilizarse para inmunoterapia. Se identificaron tres péptidos 9-mer (denominados VNTR-1, VNTR-2 y VNTR-4) y se sintetizaron (véase la Tabla 12).

Dos análogos de dos epítopos naturales VNTR-2 y VNTR-4 (VNTR-3 y VNTR-5, respectivamente) se generaron por sustituciones de aminoácidos en los residuos de aminoácidos en las posiciones 1, 2 y 9 (ver Tabla 12). Cada uno de los análogos tuvo una afinidad pronosticada superior para las moléculas HLA-A2 que los correspondientes epítopos naturales.

Un péptido con una gran afinidad hacia las moléculas HLA-A2 (NGEP P703) (Cereda et al., Cancer Immunol. Immunother., 59: 63-71 (2010)) y un péptido de HLA-A3 específico (CAP-7) se usaron en los ensayos como controles positivo y negativo, respectivamente.

Tabla 12. Unión de péptidos MUC1 VNTR a moléculas HLA-A2.

Péptido*	Secuencia de aminoácidos	SEC. ID. NÚM:	Unión pronosticada	Unión de T2A2[#]
VNTR-1	STAPPAHNV	27	0,966	169,0
VNTR-2	STAPPAHGV	28	0,966	165,7
VNTR-3 (agonista)	YLAPPAHGV	29	319,9	485,5
VNTR-4	APDTRPAPG	31	0	209,7
VNTR-5 (agonista)	YLDTRPAPV	32	127,9	647,4
NGEP (P703) (control positivo)	GLFDEYLEMV	16	NA	485,3
CAP-7 (control negativo)	HLFGYSWYK	17	NA	83,8

*Se utilizaron péptidos en una concentración de 25 µg/ml.

[#]Resultados expresados como intensidad media de fluorescencia- (MFI).

VNTR-1, VNTR-2 y VNTR-4 demostraron una mayor afinidad hacia las moléculas de HLA-A2 en comparación con el control negativo. Los péptidos análogos VNTR-3 y VNTR-5 demostraron una afinidad superior hacia las moléculas de HLA-A2 en comparación con los correspondientes péptidos naturales VNTR-2 y VNTR-4, respectivamente.

La estabilidad de los complejos de péptido/HLA-A2 de los péptidos análogos y naturales se analizó determinando el porcentaje de complejos remanentes en las moléculas de HLA-A2 en distintos puntos de tiempo (0, 2, 4, 6, 8 y 10 h). Los péptidos análogos VNTR-3 y VNTR-5 demostraron una mayor avidez para las moléculas de clase I que los péptidos naturales VNTR-2 y VNTR-4, respectivamente, en cada punto de tiempo (véase la Fig. 3).

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra la inmunogenicidad de los péptidos análogos mejoradores de MUC1 VNTR en pacientes con cáncer.

Se investigó la capacidad de los péptidos VNTR-3 y VNTR-5 de generar CTL por estimulación *in vitro* de las PBMC. Las líneas de células T resultantes (T-VNTR-3 y T-VNTR-5, respectivamente) se ensayaron luego para actividad citotóxica contra una línea de células de carcinoma $MUC1^+/HLA\text{-}A2^+$ (MCF-7) y una línea de células de cáncer pancreático $MUC1^+/HLA\text{-}A2^+/A3^+$ (CF-PAC-1). Una línea de células de melanoma $MUC1^-/HLA\text{-}A2^+$ (SK-MEL) y una línea de células de cáncer pancreático $MUC1^+$/HLA-A2 (ASPC-1) se usaron como controles negativos.

Se llevó a cabo un ensayo de liberación de ^{111}In usando líneas de células T específicas del epítopo de MUC1 VNTR. Tal como estaba previsto, no se observó lisis contra células ASPC-1 (HLA-A2$^-$) y SK-MEL (MUC1$^-$) (véase la Tabla 13).

Tabla 13. Las células T específicas de VNTR inactivan células de tumores que expresan HLA-A2 y MUC-1.

Línea de células T	Relación E:T	MCF-7 (HLA-A2$^+$MUC1$^+$)$^{\#}$	CF-PAC-1 (HLA-A2$^+$/A3$^+$MUC1$^+$)$^{\#}$	ASPC-1 (HLA-A2$^-$ MUC1$^+$)$^{\#}$	SK-MEL (HLA-A2$^+$MUC1$^-$)$^{\#}$
T-VNTR-3	25:1	42,2 (7,3)	16,9 (3,6)	1,3 (1,9)	5,0 (2,5)
	12,5:1	24,6 (3,5)	10,9 (1,3)	-0,8 (0,6)	-1,5 (2,1)
T-VNTR-5	25:1	53,4 (8,4)	48,9 (4,9)	-0,8 (0,4)	-0,6 (4,3)
	12,5:1	45,1 (3,0)	31,2 (2,4)	-1,4 (0,6)	1,5 (0,5)
$^{\#}$Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica (desviación estándar).					

T-VNTR-3 (línea de células T específica del péptido agonista de VNTR-3) y T-VNTR-5 (línea celular T específica del péptido agonista de VNTR-5) se cultivaron por separado a una concentración de 1x10^5 células/ml. La relación de APC:células T fue 3:1. El agonista o los péptidos naturales se usaron en distintas concentraciones (véanse las Tablas 14 y 15). Los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas, y se determinó la cantidad de IFN-γ. Las líneas de células T específicas de VNTR-3- y VNTR-5 con los péptidos agonistas produjeron niveles más altos de IFN-γ en comparación con la estimulación con los péptidos naturales (véanse las Tablas 14 y 15).

Tabla 14. La línea de células T específica de VNTR-3 estimulada con péptidos agonistas produjo niveles superiores de IFN-γ.

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)					
	25^4	12,5$^{\#}$	6,25$^{\#}$	3,13$^{\#}$	1,56$^{\#}$	0$^{\#}$
VNTR-3 (agonista)	771,5	766,1	685,3	457,6	304,9	<15,6
VNTR-2 (natural)	261,0	203,0	127,0	75,8	29,0	<15,6
$^{\#}$Los resultados se expresan en pg/ml de IFN-γ.						

Tabla 15. La línea de células T específica de VNTR-5 estimulada con los péptidos agonistas produjo niveles superiores de IFN-γ.

Péptido	Concentración de péptido (µg/ml)					
	25$^{\#}$	12,5$^{\#}$	6,25$^{\#}$	3,13^4	1,56$^{\#}$	0$^{\#}$
VNTR-5 (agonista)	543,7	496,2	452,9	322,0	205,1	<15,6
VNTR-4 (natural)	117,9	109,3	63,1	53,2	19,8	<15,6
$^{\#}$Los resultados se expresan en pg/ml de IFN-γ.						

Para confirmar la especificidad y la restricción de HLA-A2 de la citólisis de CTL, se usaron células de T-VNTR-3 y T-VNTR-5 en un ensayo de inhibición de dianas en frío con la línea de células de carcinoma pancreático CF-PAC-1

(HLA-A2$^+$/A3$^+$ y MUC1$^+$). Las células CF-PAC-1 y las células B autólogas que no habían sido pulsadas con péptidos agonistas de VNTR se usaron como dianas.

Como lo demuestran los datos de la Tabla 16, las células B autólogas pulsadas con el correspondiente péptido agonista de VNTR bloquean la lisis de las células tumorales, mientras que las células B autólogas que no habían sido expuestas al péptido no afectaron la lisis del tumor.

Tabla 16. Inhibición de lisis de CF-PAC-1 por líneas de células T específicas de MUC1.

Células diana	Célula T (T-VNTR-3) específica del péptido agonista de MUC1 (pVNTR-3)[#]	Célula T (T-VNTR-5) específica del péptido agonista de MUC1 (pVNTR-5)[#]
CF-PAC-1 + B	38,3 (3,5)	25,8 (1,9)
CF-PAC-1 + B + pVNTR-3	16,0 (10,0)	-
CF-PAC-1 + B + pVNTR-5	-	12,0 (3,7)
[#] Los resultados se expresan como porcentaje de lisis específica (SD).		

El uso de los términos "un/a" y "el/la" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se interpretará que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, aunque sin limitarse a ello") a menos que se indique algo distinto. Las citas de intervalos de valores en este documento tienen como fin absoluto utilizarse como método abreviado para hacer referencia individual a cada valor separado que yace dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en este documento, y cada valor separado se incorpora a la memoria como si se mencionara individualmente en este documento. Todos los métodos descritos en la presente invención se pueden llevar a cabo en cualquier orden adecuado, a menos que se indique otra cosa o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o de lenguaje ilustrativo (p. ej., "tal como") provistos en la presente invención, está destinado exclusivamente a describir mejor la invención y no presenta una limitación sobre el alcance de la invención, a menos que se reivindique lo contrario. Ningún elemento no reivindicado debe interpretarse dentro del lenguaje de la memoria como esencial para la práctica de la invención.

Se describen en este documento las realizaciones preferidas de la presente invención, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las modificaciones de las realizaciones preferidas pueden resultar obvias para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción precedente. Los inventores esperan que los expertos en la materia empleen dichas modificaciones en la medida que resulte adecuado, y pretenden que la invención pueda sea practicada de una manera distinta a la descrita concretamente en este documento. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del objeto citadas en las reivindicaciones anejas, en la medida permitida por las leyes. Asimismo, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles se incluye dentro de la invención, a menos que se indique otra cosa en este documento o el contexto lo contradiga claramente.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, REPRESENTADO POR LA SECRETARIA, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS

<120> EPÍTOPOS DE CTL NATURALES Y AGONISTAS DEL ANTÍGENO TUMORAL DE MUC1

<130> 711788

<150> US 61/582,723

<151> 2012-01-03

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 1

Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 2

Tyr Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE (característica diversa)

<222> (1)..(1)

<223> en donde Xaa es Ala o Tyr

<400> 3

Xaa Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 4

Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys
1 5 10

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 5

Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Val
1 5 10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> en donde Xaa es Cys o Val

<400> 6

Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Xaa
1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 7

Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 8

Tyr Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> en donde Xaa es Ser o Tyr

<400> 9

Xaa Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 10

Ala Leu Phe Ile Val Tyr Leu Ile Ala Lys
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> en donde Xaa es Ala o Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> en donde Xaa es Leu o Lys

<400> 11

```
Ala Leu Xaa Ile Val Tyr Leu Ile Ala Xaa
1               5                   10
```

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 12

```
Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys
1               5
```

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 13

```
Ser Leu Tyr Arg Ser Pro Tyr Glu Lys
1               5
```

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 14

```
Ser Leu Phe Arg Ser Pro Tyr Glu Lys
1               5
```

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> en donde Xaa es Thr o Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> en donde Xaa es Asp, Tyr o Phe

<400> 15

Ser Xaa Xaa Arg Ser Pro Tyr Glu Lys
1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 16

Gly Leu Phe Asp Glu Tyr Leu Glu Met Val
1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 17

His Leu Phe Gly Tyr Ser Trp Tyr Lys
1 5

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 18

Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 19

Leu Leu Val Leu Val Ile Val Leu Val Lys
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 20

Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Lys
1 5 10

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 21

Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 22

Gly Leu Leu Asp Ile Phe Pro Ala Lys
1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 23

Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 24

Gly Leu Leu Asp Ile Phe Pro Ala Lys
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 25

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> en donde Xaa es Ser o Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> en donde Xaa es Thr o Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> en donde Xaa es Asn o Gly

<400> 26

Xaa Xaa Ala Pro Pro Ala His Xaa Val
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 27

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Asn Val
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 28

Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 29

Tyr Leu Ala Pro Pro Ala His Gly Val
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> en donde Xaa es Ala o Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> en donde Xaa es Pro o Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> en donde Xaa es Gly o Val

<400> 30

Xaa Xaa Asp Thr Arg Pro Ala Pro Xaa
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 31

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 32

Tyr Leu Asp Thr Arg Pro Ala Pro Val
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 2, con la salvedad que se excluyen los péptidos con las secuencias de aminoácidos de SEC. ID. NÚM: 23 y 25 del documento WO/2013/025972 A1.

2. El péptido según la reivindicación 1, en donde el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de MUC-1 de longitud total o uno de sus fragmentos.

3. El péptido según la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido comprende además una o más de SEC. ID. NÚM: 5, SEC. ID. NÚM: 8, SEC. ID. NÚM: 10, SEC. ID. NÚM: 13, SEC. ID. NÚM: 14, SEC. ID. NÚM: 29 y SEC. ID. NÚM: 32.

4. Un ácido nucleico que codifica el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 4.

6. El vector según la reivindicación 5, en donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, levadura, virus de la viruela, retrovirus, adenovirus, herpes virus, polio virus, alfavirus, baculorvirus y Sindbis virus,

en donde el virus de la viruela se selecciona del grupo que consiste en virus de orthopox, viruela aviar, viruela caprina y viruela porcina, en donde el virus de orthopox es preferiblemente vaccinia o vaccinia Ankara modificado (MVA), y el virus de la viruela aviar preferiblemente se selecciona entre virus de la viruela aviar fowlpox y el virus de la viruela aviar del canario.

7. Una célula que comprende (i) uno o más de los péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, (ii) uno o más de los ácidos nucleicos según la reivindicación 4, o (iii) uno o más de los vectores según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, preferiblemente

la célula es humana, preferiblemente

la célula o la célula humana es una célula presentadora de antígeno o una célula tumoral.

8. Una composición que comprende:

(a) (i) uno o más de los péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, (ii) uno o más de los ácidos nucleicos según la reivindicación 4, (iii) uno o más de los vectores según las reivindicaciones 5 o 6, o (iv) una o más de las células según la reivindicación 7, y

(b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

9. La composición según la reivindicación 8, que además comprende una molécula inmunoestimuladora/reguladora.

10. La composición según la reivindicación 9, en donde la molécula inmunoestimuladora/reguladora se selecciona del grupo que consiste en interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-12, interferón (IFN)-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-α, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD70, RANTES, G-CSF, OX-40L, 41 BBL, anti-CTLA-4 y sus combinaciones, o de

(i) un plásmido que codifica IL-12 que forma complejo con quitosán y (ii) IL-12 recombinante combinada con quitosán.

11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que además comprende un fármaco terapéutico, antibiótico, fármaco antivírico, fármaco antifúngico, ciclofosfamida o una combinación de estos.

12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, que además comprende uno o más adyuvantes, preferiblemente uno o más de los adyuvantes seleccionados del grupo que consiste en aluminio, sales de aluminio, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, sílice y aluminio, fosfato de calcio, adyuvante de Freund incompleto, QS21, MPL-A, RIBI DETOXTM y sus combinaciones.

13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, que además comprende el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF).

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, que además comprende liposomas.

15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-14 para uso en mejorar una respuesta inmune en un sujeto.

16. Linfocitos estimulados con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-14 *ex vivo* para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

17. Células dendríticas tratadas con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-14 *ex vivo* para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

18. Células T transformadas en forma adoptiva estimuladas *in vitro* con la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 8-14 para uso en el tratamiento de cáncer que expresa MUC1 en un sujeto.

19. Un kit para uso en inhibir cáncer que expresa MUC-1 en un sujeto, en donde el kit comprende: a) un primer vector recombinante que comprende ácido nucleico que codifica un péptido que comprende SEC. ID. NÚM: 2; y b) un segundo vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende la SEC. ID. NÚM: 2.

20. El kit según la reivindicación 19, en donde el primero y el segundo vectores recombinantes comprenden además cada uno un ácido nucleico que codifica por lo menos uno de la SEC. ID. NÚM: 5, SEC. ID. NÚM: 8, SEC. ID. NÚM: 10, SEC. ID. NÚM: 13, SEC. ID. NÚM: 14, SEC. ID. NÚM: 29 o SEC. ID. NÚM: 32.

21. El kit según la reivindicación 19 o 20, en donde el primero y el segundo vectores recombinantes comprenden además cada uno un ácido nucleico que codifica un antígeno de CEA.

22. El kit según una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en donde cada vector recombinante es un vector del virus de la viruela recombinante, preferiblemente

el vector del virus de la viruela recombinante se selecciona del grupo que consiste en orthopox, viruela aviar, viruela caprina y viruela porcina, preferiblemente

el vector recombinante o vector del virus de la viruela recombinante de la primera composición es diferente del vector recombinante o vector del virus de la viruela recombinante de la segunda composición.

23. Una primera composición y una segunda composición para uso en la inhibición de un cáncer que expresa MUC-1 en un sujeto, en donde la primera composición y la segunda composición comprenden cada una un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende la SEC. ID. NÚM: 2, en donde la primera composición se administra al sujeto como vacuna de sensibilización, y la segunda composición se administra al sujeto como una o más vacunas de refuerzo subsiguientes.

24. La primera composición y la segunda composición para uso según la reivindicación 23, en donde cada vector recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica por lo menos una de SEC. ID. NÚM: 5, SEC. ID. NÚM: 8, SEC. ID. NÚM: 10, SEC. ID. NÚM: 13, SEC. ID. NÚM: 14, SEC. ID. NÚM: 29 o SEC. ID. NÚM: 32.

25. La primera composición y la segunda composición para uso de acuerdo con la reivindicación 23 o 24, en donde cada vector recombinante comprende además un ácido nucleico que codifica un antígeno de CEA.

26. La primera composición y la segunda composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 23-25, en donde cada vector recombinante es un vector del virus de la viruela recombinante, preferiblemente el vector del virus de la viruela recombinante se selecciona del grupo que consiste en orthopox, viruela aviar, viruela caprina y viruela porcina, preferiblemente

el vector recombinante o el vector del virus de la viruela recombinante de la primera composición es diferente del vector recombinante del vector del virus de la viruela recombinante de la segunda composición.

FIG. 1A

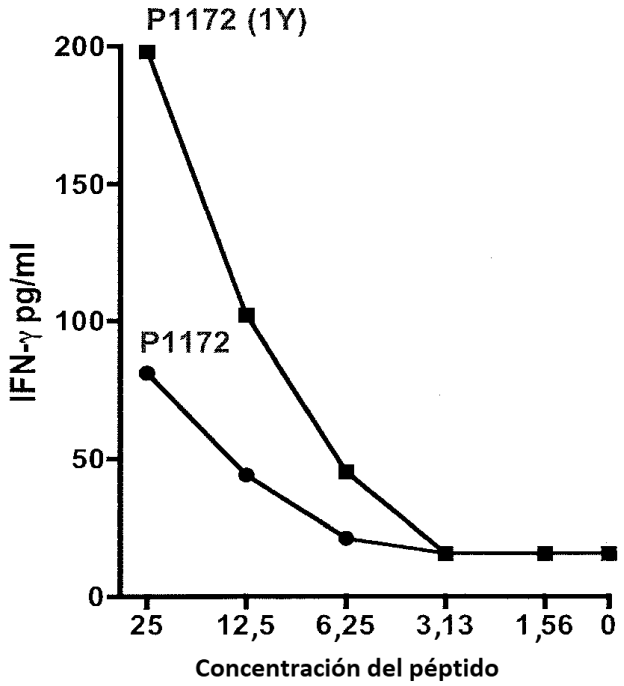

P1172 (1Y)
P1172
IFN-γ pg/ml
200
150
100
50
0
25
12,5
6,25
3,13
1,56
0
Concentración del péptido

FIG. 1B

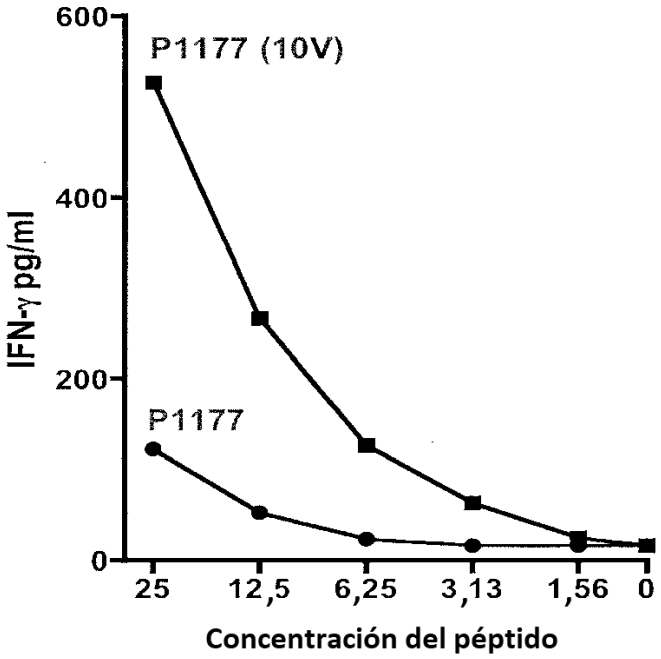

600
400
200
0
IFN-γ pg/ml
P1177 (10V)
P1177
25
12,5
6,25
3,13
1,56
0
Concentración del péptido

FIG. 1C

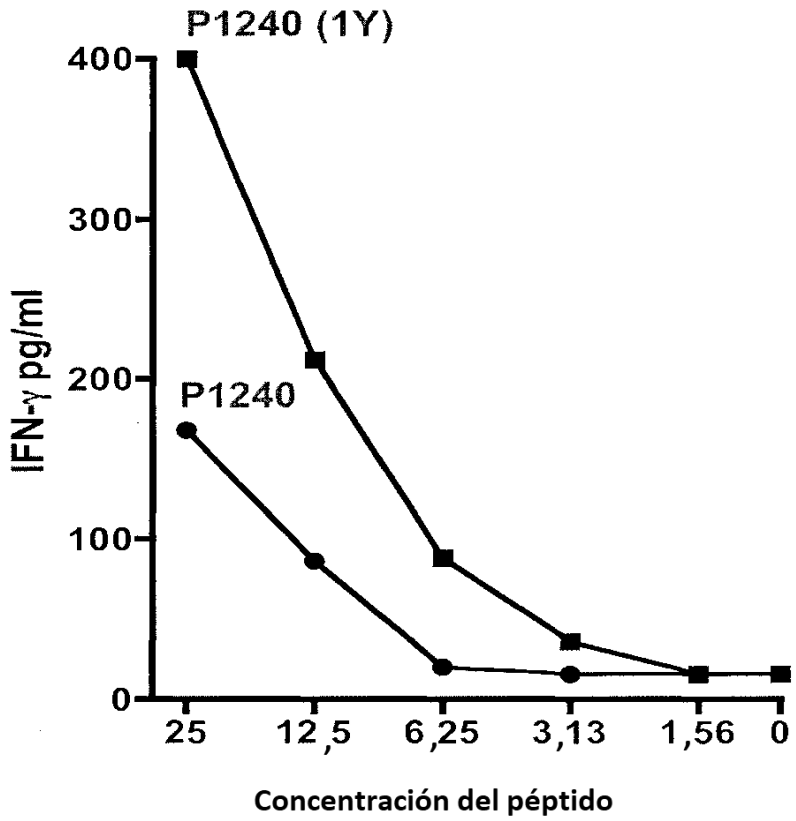

P1240 (1Y)
P1240
400
300
200
100
0
IFN-γ pg/ml
25
12,5
6,25
3,13
1,56
0
Concentración del péptido

FIG. 2A

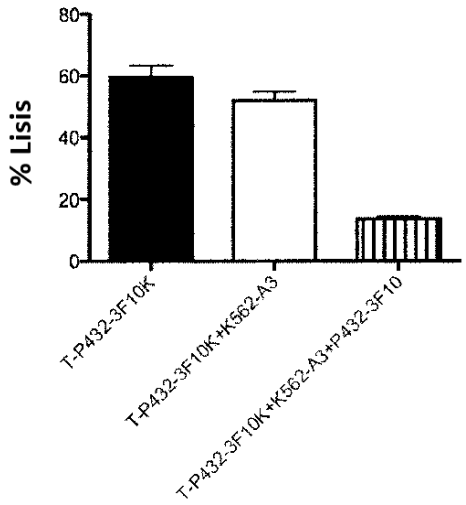

% Lisis
80
60
40
20
0
T-P432-3F10K
T-P432-3F10K+K562-A3
T-P432-3F10K+K562-A3+P432-3F10

FIG. 2B

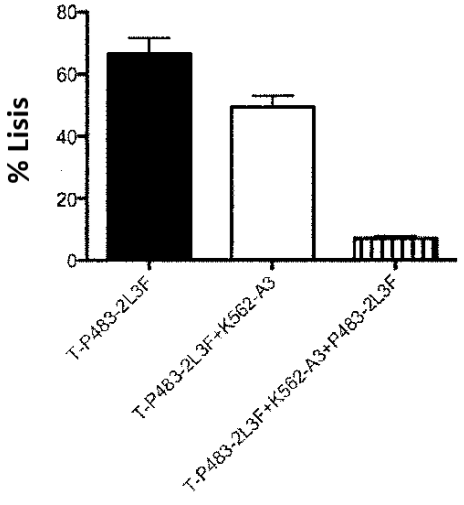
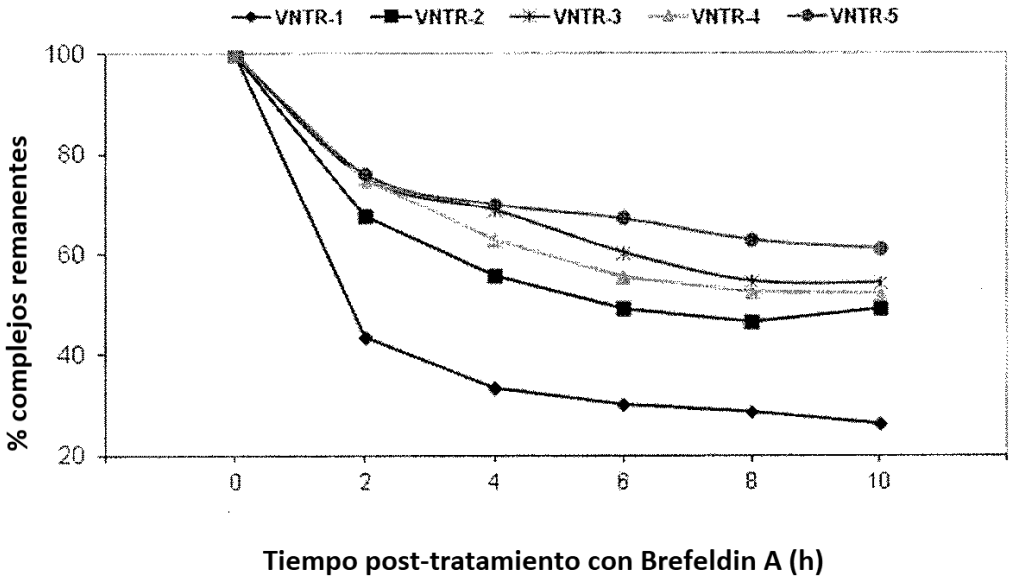

% Lisis
80
60
40
20
0
T-P483-2L3F
T-P483-2L3F+K562-A3
T-P483-2L3F+K562-A3+P483-2L3F

FIG. 3


VNTR-1
VNTR-2
VNTR-3
VNTR-4
VNTR-5
100
80
60
40
20
% complejos remanentes
0
2
4
6
8
10
Tiempo post-tratamiento con Brefeldin A (h)