

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 725**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.02.2013** **PCT/US2013/026484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013** **WO13123424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2013** **E 13749730 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2814836**

54 Título: **Métodos y materiales para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu**

30 Prioridad:

17.02.2012 US 201261600480 P

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

23.04.2018

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:

**KNUTSON, KEITH L. y
HENLE, ANDREA M.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 664 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y materiales para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu

Antecedentes

5 1. Campo técnico

Este documento se refiere a métodos y materiales para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. Por ejemplo, este documento se refiere a métodos y materiales para usar un polipéptido que consista en una secuencia de aminoácidos SLAFLPESFD *in vivo* o *in vitro* para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu.

2. Información de antecedentes

Las vacunas contra el cáncer presentan la capacidad de estimular o restituir el sistema inmunitario de manera que pueda combatir el cáncer. En algunos casos, pueden diseñarse vacunas contra el cáncer para tratar un cáncer existente fortaleciendo las defensas del paciente contra el cáncer.

15 Resumen

La invención se define en las reivindicaciones.

Este documento proporciona métodos y materiales para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para usar un polipéptido que consista en una secuencia de aminoácidos SLAFLPESFD (SEQ ID NO:1) *in vivo* o *in vitro* para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer y lisar células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. Un polipéptido que consista en una secuencia de aminoácidos SLAFLPESFD puede referirse como el polipéptido SLAFLPESFD, el polipéptido p373-382 o un polipéptido que consista en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1. Como se describe en la presente memoria, el polipéptido SLAFLPESFD o una composición de vacuna que contenga el polipéptido SLAFLPESFD puede administrarse a un paciente de cáncer que tenga células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu en condiciones en las que el paciente produzca células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer y lisar esas células cancerígenas. En algunos casos, esas células T CD8⁺ pueden referirse como células T CD8⁺ generadas usando el polipéptido SLAFLPESFD.

Tener la capacidad para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer y lisar células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu puede permitir a los médicos internos proporcionar a los pacientes de cáncer opciones adicionales de tratamiento eficaces. Por ejemplo, las vacunas proporcionadas en la presente memoria pueden usarse solas o junto con otras opciones de tratamiento del cáncer para proporcionar a los pacientes de cáncer una población eficaz de células T CD8⁺ diseñadas para destruir células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu.

En general, un aspecto de este documento caracteriza un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido purificado), en el que la secuencia del polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1. En algunos casos, el polipéptido puede incluir una modificación de N- y/o C-terminal.

En otro aspecto, este documento caracteriza una composición de vacuna que comprende, o consiste esencialmente en, un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido purificado), en la que la secuencia del polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1. En algunos casos, el polipéptido puede incluir una modificación del N- y/o C-terminal. La composición puede comprender un adyuvante. El adyuvante puede ser una mezcla de aceite y agua. El adyuvante puede ser Montanide ISA-51. La composición puede comprender IL-2, IL-12, GM-CSF o rintatolimod.

En otro aspecto, este documento caracteriza un método para aumentar el número de células T CD8⁺ con la capacidad para destruir células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. El método comprende, o consiste esencialmente en, poner en contacto una población de células T CD8⁺ con un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido purificado), en el que la secuencia del polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1. La etapa de puesta en contacto puede tener lugar de manera *ex vivo*. La etapa de puesta en contacto puede tener lugar de manera *in vivo*.

En otro aspecto, este documento caracteriza un método para aumentar, en un ser humano, el número de células T CD8⁺ con la capacidad para destruir células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. El método comprende, o consiste esencialmente en, administrar una composición de vacuna al ser humano, en el que la composición comprende, o consiste esencialmente en, un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido purificado), en el que la secuencia del polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1. En algún

caso, el polipéptido puede incluir una modificación del N- y/o C-terminal. El ser humano puede contener células cancerígenas que expresen el polipéptido HER2/neu. La composición puede comprender un adyuvante. El adyuvante puede ser una mezcla de aceite y agua. El adyuvante puede ser Montanide ISA-51. La composición puede comprender IL-2, IL-12, GM-CSF o rintatolimod. El método puede comprender administrar IL-2, IL-12, GM-CSF, rintatolimod, o una combinación de los mismos, al ser humano. El método puede comprender además administrar trastuzumab al ser humano.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales adecuados a continuación. En caso de conflicto, gobernará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

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

Descripción de los dibujos

La figura 1A muestra un ejemplo de cromatogramas iónicos totales que identifican polipéptidos derivados de polipéptido 19-mer de HER-2/neu (FAGCKKIFGSLAFLPESFD) por catálisis proteosómica o inmunoproteosómica.

La figura 1B muestra un ejemplo de cromatogramas iónicos extraídos de las reacciones descritas en la figura 1A que examinan la transformación de p369-377 de HER-2/neu a partir del polipéptido 19-mer.

La figura 1C muestra un ejemplo de cromatogramas iónicos extraídos que demuestran que se transforma p373-382 (SLAFLPESFD) a partir de un 23-mer derivado de HER-2/neu (QEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGD; SEQ ID NO:19) por catálisis proteosómica o inmunoproteosómica.

La figura 2A muestra unión del polipéptido p373-382 de HER-2/neu a células T2 deficientes en TAP.

La figura 2B muestra unión saturable dependiente de la dosis de polipéptido p373-382 de HER-2/neu a células T2.

La figura 2C muestra afinidades de unión relativas del polipéptido p373-382 y p369-377 de HER-2/neu comparado con el polipéptido de unión de HLA-A2 derivado del virus de la influenza de alta afinidad, GILGFVFTL (p58-66; SEQ ID NO:20).

La figura 3A muestra análisis IFN- γ ELISPOT que muestra que las células T CD8 generadas contra el polipéptido p373-382 de HER-2/neu responden a células autólogas cargadas con p373-382 o p369-377.

La figura 3B muestra análisis IFN- γ ELISPOT que demuestra que las células T CD8 generadas contra el polipéptido p373-382 de HER-2/neu responden a células tumorales que expresan HER-2/neu con liberación de IFN- γ .

La figura 3C muestra análisis de células T citotóxicas que demuestra que las células T CD8 generadas contra el polipéptido p373-382 de HER-2/neu lisan células tumorales que expresan HER-2/neu.

Las figuras 4A-B muestran, usando análisis IFN- γ ELISPOT, que la respuesta del IFN- γ de las células T CD8 generadas contra el polipéptido p373-382 de HER-2/neu es bloqueada por anticuerpos bloqueadores del MHC de clase I (Figura 4A: anti-HLA-A2 y Figura 4B: anti-HLA-ABC).

Las figuras 4C-D muestran, usando pruebas de células T citotóxicas, que la respuesta de lisis de las células T CD8 generadas contra el polipéptido p373-382 de HER-2/neu es bloqueada por anticuerpos bloqueadores del MHC de clase I (figura 4C: anti-HLA-A2 y figura 4D: anti-HLA-ABC).

Descripción detallada

Este documento proporciona métodos y materiales para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para usar un polipéptido que consista en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1 *in vivo* o *in vitro* para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer y lisar células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu. En algunos casos, este documento proporciona el polipéptido SLAFLPESFD y composiciones de vacuna que contienen el polipéptido SLAFLPESFD, así como métodos para usar el polipéptido SLAFLPESFD o composiciones de vacuna que contienen el polipéptido SLAFLPESFD para generar células T CD8⁺ con la capacidad para reconocer células cancerígenas que expresen un polipéptido HER2/neu.

En algunos casos, puede usarse un polipéptido proporcionado en la presente memoria (por ejemplo, un polipéptido

que consista en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO:1) junto con células dendríticas para tratar el cáncer. Por ejemplo, pueden usarse células dendríticas puestas en contacto con el polipéptido SLAFLPESFD para tratar el cáncer.

El polipéptido SLAFLPESFD proporcionado en la presente memoria puede ser sustancialmente puro. El término "sustancialmente puro" con respecto a un polipéptido se refiere a un polipéptido que ha sido separado de los componentes celulares con los que normalmente va acompañado. Por ejemplo, un polipéptido generado de manera sintética puede ser un polipéptido sustancialmente puro. Típicamente, un polipéptido proporcionado en la presente memoria es sustancialmente puro cuando al menos el 60 por ciento, (por ejemplo, 65, 70, 75, 80, 90, 95 o 99 por ciento), en peso, está exento de proteínas y moléculas orgánicas que se encuentran normalmente y con las que se asocia normalmente. En general, un polipéptido sustancialmente puro proporcionará una única banda principal en un gel de poli(acrilamida) no reductor.

El polipéptido SLAFLPESFD proporcionado en la presente memoria puede prepararse de muy diversas maneras. Debido a su relativamente corto tamaño, el polipéptido SLAFLPESFD puede ser sintetizado en disolución o en un sintetizador automático sólido según protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart and Young, Solid Phase Polypeptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chemical Co. (1984); Tam et al., J. Am. Chem. Soc., 105:6442 (1983); Merrifield, The Polypeptides, Gross and Meienhofer, ed., Academic Press, Nueva York, pp. 1-284 (1979). En algunos casos, puede sintetizarse un polipéptido proporcionado en la presente memoria (por ejemplo, un polipéptido SLAFLPESFD) con una amida (por ejemplo, NH₂) o ácido libre (por ejemplo, COOH) C-terminal, ambos de los cuales pueden tener la capacidad para unirse a HLA-A2.

En algunos casos, puede usarse tecnología de ADN recombinante en la que se inserta una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido SLAFLPESFD proporcionado en la presente memoria en un vector de expresión, introducido (por ejemplo, por transformación o transfección) en una célula huésped apropiada y ser cultivado en condiciones adecuadas para expresión. Estos procedimientos son conocidos en general en la técnica, como se describe en general en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1982) y Ausubel et al., (ed.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1987) y las patentes de EE. UU. números 4,237,224; 4,273,875; 4,431,739; 4,363,877 y 4,428,941, por ejemplo.

Este documento también proporciona polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos sustancialmente puros) que consisten en una de las secuencias de aminoácidos presentadas en la tabla 1. Dichos polipéptidos pueden prepararse y usarse de la misma manera descrita en la presente memoria para el polipéptido SLAFLPESFD.

En algunos casos, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria pueden incubarse con una población de células T CD8⁺ para generar una mezcla activada de células T CD8⁺ que presente la capacidad de reconocer p373-382 o un polipéptido HER2/neu. Por ejemplo, puede usarse uno o más de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria (por ejemplo, el polipéptido SLAFLPESFD) de una manera *ex vivo* para células T CD8⁺ antígeno-específicas creadas que pueden usarse para tratar tumores malignos. En algunos casos, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria pueden usarse para generar una mezcla de células T CD8⁺ específicas de polipéptido HER2/neu activadas que pueden usarse solas o junto con terapia con anticuerpos monoclonales, terapia CTL, o tanto terapia con anticuerpos monoclonales como terapia CTL, para tratar el cáncer. Por ejemplo, una terapia con anticuerpos monoclonales anti-HER-2/neu puede combinarse con infusión de células T CD8⁺ generadas usando polipéptidos p373-382 para tratar el cáncer (por ejemplo, cáncer de mama). En algunos casos, puede combinarse una terapia con Herceptin (trastuzumab) con infusión de células T CD8⁺ generadas usando polipéptidos p373-382 para tratar el cáncer (por ejemplo, cáncer de mama).

Este documento también proporciona composiciones de vacuna que contienen una cantidad inmunogénicamente eficaz de uno o más de los polipéptidos proporcionados en la presente memoria. Puede usarse una composición de vacuna proporcionada en la presente memoria como vacuna preventiva o terapéutica. Las composiciones de vacuna proporcionadas en la presente memoria pueden administrarse y formularse usando cualquier técnica apropiada incluyendo, sin limitación, las técnicas descritas en otra parte, (véase, por ejemplo, [0132] – [0173] de la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. número 2010-0310640).

En algunos casos, una composición de vacuna proporcionada en la presente memoria puede incluir GM-CSF (por ejemplo, sargramostim), rintatolimod (por ejemplo, Ampligen®), IL-2, IL-12, un adyuvante o una combinación de los mismos. Por ejemplo, una composición de vacuna proporcionada en la presente memoria puede incluir GM-CSF y un adyuvante. Ejemplos de adyuvantes incluyen, sin limitación, oligonucleótidos CpG, monofosforil lípido A y Montanide ISA-51. En algunos casos, el adyuvante puede ser una mezcla de aceite y agua, tal como Montanide ISA-51.

En algunos casos, una composición de vacuna proporcionada en la presente memoria puede incluir una combinación de polipéptidos. Por ejemplo, una composición de vacuna proporcionada en la presente memoria puede incluir el polipéptido SLAFLPESFD y/o uno o más de otros polipéptidos presentados en la tabla 1 junto con uno o más polipéptidos presentados en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. número 2010-0310640, la referencia Karyampudi et al. (*Clin. Cancer Res.*, 16(3):825-34 (2010)), la referencia Holmes et al. (*J. Clin. Oncol.*,

26(20):3426-33 (2008)), la referencia Gritzapis et al. (*Vaccine*, 28(1):162-70 (2009)), la referencia Perez et al. (*Cancer Immunol. Immunother.*, 50(11):615-24 (2002)), la referencia Knutson et al. (*J. Clin. Invest.*, 107(4):477-84 (2001)) o la referencia Salazar et al. (*Clin. Cancer Res.*, 9(15):5559-65 (2003)).

5 Puede usarse cualquier método apropiado para administrar una composición de vacuna proporcionada en la presente memoria a un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Por ejemplo, una composición de vacuna, o polipéptido, proporcionada en la presente memoria puede administrarse sola o junto con otros polipéptidos en dosis que oscilan de 100 a 10 000 microgramos proporcionados por vías intradérmicas o subcutáneas mensualmente durante un total de cuatro a doce meses (por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses).

10 Los métodos y materiales proporcionados en la presente memoria pueden usarse para tratar cualquier tipo de cáncer que exprese un polipéptido HER2/neu. Por ejemplo, los métodos y materiales proporcionados en la presente memoria pueden usarse para tratar el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer esofágico o cáncer de pulmón.

La invención se describirá además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

15 Ejemplos

Ejemplo 1 - Identificación de un epítipo de moléculas de MHC de clase I, potente, de un polipéptido HER2/neu.

HER-2/neu es un polipéptido que se sobreexpresa en una amplia variedad de tumores malignos y es una diana terapéutica, en particular en cáncer de mama. Por ejemplo, NeuVax es una vacuna desarrollada previamente que incluye el polipéptido p369-377 derivado de HER-2/neu (secuencia de aminoácidos: KIFGSLAFL (SEQ ID NO:2), también denominada E75) derivado del dominio extracelular de HER-2/neu y mezclado con GM-CSF. Esta vacuna
20 tiene por objeto preparar la respuesta inmunitaria contra E75 a fin de que se generen células T que puedan reconocer y destruir las células cancerígenas del paciente, que presumiblemente presentan los mismos péptidos en su superficie celular en asociación con moléculas de MHC de clase I.

Se llevó a cabo lo siguiente para determinar si el E75 es transformado a partir de HER-2/neu o fragmentos de HER-2/neu por enzimas multisubunidad referidas como el proteosoma e inmunoproteosoma, que se requieren para cargar polipéptido en moléculas MHC de clase I. Para determinar esto, se sintetizó el polipéptido 19-mer, FAGCKKIFGSLAFLPESFD (SEQ ID NO:3). Este polipéptido ajusta los aminoácidos 364-382 de HER-2/neu y contiene completamente E75 (subrayado). El 19-mer se escindió después usando proteosoma e inmunoproteosoma 20S purificado. Aunque se indica que el E75 se escinde cuando se determina por algoritmos de proteosomas, los
25 datos in vitro presentados en la presente memoria no revelaron la transformación de este polipéptido a partir de polipéptidos HER-2/neu más largos (figuras 1A y 1B). Sin embargo, se encontró de manera consistente que el polipéptido 19-mer era transformado en otros varios polipéptidos más cortos (figura 1A y tabla 1). Ninguno de estos polipéptidos más cortos se valoró de manera tan alta como el E75 para unión a HLA-A2 usando los algoritmos matemáticos (tabla 1).

35 Tabla 1

Figura 1A etiqueta	Número del aminoácido de HER-2/neu	tiempo de retención (min)	Péptido	Péptido generado por inmunoproteosoma	Péptido generado por proteosoma	Valoración de unión HLA-A*0201 (SYFPEITHI)	Escisión prevista por servidores ip/p
1	371-381	20,4	FGSLAFLPESF (SEQ ID NO:4)	+	+	NA	S
2	364-374	15,45	FAGCKKIFGSL (SEQ ID NO:5)	+	+	NA	S
3	372-382	18,4	GSLAFLPESFD (SEQ ID NO:6)	+	+	NA	S
4	373-382	18,5	SLAFLPESFD (SEQ ID NO:1)	+	+	13	N
5	371-380	19,1	FGSLAFLPES (SEQ ID NO:7)	+	+	8	N

Figura 1A etiqueta	Número del aminoácido de HER-2/neu	tiempo de retención (min)	Péptido	Péptido generado por inmunoproteosoma	Péptido generado por proteosoma	Valoración de unión HLA-A*0201 (SYFPEITHI)	Escisión prevista por servidores ip/p
5	372-381	19,1	GSLAFLPESF (SEQ ID NO:8)	+	+	5	S
6	364-373	12,8	FAGCKKIFGS (SEQ ID NO:9)	+	+	10	N
7	374-382	18,2	LAFLPESFD (SEQ ID NO:10)	+	+	8	N
8	373-381	19,2	SLAFLPESF (SEQ ID NO:11)	+	+	16	N
	369-377	NA	KIFGSLAFL (SEQ ID NO:2)	-	-	28	S
9	375-382	16,06	AFLPESFD (SEQ ID NO:12)	+	+	NA	S
*	364-382	19,14	FAGCKKIFGSLAFLPESFD-NH ₂ (SEQ ID NO:13)	NA	NA	NA	NA
*	364-382	19,14	FAGCKKIFGSLAFLPESFD-COOH (SEQ ID NO:14)	NA	NA	NA	NA
**	NA	19,54	FAGKKIFGSLAFLPESFD-NH ₂ (SEQ ID NO:15)	NA	NA	NA	NA
**	NA	19,54	FAGKKIFGSLAFLPESFD-COOH (SEQ ID NO:16)	NA	NA	NA	NA
***	NA	14,78	FAGKKIFGSL (SEQ ID NO:17)	NA	NA	NA	NA
***	NA	14,78	GKKIFGSLAF (SEQ ID NO:18)	NA	NA	NA	NA

Se transforma una secuencia de 19 mer de HER-2/neu en fragmentos de polipéptidos más pequeños mediante el inmunoproteosoma y el proteosoma y se prevé que estos fragmentos se unan a HLA-A*0201. El símbolo (+) indica que el polipéptido fue producido por la respectiva enzima en una prueba *in vitro*. El símbolo (-) indica falta de detección de péptidos en una prueba *in vitro* en muestras que contienen la respectiva enzima. Se usó el servidor de SYFPEITHI para predecir la unión de polipéptido américo y decaamérico a HLA-A*0201. Los métodos de predicción de 20S y C-term 3.0 en el servidor Netchop 3.1 y el servidor de predicción de escisión de proteosomas con los modelos 1, 2 y 3 para las enzimas de proteosomas e inmunoproteosomas se usaron para predecir si podía transformarse el polipéptido más pequeño mediante las enzimas de la secuencia 19 mer más grande, independientemente de los datos *in vitro*. NA, no aplicable, indica que el polipéptido es un producto de supresión, es un material de partida y así no se generaría en la prueba o es demasiado grande para unir predicciones a HLA-A*0201. Los números y los asteriscos indican etiquetas de péptidos en la figura 1A.

Uno de los polipéptidos (p373-382) transformados observados representaba los diez aminoácidos de extremo terminal del 19-mer. Para determinar si podía transformarse este polipéptido a partir de péptidos más grandes, se sintetizó un p373-382 que contenía 23-mer y se trató con los proteosomas. Como se muestra en la figura 1C, se liberó por supuesto p373-382 del 23-mer.

Muchos de los polipéptidos que fueron transformados en la prueba fueron sintetizados y ensayados en cuanto a la unión a la molécula de MHC de clase I, HLA-A2, usando la prueba de estabilización de T2 HLA-A2 clásica. HLA-A2 es una molécula de MHC de clase I que es prevalente en aproximadamente un 30 % - 40 % de la población

caucásica. Con frecuencia se usa como diana en ensayos de vacunas puesto que tiene el potencial para beneficiar a un gran número de pacientes de cáncer de mama. Uno de los polipéptidos sintetizados, p373-382 (SLAFLPESFD), pudo unirse fuertemente a la molécula de HLA-A2, en niveles comparables a los del control positivo, un polipéptido del virus de la influenza (FLU) (figura 2). Sorprendentemente, se ligaron incluso niveles bajos de p373-382, comparado con p369-377, que requería mayores concentraciones (figura 2).

Tomado junto, estos resultados demuestran que el polipéptido p373-382 de HER-2/neu es transformado a partir de polipéptidos HER-2/neu más largos y se une a HLA-A2.

Se llevó a cabo un ELISPOT para determinar si el epítipo p373-382 se transforma de manera natural por la maquinaria celular en células cancerígenas y para determinar si tiene el potencial de ligarse a HLA-A2 en la superficie de células cancerígenas, donde puede servir como diana para células inmunitarias cebadas y activadas. Si las células inmunitarias específicas pueden reconocer el complejo p373-382:HLA-de clase I en células cancerígenas, entonces pueden destruir las células cancerígenas y evitar el progreso del cáncer en los pacientes. Puesto que se demostró que el polipéptido p373-382 era transformado *in vitro* por la maquinaria celular y era capaz de unirse fuertemente a moléculas de HLA-A2, se llevó a cabo un ELISPOT para determinar si podían ser generadas células T CD8⁺ generadas usando el polipéptido p373-382 y si estas células T podían reconocer células de cáncer de mama de HER-2/neu⁺.

La figura 3A revela que las estirpes de células T CD8⁺ se generaban usando el polipéptido pFLU (control), p369-377 y p373-382. Las células T de FLU de control sólo reconocieron células diana pulsadas con polipéptido FLU, como se esperaba. Las células T generadas por polipéptido p369-377 de HER-2/neu reconocían células diana pulsadas con polipéptido p369-377 y células diana pulsadas con p373-382. Las células T generadas por p373-382 reconocían células diana pulsadas con el polipéptido p373-382 o el polipéptido p369-377, que indica que hay reactividad cruzada entre los dos polipéptidos que podía ser debido al hecho de que compartían cinco aminoácidos.

A continuación, las estirpes de células T generadas se valoraron en una prueba ELISPOT *in vitro* para determinar si podían reconocer un grupo de estirpes celulares de cáncer de mama que expresen niveles variables de HER-2/neu en su superficie. En todos los casos, las células T CD8⁺ generadas por el p373-382 podían reconocer las células de cáncer de mama a niveles muy superiores comparado con las células T CD8⁺ generadas por el p369-377 y las células T CD8⁺ de FLU de control (figura 3B). Las células BT20 expresan HER-2/neu, pero no expresan HLA-A2 y así sirven como control negativo. Estos resultados indican que las células de cáncer de mama expresan p373-382 en su superficie en el contexto de HLA-A2 y que las células T CD8⁺ generadas usando p373-382 tienen la capacidad para reconocer estas células cancerígenas.

Se llevó a cabo otra prueba *in vitro* para medir la lisis de las células de cáncer de mama mediante las células T. De nuevo, las células T CD8⁺ generadas usando el polipéptido p373-382 reconocían y lisaban todas las estirpes celulares ensayadas de cáncer de mama a niveles muy superiores comparado con las células T CD8⁺ generadas usando el polipéptido p369-377 (figura 3C). En este ensayo, las células BT20 fueron un control negativo, así como las células FLO, que expresan HLA-A2, pero no expresan HER-2/neu.

Por último, para confirmar que el polipéptido p373-382 estaba activando células T CD8 de una manera restringida de HLA, las estirpes de células T generadas con los tres polipéptidos usados en la figura 3 se ensayaron en cuanto a la reactividad péptido-específica o actividad lítica en presencia de anticuerpos monoclonales de HLA-A2 o HLA-ABC neutralizantes. Como se muestra en la figura 4A-B, la reactividad, cuando se valora por liberación de IFN- γ , de las células T generadas por p373-382 se suprimió considerablemente por inclusión de anticuerpo cuando se compara con células T tratadas con anticuerpo emparejado isotipado de control. En paralelo, también se observó que los anticuerpos monoclonales HLA-A2 o HLA-ABC neutralizantes bloqueaban la lisis de células tumorales mediante células T generadas por p373-382 como se muestra en las figuras 4C-D, respectivamente.

Los hallazgos descritos en los tres párrafos precedentes se repitieron de dos a cuatro veces usando células T generadas a partir de dos a tres donadores de HLA-A2⁺.

Se usaron algoritmos para determinar el potencial para otros alelos de HLA, además de HLA-A2, para unirse a p373-382 o algún otro polipéptido embebido. Los algoritmos usados fueron SYFPEITHI y NetMHCpan. Los resultados de esta investigación sugieren que el p373-382 o algunos fragmentos pueden unirse a otras moléculas de clase HLA (tabla 2).

Tabla 2. Epítipos previstos en p373-382

Polimorfismo HLA	Octámeros	Nonámeros	Decámeros
HLA-A*0201	--	--	SLAFLPESFD
HLA-A*03	--	--	SLAFLPESFD

Polimorfismo HLA	Octámeros	Nonámeros	Decámeros
HLA-A*1101	--	--	SLAFLPESFD
HLA-A*2402	--	SLAFLPESF	--
HLA-A*26	--	SLAFLPESF	--
HLA-B*08	LAFLPESF (SEQ ID NO:21)	SLAFLPESF	--
HLA-B*14	--	SLAFLPESF	--
HLA-B*1501	--	SLAFLPESF	SLAFLPESFD
HLA-B*18	SLAFLPES (SEQ ID NO:22)	SLAFLPESF	--
HLA-B*2705	--	SLAFLPESF	--
HLA-B*37	LAFLPESF	SLAFLPESF	--
HLA-B*4402	--	SLAFLPESF	--
HLA-B*5101	LAFLPESF	LAFLPESFD	--
HLA-C*01041	LAFLPESF	--	--

Algoritmo: SYFPEITHI [red informática mundial en "syfpeithi.de/"], Puntuación mínima: 10

Algoritmo: NetMHCpan [red informática mundial en "cbs.dtu.dk/"], Umbral del 5 %

-- Ninguno

Tomado junto, los resultados proporcionados en la presente memoria demuestran que el p373-382 (SLAFLPESFD) sirve como un candidato cebador para vacunas contra el cáncer y terapéutica para pacientes de HER-2/neu. El p373-382 se trata *in vitro* mediante enzimas celulares y se une a una molécula de MHC de clase I prevalente, HLA-A2. Las células T CD8⁺ de sangre humana pueden generarse contra este polipéptido y estas células T pueden reconocer las células de cáncer de mama, que indica que las células de cáncer de mama están transformando de manera natural el p373-382 a partir del polipéptido HER-2/neu expresado y que presenta p373-382 en la superficie de las células en el contexto de HLA-A*0201.

Otras realizaciones

Se tiene que entender que, aunque se ha descrito la invención junto con su descripción detallada, la descripción anterior se destina a ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research <120> MÉTODOS Y MATERIALES PARA GENERAR CÉLULAS T CD8+ CON DESTREZA PARA RECONOCER CÉLULAS CANCERÍGENAS QUE EXPRESAN UN POLIPÉPTIDO HER2/NEU
5	<130> 07039-1120EP1 <140> Patente europea EP 13 749 730.1 < 141> 2013-02-15 <150> Patente de EE. UU. US 61/600,480 < 151> 2012-02-17
10	<160> 22 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0 <210> 1 < 211> 10 < 212> PRT
15	< 213> homo sapiens <400> 1 Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp 1510 <210> 2
20	< 211> 9 < 212> PRT < 213> homo sapiens <400> 2
25	Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu 15 <210> 3 < 211> 19 < 212> PRT < 213> homo sapiens

ES 2 664 725 T3

<400> 3

Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu
 1 5 10 15
 Ser Phe Asp

<210> 4

5 < 211> 11

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 4

10 Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe
 1 5 10

<210> 5

< 211> 11

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

15 <400> 5

Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 1 5 10

<210> 6

< 211> 11

20 < 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 6

Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
 1 5 10

25 <210> 7

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 7

Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser
1 5 10

<210> 8

< 211> 10

5 < 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 8

Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe
1 5 10

10 <210> 9

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 9

15 Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser
1 5 10

<210> 10

< 211> 9

< 212> PRT

20 < 213> homo sapiens

<400> 10

Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
1 5

<210> 11

25 < 211> 9

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 11

Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe
1 5

<210> 12

< 211> 8

5 < 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 12

Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
1 5

10 <210> 13

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

15 <220>
< 223> NH2 C-terminal

<400> 13

Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu
1 5 10 15
Ser Phe Asp

<210> 14

20 < 211> 19

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

25 < 223> COOH C-terminal

<400> 14

Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu
1 5 10 15
Ser Phe Asp

<210> 15

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

5

< 223> NH2 C-terminal

<400> 15

Phe Ala Gly Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser
 1 5 10 15
 Phe Asp

10

<210> 16

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

15

< 223> COOH C-terminal

<400> 16

Phe Ala Gly Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser
 1 5 10 15
 Phe Asp

20

<210> 17

< 211> 10

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 17

25

Phe Ala Gly Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu
 1 5 10

<210> 18

< 211> 10

< 212> PRT

ES 2 664 725 T3

< 213> homo sapiens

<400> 18

Gly Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe
1 5 10

5 <210> 19

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 19

10 Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15
Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
20

<210> 20

< 211> 9

< 212> PRT

15 < 213> virus de la influenza

<400> 20

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 21

20 < 211> 8

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 21

25 Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe
1 5

<210> 22

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido, en el que la secuencia de dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Una composición de vacuna que comprende un polipéptido, en la que la secuencia de dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 1.
3. La composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que dicha composición comprende un adyuvante.
4. La composición de vacuna según la reivindicación 3, en la que dicho adyuvante es una mezcla de aceite y agua.
5. La composición de vacuna según la reivindicación 3, en la que dicho adyuvante es Montanide ISA-51.
- 10 6. La composición de vacuna según la reivindicación 2, en la que dicha composición comprende IL-2, IL-12, GM-CSF o rintatolimod.
7. Un método *ex vivo* para aumentar el número de células T CD8⁺ que tienen la capacidad de destruir células cancerígenas que expresan un polipéptido HER2/neu, en el que dicho método comprende poner en contacto una población de células T CD8⁺ con un polipéptido, en el que la secuencia de dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 1.
- 15 8. Composición de vacuna que comprende un polipéptido, en la que la secuencia de dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 1, para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer que expresa un polipéptido HER2/neu, en el que dicha composición aumenta en un ser humano el número de células T CD8⁺ que tienen la capacidad de destruir células cancerígenas que expresen dicho polipéptido HER2/neu.
- 20 9. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, en la que dicho ser humano contiene células cancerígenas que expresan dicho polipéptido HER2/neu.
10. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, en la que dicha composición comprende un adyuvante.
11. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 10, en la que dicho adyuvante es una mezcla de aceite y agua.
- 25 12. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 10, en la que dicho adyuvante es Montanide ISA-51.
13. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, en la que dicha composición comprende IL-2, IL-12, GM-CSF o rintatolimod.
14. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, en la que dicho uso comprende administrar IL-2, IL-12, GM-CSF, rintatolimod o su combinación, a dicho ser humano.
- 30 15. La composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, en la que dicho uso comprende además administrar trastuzumab a dicho ser humano.

Figura 1A

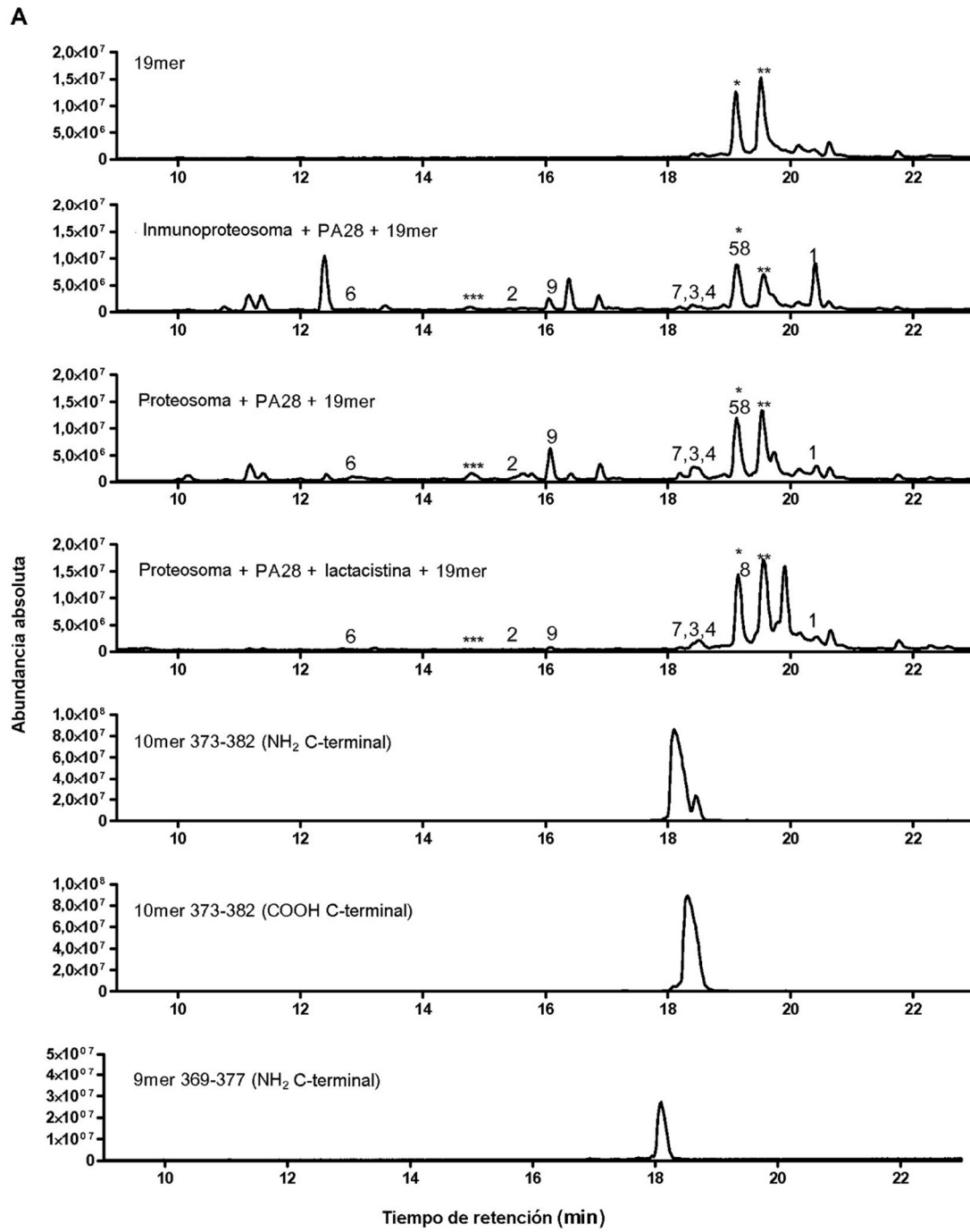


Figura 1B

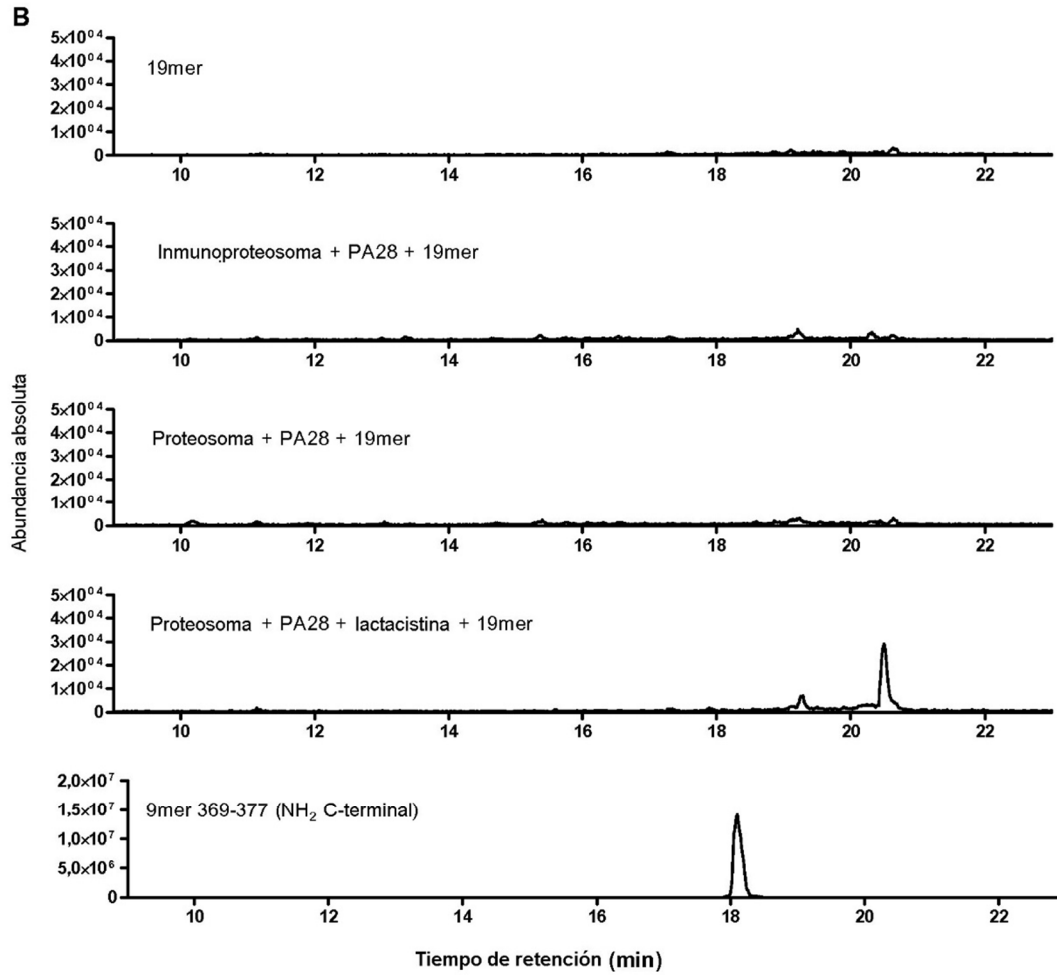


Figura 1C

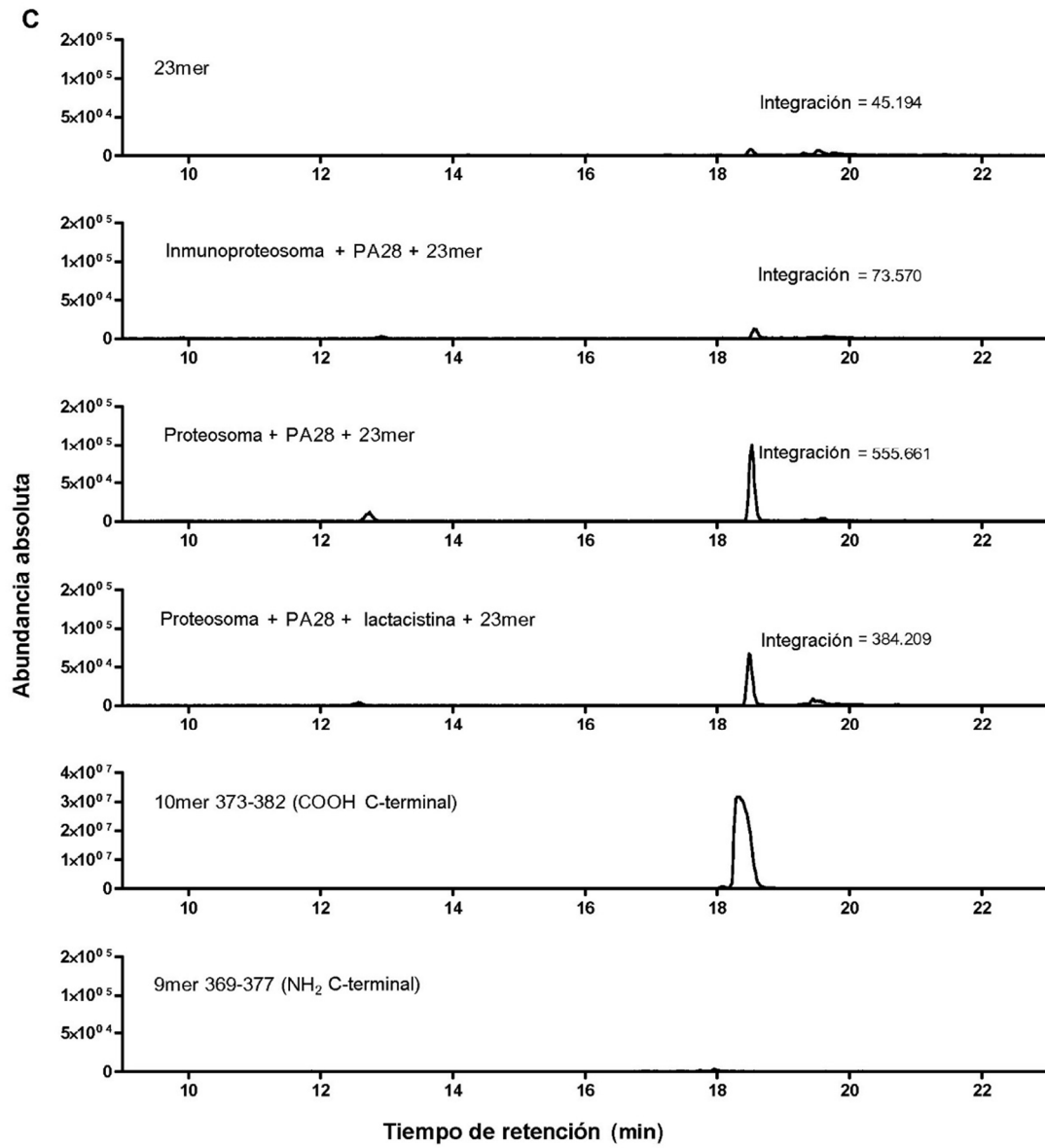
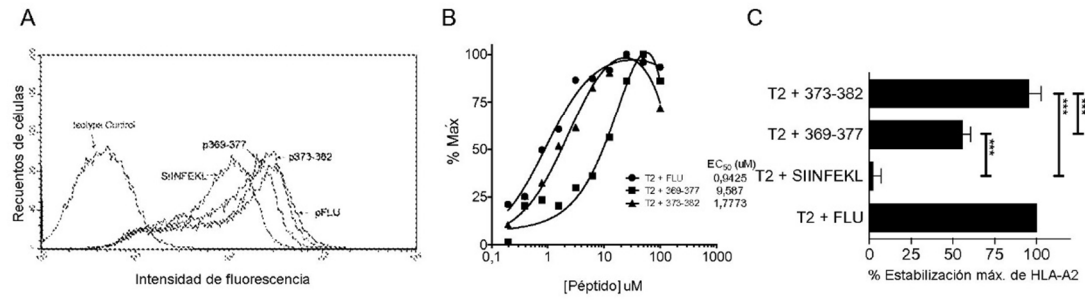


Figura 2



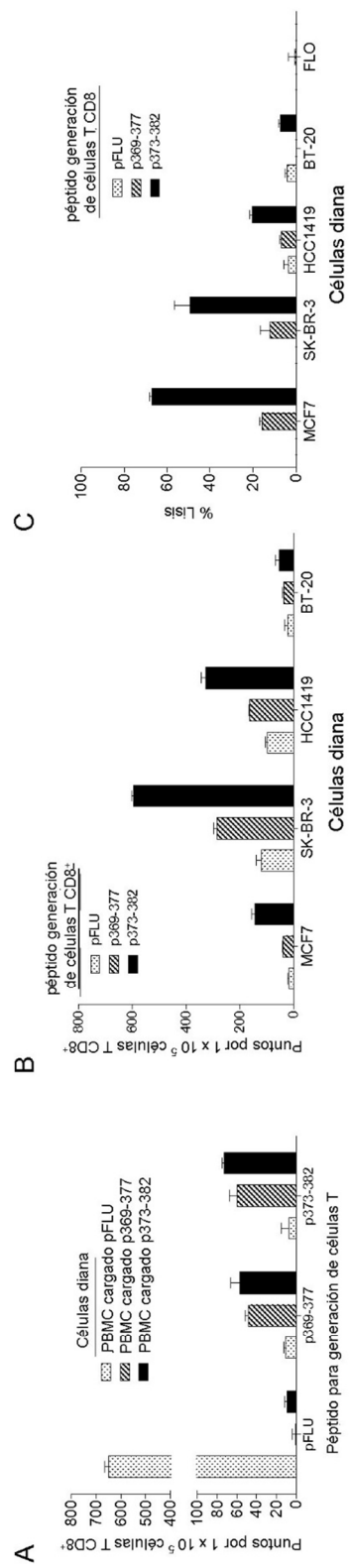


Figura 3

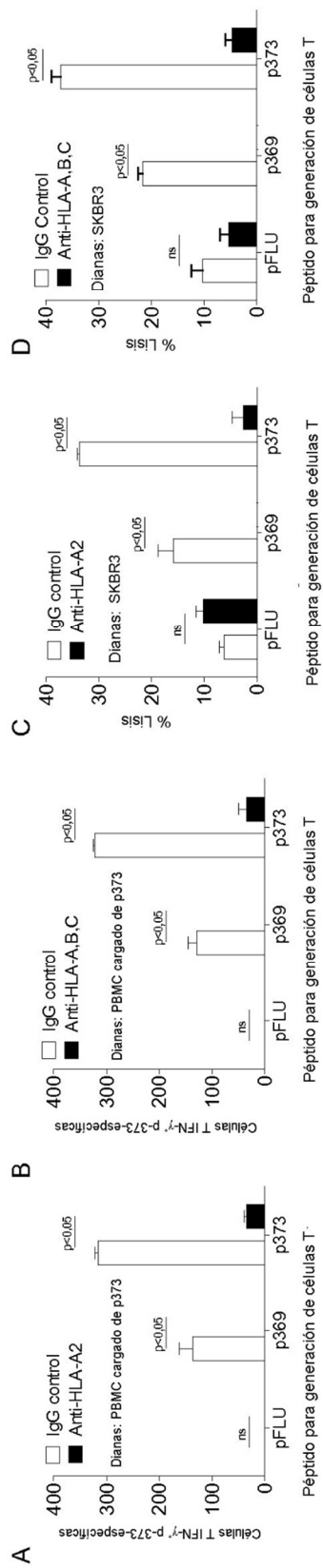


Figura 4