



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 771**

51 Int. Cl.:  
**A61K 6/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02742493 .6**

86 Fecha de presentación : **19.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1377251**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

54 Título: **Un método de terapia celular para tratamiento de tumores.**

30 Prioridad: **20.02.2001 US 270252 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2008**

73 Titular/es:  
**Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceuticals, Inc.**  
**1125 Trenton-Harbourton Road**  
**Titusville, New Jersey 08560, US**

72 Inventor/es: **Degraw, Juli;**  
**Moriarty, Ann;**  
**Leturcq, Didier, J.;**  
**Jackson, Michael, R.;**  
**Peterson, Per, A. y**  
**Heiskala, Marja**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 306 771 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**

Un método de terapia celular para tratamiento de tumores.

**5 Antecedentes de la invención**

El cáncer continúa siendo un problema principal de salud, a pesar del progreso significativo realizado en el área de su tratamiento. Los regímenes de tratamiento normalizados con quimioterapia, terapia con radiación, intervención quirúrgica y combinaciones de estos tres, a menudo no logran producir una cura de larga duración. En muchos casos, el paciente con cáncer que está siendo sometido a tratamiento a menudo vuelve a recaer en su afección después de un cierto período de tiempo, exacerbando adicionalmente el problema, la intensidad de estos regímenes de tratamiento para el paciente.

Otro factor que complica el desarrollo de un tratamiento para el cáncer es que se ha encontrado que los cánceres no están causados por un único agente o factor biológico, si no por una combinación de agentes o factores. A diferencia de la mayor parte de los tratamientos médicos en los que un único agente causal o evento es el foco del tratamiento, la terapia del cáncer requiere aplicar una pluralidad de factores biológicos.

En los últimos años, la investigación se ha dirigido a desarrollar terapias contra el cáncer que utilicen el propio sistema inmunitario del paciente. Uno de tales enfoques es la inmunoterapia adoptiva. La inmunoterapia adoptiva requiere utilizar las células del propio paciente para generar linfocitos T citotóxicos (CrL) para tratar un tumor o células cancerosas. No obstante, esta técnica no está demostrada en su mayor parte como régimen de tratamiento clínico viable para pacientes humanos. Aparte del problemas de la identificación de los epítomos apropiados con los que inmunizar los CrL, la tecnología actual no proporciona un método de presentación de un número suficiente de epítomos diferentes a las APC con el fin de dirigir adecuadamente los múltiples antígenos para tratar eficazmente el cáncer. La presente invención satisface las necesidades no satisfechas, así como también proporciona otras ventajas.

**Compendio de la invención**

La presente invención proporciona una célula presentadora de antígenos no natural (nnAPC) capaz de presentar de cuatro a diez péptidos diferentes simultáneamente, y métodos de fabricación de las nnACP.

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Esta figura es una representación gráfica de la interacción entre células CD8<sup>+</sup>, también conocidas como linfocitos T citotóxicos con células presentadoras de antígenos o células diana, en este caso células tumorales.

Figura 2, Paneles A y B: Esta figura es una representación gráfica de dos paneles de los mecanismos de citosis mediada por linfocitos.

Figura 3: Esta figura muestra el resultado de un experimento en el que se sometieron a ensayo varios péptidos diferentes en un análisis competitivo para identificar los aglutinantes peptídicos que se podrían utilizar para cargar múltiples péptidos en células de *Drosophila* que expresan moléculas de clase I vacías humanas.

Figura 4, Paneles A, B y C: Esta figura muestra el resultado de un experimento en el que se sometieron a ensayo tres péptidos de melanoma en cuanto a la capacidad para elevar los CTL cuando se añaden como epítomos individuales sobre células de *Drosophila*. En un único donante, se logró actividad de CTL para cada uno de los péptidos cuando se añadía solo a tres preparaciones de *Drosophila* diferentes. La especificidad de la respuesta se comparó con el péptido de control HBc, un aglutinante de alta afinidad.

Figura 5, Paneles A, B y C: Esta figura muestra los resultados de una serie de experimentos en los que se añadieron hasta cuatro péptidos diferentes a células de *Drosophila* individuales. Se observó la actividad de los CTL en cada uno de los péptidos representados después de un protocolo de estimulación de tres semanas y se representa gráficamente en esta figura.

Figura 6, Paneles A, B y C: Esta figura muestra la actividad de los CTL después de tres protocolos de estimulación primaria *in vitro* diferentes.

Figura 7, Paneles A y B: Esta figura compara la capacidad de las células de *Drosophila* frente a las células dendríticas para lograr respuestas de CTL para un epítomo peptídico individual siguiendo protocolos de estimulación normalizados.

Figura 8: Esta figura muestra que las células dendríticas que presentan un fenotipo maduro o inmaduro no eran tan eficaces como las células de *Drosophila* al lograr respuestas de CTL específicas cuando se utilizaban péptidos definidos para pulsar las células.

Figura 9, Paneles A, B y C: Esta figura muestra la actividad de los CTL generados por un único donante para tres protocolos de estimulación *in vitro* diferentes que presentan cuatro péptidos.

## ES 2 306 771 T3

Figura 10: Esta figura muestra la actividad de los CTL generados para diez (10) péptidos cargados, combinados, en células de *Drosophila*.

Figura 11: Esta figura muestra la capacidad de unión peptídica de los péptidos HER-2 (826, 835, 861 y 863) en células de *Drosophila* transfectadas con moléculas de HLA-A2.1 clase I humanas.

Figura 12: Esta figura demuestra la respuesta anti-peptídica y anti-tumoral para las células efectoras específicas de MART-1. Las células T2 se cargaron con el péptido MART-1 o un control negativo (HBc). Malme3M es una línea de melanoma, Malme3 es una línea celular no tumoral.

Figura 13, Paneles A y B: Esta figura muestra la tinción tetramérica de las células efectoras de CD8 específicas de HER-2 de dos donantes diferentes.

Figura 14: Esta figura revela la respuesta anti-peptídica para las células efectoras HER-2 evaluada en células T2 cargadas de péptido.

Figura 15, Paneles, A, B, C, D: Esta figura demuestra el aumento de la destrucción de una línea celular tumoral de ovario (HTB-77) cuando se transfectó con HLA-A2.1.

Figura 16: Esta figura muestra el aumento de la destrucción de la línea celular de cáncer de mama (HTB-133) cuando se transfectó con HLA-A2.1.

Figura 17: Esta figura muestra que se requiere pre-tratamiento con IFN $\gamma$  para demostrar la lisis de la línea celular tumoral HTB-77/A2.1.

Figura 18, Paneles A y B: Este gráfico demuestra que la expresión en superficie de HLA-A2 y HER-2 no resulta afectada por la inducción con IFN $\gamma$  en las dos líneas celulares (HTB-77 y HTB-77/A2.1).

Figura 19: Este gráfico muestra qué niveles de ARNm de proteínas son elevados en las células HTB-77/A21 tras la inducción con IFN $\gamma$ .

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para preparar una suspensión CD8<sup>+</sup> para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer. El método, que se define en la reivindicación 1, comprende:

- a. preparar una línea celular presentadora de antígenos no natural (nnAPC), donde dicha nnAPC presenta de 4 a 10 moléculas peptídicas diferentes asociadas con el cáncer, simultáneamente donde cada péptido tiene aproximadamente de seis a doce aminoácidos de longitud;
- b. estimular las células CD8<sup>+</sup> cosechadas a partir de dicho sujeto o donante adecuado con dicha línea celular nnAPC;
- c. añadir dichas células CD8<sup>+</sup> a un medio que contiene una citoquina, seleccionada entre IL-2, IL-7 y medio de crecimiento acondicionado (CGM), preferiblemente, IL-2, o IL-2 e IL-7 combinadas;
- d. mezclar monocitos de sangre periférica no suspendidos, o alternativamente, monocitos de sangre periférica empobrecidos en CD8 recogidos de dicho sujeto o donante adecuado con aproximadamente 10 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de uno de dichos péptidos;
- e. irradiar dicha suspensión de monocitos de sangre periférica con una dosis suficiente de radiación y necesaria para evitar la proliferación de estas células en la suspensión, tal como una dosis en el intervalo de aproximadamente 3.000 a 7.000 rads, preferiblemente aproximadamente 5.000 rads,
- f. aislar los monocitos de sangre periférica adherentes;
- g. cargar dichos monocitos de sangre periférica adherentes con aproximadamente 1 mg/ml a 50  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los péptidos mencionados;
- h. combinar dichas células CD8<sup>+</sup> con dichos monocitos de sangre periférica adherentes en una proporción de aproximadamente diez células CD8<sup>+</sup> por un monocito de sangre periférica;
- i. estimular opcionalmente dicha suspensión combinada de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica durante aproximadamente seis a siete días;
- j. estimular opcionalmente dicha suspensión de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica con IL-2 e IL-7 en el medio; y

## ES 2 306 771 T3

- k. analizar opcionalmente la suspensión CD8<sup>+</sup> en cuanto a la actividad de los CTL adecuados, y opcionalmente analizar la pureza, esterilidad y contenido en endotoxinas de los CTL.

5 Otra realización de la presente invención proporciona un método para preparar una suspensión CD8<sup>+</sup> como se define en la reivindicación 8, que comprende:

- a. preparar una línea de células presentadoras de antígenos no natural (nnAPC), donde dicha nnAPC presenta de 4 a 10 moléculas peptídicas diferentes asociadas con el cáncer simultáneamente;
- 10 b. estimular dichas células CD8<sup>+</sup> cosechadas de dicho sujeto con dicha línea de células nnAPC durante aproximadamente seis a siete días;
- c. estimular dichas células CD8<sup>+</sup> con IL-2 e IL-7 en el medio;
- 15 d. mezclar los monocitos de sangre periférica no suspendidos o monocitos de sangre periférica empobrecidos en CD8<sup>+</sup> recogidos de dicho sujeto con aproximadamente 20 µg/ml de cada péptido;
- e. irradiar dichos monocitos de sangre periférica con aproximadamente 5.000 rads de radiación γ;
- 20 f. aislar los monocitos de sangre periférica adherentes;
- g. cargar dichos monocitos de sangre periférica adherentes con aproximadamente 1 a 50 µg/ml de cada uno de dichos péptidos;
- 25 h. combinar dichas células CD8<sup>+</sup> con dichos monocitos de sangre periférica adherentes en una proporción de aproximadamente diez células CD8<sup>+</sup> por un monocito de sangre periférica;
- i. estimular dicha suspensión combinada de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica durante aproximadamente seis a siete días;
- 30 j. estimular dicha suspensión de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica con IL-2 e IL-7 en el medio; y
- 35 k. analizar la suspensión CD8<sup>+</sup> en cuanto a la actividad, pureza, esterilidad y contenido en endotoxinas de CTL adecuados.

40 Otra realización de la presente invención proporciona un método para proporcionar una suspensión CD8<sup>+</sup> como se define en la reivindicación 10, que comprende:

- a. preparar una línea de células presentadoras de antígenos no natural (nnAPC), donde dicha nnAPC presenta de 4 a 10 moléculas peptídicas diferentes asociadas con melanoma simultáneamente donde cada péptido tiene de ocho a diez aminoácidos de longitud;
- 45 b. estimular las células CD8<sup>+</sup> cosechadas a partir de dicho sujeto con dicha línea de células nnAPC durante aproximadamente seis a siete días;
- c. estimular dichas células CD8<sup>+</sup> IL-2 e IL-7 en el medio;
- 50 d. mezclar monocitos de sangre periférica no suspendidos o monocitos de sangre periférica empobrecidos en CD8<sup>+</sup> recogidos de dicho sujeto con aproximadamente 20 µg/ml de cada uno de los péptidos que presenta nnAPC;
- 55 e. irradiar dicha suspensión de monocitos de sangre periférica empobrecidos en CD8 con aproximadamente 5.000 rads de radiación γ;
- f. aislar los monocitos de sangre periférica adherentes;
- g. cargar dichos monocitos de sangre periférica adherentes con aproximadamente de cada uno de dichos péptidos;
- 60 h. combinar dichas células CD8<sup>+</sup> con dichos monocitos de sangre periférica adherentes en una proporción de aproximadamente diez células CD8<sup>+</sup> por un monocito de sangre periférica;
- 65 i. estimular dicha suspensión combinada de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica durante aproximadamente seis a siete días;

## ES 2 306 771 T3

- j. estimular dicha suspensión de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica con IL-2 e IL-7 en el medio; y
- k. analizar la suspensión CD8<sup>+</sup> en cuanto a la actividad, pureza, esterilidad y contenido en endotoxinas de los CTL adecuados.

Otra realización de la presente invención es una nnAPC como se define en la reivindicación 12, que presenta los siguientes péptidos, Tirosinasa<sub>369-377</sub>, Tirosinasa<sub>207-216</sub>, gp100<sub>209-217</sub>, gp100<sub>154-167</sub>, MART-1<sub>27-35</sub>, HER-2/neu<sub>769-797</sub>, HER-2/neu<sub>369-377</sub>, C-lectin<sub>8-16</sub>, Pec60<sub>20-29</sub>, y Pec60<sub>25-33</sub>.

Otra realización de la presente invención proporciona un método para fabricar células presentadoras de antígenos no naturales (nnAPC) capaces de presentar hasta diez moléculas peptídicas diferentes simultáneamente, comprendiendo dicho método la etapa:

- a. preparar una línea celular de insecto a partir de huevos de *Drosophila melanogaster*; alternativamente preparar una línea celular de insecto para expresar moléculas de MHC de Clase I humanas y moléculas de adhesión co-estimuladoras;
- b. hacer crecer dichas células de insecto en un medio que es adecuado para desarrollar células de insecto, preferiblemente Medio para *Drosophila* de Schneider<sup>®</sup>;
- c. elaborar un plásmido pRmHa-3 a partir de un vector de expresión pRmHa-1, donde dicho plásmido pRmHa-3 incluye un promotor de metalotioneína, secuencias consenso de respuesta a metales y un gen de alcohol deshidrogenasa que porta una señal de poliadenilación aislada de *Drosophila melanogaster*;
- d. insertar en dicho plásmido pRmHa-3 ADN complementario para HLA A21 de clase I humana, B7.1, B7.2, ICAM-1, microglobulina  $\beta$ -2 y LFA-3, donde A2.1 puede ser sustituido por cualquier secuencia de ADN de clase I humana;
- e. transfectar dichas células de insecto con un plásmido pshneo y dicho plásmido pRmHa-3 que contiene ADN complementario; y,
- f. crear nnAPC poniendo en contacto dichas células de insecto con CuSO<sub>4</sub> para inducir la expresión de los genes transfectados en dichas células de insecto.

Las células de insecto de la presente invención se hacen crecer en un medio adecuado para desarrollar células de insecto, referido en adelante como "medio de crecimiento de insecto". Los medios de crecimiento de insecto son asequibles comercialmente de numerosos proveedores, tales como, Medio de *Drosophila* de Schneider<sup>®</sup>, Medio de insecto de Grace, y Medio de Insecto TC-100. Alternativamente, los medios de crecimiento de insecto pueden ser preparados por un experto normal en la técnica. Típicamente los medios incluirán los componentes necesarios para promover y sostener el crecimiento de las células de insecto, tales como, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, y fosfato de sodio), aminoácidos, diversos carbohidratos y especies químicas (Imogene Schneider, Exp. Zool. (1964) 156(1): pg. 91). Alternativamente, los medios también pueden incluir vitaminas, minerales, y otros componentes que ayuden al crecimiento de las células de insecto.

La siguiente es una lista de abreviaturas y definiciones utilizadas en la presente memoria.

### Abreviaturas

APC	Células presentadoras de antígenos
CD8 <sup>+</sup>	Células T CD8 <sup>+</sup>
CTL	Linfocitos T citotóxicos
E	Efector
Fas	También conocido como CD95, epítipo de las células T
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IL	Interleuquina

## ES 2 306 771 T3

	LAK	Células asesinas activadas por linfoquinas
	LFA	Antígenos asociados a la función de los linfocitos
5	MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
	mnAPC	Célula presentadora de antígenos no natural
	NP	Proteína nuclear
10	PBMC	Célula mononuclear de la sangre periférica
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
15	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
	RWJPRI	The R. W. Johnson Pharmaceutical Research Institute
20	T	Diana
	TCR	Receptor de antígeno de las células T
25	TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor

La siguiente es una lista de las abreviaturas utilizadas en la presente memoria para diversos epítomos peptídicos. Los restos aminoácido individuales se identifican de acuerdo con un código de una única letra que es fácilmente conocido y utilizado por aquellos expertos normales en la técnica.

	<b>Aminoácido</b>	<b>Abreviaturas</b>	
		<i>3-Letras</i>	<i>1-Letra</i>
40	alanina	ala	A
	valina	val	V
45	leucina	leu	L

ES 2 306 771 T3

	Aminoácido	Abreviaturas	
		3-Letras	1-Letra
5			
	isoleucina	ile	I
10	prolina	pro	P
	fenilalanina	phe	F
15	triptófano	tyr	W
	metionina	met	M
20	glicina	gly	G
	serina	ser	S
25	treonina	thr	T
	cisteína	cys	C
30	tirosina	tyr	Y
	asparragina	asn	N
35	glutamina	gln	Q
	ácido aspártico	asp	D
40	ácido glutámico	glu	E
	lisina	lys	K
45	arginina	arg	R
	histidina	his	H

50 *Abreviaturas de Epítomos Peptídicos*

Según se utiliza en la presente memoria el término “tirosinasa 369-377” o “tirosinasa<sub>369-377</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos YMNGTM5QV (SEQ ID NO: 1). También está incluido en esta definición el péptido de la secuencia YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 2), que resulta de un evento post-traducciona que modifica el resto aminoácido “N” de la secuencia YMNGTMSQV (SEQ ID NO: 1) a “D” dando como resultado la secuencia de aminoácidos YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 2) (Skipper *et al.*, J. Exp. Med. (1996) 183:527-534).

60 Según se utiliza en la presente memoria el término “tirosinasa 207-216” o “tirosinasa<sub>207-216</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos FLPWHRLFLL (SEQ ID NO: 3).

Según se utiliza en la presente memoria el término “gp100 209-217” o “gp100<sub>209-217</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos ITDQVPFSV (SEQ ID NO: 4).

65 Según se utiliza en la presente memoria el término “gp100 154-162” o “gp100<sub>154-162</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos KTWGQYWQV (SEQ ID NO: 5).

## ES 2 306 771 T3

Según se utiliza en la presente memoria el término “MART-1 27-35” o “MART-1<sub>27-35</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos AAGIGILTV (SEQ ID NO: 6).

5 Según se utiliza en la presente memoria el término “HER-2/neu 789-797” o “HER-2/neu<sub>789-797</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos CLTSTVQLV (SEQ ID NO: 7).

Según se utiliza en la presente memoria el término “HER-2/neu 369-377” o “HER-2/neu<sub>369-377</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos KIFGSLAFL (SEQ ID NO: 8).

10 Según se utiliza en la presente memoria el término “C-lectina 8-16” o “C-lectin<sub>8-16</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos KMASRSMRL (SEQ ID NO: 9).

Según se utiliza en la presente memoria el término “Pec60 20-29” o “Pec60<sub>20-29</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos ALALAALLW (SEQ ID NO: 10).

15 Según se utiliza en la presente memoria el término “Pec60 25-33” o “Pec60<sub>25-33</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos ALLVVDREV (SEQ ID NO: 11).

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término “péptido CD8 59-70” o “péptido CD8<sub>59-70</sub>” hace referencia a la secuencia de aminoácidos AAEGLDTQRFSG (SEQ ID NO: 12).

### *Términos y Definiciones*

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término “inmunoterapia adoptiva” hace referencia a la administración de linfocitos T donantes o autólogos para el tratamiento de una enfermedad o condición de enfermedad, donde la enfermedad o condición de enfermedad da como resultado una respuesta inmunitaria insuficiente o inadecuada que está asociada normalmente con moléculas HLA de Clase I. La inmunoterapia adoptiva es un tratamiento apropiado para cualquier enfermedad o estado de enfermedad en el que se ha demostrado que se logra la eliminación de células infectadas o transformadas por medio de los CTL. Por ejemplo, las enfermedades o estados de enfermedad incluyen pero no están limitados a cáncer y/o tumores, tales como, melanoma, cáncer de próstata, de mama, colo-rectal, de estómago, de garganta y de cuello, pancreático, cervical, de ovario, de hueso, leucemia y de pulmón; infecciones virales, tales como hepatitis B, hepatitis C, virus de inmunodeficiencia humana; infecciones bacterianas, tales como tuberculosis, lepra y listeriosis, e infecciones parásiticas tales como malaria. Según se utiliza en la presente memoria, el término “B7.1” hace referencia a una molécula co-estimuladora asociada con células presentadoras de antígenos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “BCNU” hace referencia a carmustina, también conocida como, 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término “BSE” hace referencia a la encefalitis espongiforme bovina.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “CD” hace referencia a agrupaciones de diferenciación, linfocitos T (originalmente), linfocitos B, monocitos, macrófagos, y granulocitos agrupados por epítopos antigénicos y función.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término “DTIC” hace referencia a dacarbazina, 5-(3,3-dimetil-triazeno)imidazolo-4-carboxamida.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “*ex vivo*” o “terapia *ex vivo*” hace referencia a una terapia en la que se obtienen materiales biológicos, típicamente células, de un paciente o una fuente alternativa adecuada, tales como, un donante adecuado, y se modifican, de manera que se pueden utilizar las células modificadas para tratar un estado patológico que mejorará mediante la liberación a largo plazo o constante de los beneficios terapéuticos producidos por las células modificadas. El tratamiento incluye la reintroducción de los materiales biológicos modificados, obtenidos a partir del paciente o de la fuente alternativa, en el paciente. Una ventaja de la terapia *ex vivo* es la capacidad para proporcionar al paciente las ventajas del tratamiento, sin exponer al paciente a los efectos colaterales no deseados del tratamiento. Por ejemplo, las citoquinas se administran a menudo a pacientes con cáncer o infecciones virales para estimular la expansión de los CTL del paciente. Sin embargo, las citoquinas a menudo ocasionan el comienzo de síntomas como gripe en los pacientes. En un procedimiento *ex vivo*, se utilizan citoquinas para estimular la expansión de los CTL fuera del organismo del paciente, y se ahorra al paciente la exposición y los consiguientes efectos secundarios de las citoquinas. Alternativamente en situaciones o en condiciones adecuadas, cuando sea apropiado y cuando el sujeto pueda obtener un beneficio, se puede tratar al sujeto concurrentemente con bajos niveles de dosificación de interferón  $\gamma$ , interferón  $\alpha$  y/o IL-2. El efecto esperado de los interferones es posiblemente sensibilizar las células tumorales a la lisis por los CTL específicos del antígeno, y el efecto de la IL-2 es posiblemente potenciar la persistencia de los CTL específicos del antígeno.

65 Según se utiliza en la presente memoria, el término “HEPES” hace referencia a tampón de ácido N-2-hidroxietil-piperazino-N’2-etanosulfónico.

## ES 2 306 771 T3

Según se utiliza en la presente memoria, el término “HLA-A2.1” hace referencia a una molécula de Clase I de HLA encontrada en aproximadamente en el 45% de los Caucásicos.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término “MART-1” o “(antígeno de melanoma reconocido por las Células T-1” hace referencia a un antígeno asociado con el melanoma. Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico, así como diversas características de este antígeno se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.523, presentada el 30 de Noviembre de 1.999 titulada “*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*”; Patente de los Estados Unidos Núm. 5.874.560, presentada el 23 de Febrero de 1.999 titulada “*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*”; y la Patente de los Estados Unidos  
10 Núm. 5.844.075, presentada el 1 de Diciembre de 1.998 titulada “*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*”. En particular, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.523 describe las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos completas de MART-1 en la Figura 1 como SEQ ID NO: 1, y SEQ ID NO: 2, respectivamente.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término “MAGE” hace referencia a un antígeno asociado con el melanoma. Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico, así como diversas características de este antígeno se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.140.050, presentada el 31 de Octubre de 2.000 titulada “*Methods for Determining Breast Cancer and Melanoma by Assaying for a Plurality of Antigens Associated Therewith*”; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.759.783, presentada el 2 de Junio de 1.998 titulada “*Method of Screening for Cancer by Detecting Messenger RNA for a MAGE-XP Gene*”; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.662.907, presentada el 2 de Septiembre de 1.997 titulada “*Induction of Anti-Tumor Cytotoxic T Lymphocytes in Humans Using Synthetic Peptide Epitopes*”.

25 Según se utiliza en la presente memoria, el término “MPC-10” hace referencia a un concentrador de partículas magnéticas.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “células NK” hace referencia a células asesinas naturales.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término “OKT3” hace referencia a ORTHOCLONE OKT3, muromonab-CD3, anticuerpo monoclonal anti-CD3.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “TAP-1,2” hace referencia a Transportador Asociado con el Procesamiento de Antígenos 1,2.

35 Según se utiliza en la presente memoria, el término “células Th” hace referencia células T Coadyuvantes, CD4+.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “tirosinasa” hace referencia a una proteína asociada con el melanoma (Brichard *et al.*, J. Exp. Med. (1993) 178:489-495; Robbins *et al.*, Cancer Res. (1994) 54: 3124-3126). La patente de los Estados Unidos Núm. 5.843.648, presentada el 1 de Diciembre de 1.998 titulada “*P15 and Tyrosinase  
40 Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*” describe péptidos antigénicos y ácidos polinucleicos asociados relacionados con la tirosinasa en la Figura 7, Paneles A a D. La patente de los Estados Unidos Núm. 5.487.974 presentada el 30 de Enero de 1.996 titulada “*Method for Detecting Complexes Containing Human Leukocyte Antigen A2 (HLA-A2) Molecules and a Tyrosinase Derived Peptide on Abnormal Cells*” describe un péptido adicional que está asociado con la tirosinasa y el melanoma en el Ejemplo 9, en la Tabla 3.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término “gp100” hace referencia a un antígeno de melanoma reconocido por linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). El TIL que reconoce gp100 está asociado con el rechazo tumoral *in vivo* (Bakker *et al.*, J. Exp. Med. (1994) 179:1005-1009; Kawakami *et al.*, J. Immunol. (1995) 154:3961-3968). Los péptidos antigénicos relacionados con gp100 se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.523, presentada el 30 de Noviembre de 1.999 titulada “*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic  
50 Methods*”; la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.874.560, presentada el 23 de Febrero de 1.999 titulada “*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*”; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.844.075, presentada el 1 de Diciembre de 1.998 titulada “*Melanoma Antigens and Their Use in Diagnostic and Therapeutic Methods*”. En particular, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.994.523 describe secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos relacionadas con gp100 en las Figuras 4 y 5, respectivamente. Asimismo se describen péptidos antigénicos derivados de las secuencias de aminoácidos, incluyendo aquellas identificadas como SEQ ID NO:  
55 27, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, y 41.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “melanoma” hace referencia a, pero no está limitado a, melanomas, melanomas metastásicos, melanomas derivados de melanocitos o melanocitos relacionados con células de nevus, melanosarcomas, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanoma *in situ*, melanoma de diseminación superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanoma invasivo o síndrome de lunar y melanoma atípico familiar (FAM-M). Tales melanomas en mamíferos pueden estar causados por anomalías cromosómicas, crecimiento degenerativo y trastornos del desarrollo, agentes mitogénicos, radiación ultravioleta (UV),  
65 infecciones virales, expresión tisular inapropiada de un gen, alteraciones en la expresión de un gen, y presentación sobre una célula, o agentes carcinogénicos. Los melanomas anteriormente mencionados se pueden diagnosticar, evaluar o tratar mediante los métodos descritos en la presente solicitud.

## ES 2 306 771 T3

Según se utiliza en la presente memoria, el término “C-lectina” hace referencia a un péptido con la secuencia que se ha encontrado que está asociada con el cáncer de ovario.

5 Según se utiliza en la presente memoria, el término “complejo principal de histocompatibilidad” o “MHC” es una designación genérica que se pretende que abarque los sistemas de antígenos de histocompatibilidad descritos en diferentes especies incluyendo los antígenos leucocitarios humanos (HLA).

10 Según se utiliza en la presente memoria, los términos “epítipo”, “epítipo peptídico”, “péptido antigénico” y “péptido inmunogénico” hacen referencia a un péptido derivado de un antígeno capaz de causar una respuesta inmunitaria celular en un mamífero. Tales péptidos también pueden ser reactivos con anticuerpos de animales inmunizados con los péptidos. Tales péptidos pueden tener de aproximadamente cinco a veinte aminoácidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente ocho a quince aminoácidos de longitud, y muy preferiblemente de aproximadamente nueve a diez aminoácidos de longitud.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término “Pec60” hace referencia a un péptido de la secuencia que se ha encontrado que está asociada con el cáncer de ovario y mama.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término “análogo” incluye cualquier polipéptido que tenga una secuencia de restos aminoácido sustancialmente idéntica a las secuencias de la presente invención, mostrada específicamente en la presente memoria en la que uno o más restos han sido sustituidos conservativamente por un resto funcionalmente similar y que presenta los aspectos funcionales de la presente invención como se describe en la presente memoria. Los ejemplos de las sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un resto alcalino tal como lisina, arginina 25 o histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “sustitución conservativa” también incluye el uso de un resto transformado químicamente en lugar de un resto no transformado.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término “derivado químico” hace referencia a un polipéptido sujeto que tiene uno o más restos transformados químicamente mediante reacción de un grupo lateral funcional. Los ejemplos de tales moléculas transformadas incluyen por ejemplo, aquellas moléculas en las que los grupos amino libres han sido transformados para formar hidroclouros de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoilo, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden ser transformados para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden ser transformados para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno del imidazol de la histidina puede ser transformado para formar N-im-bencilhistidina. También están incluidos como derivados químicos aquellas proteínas o péptidos que contienen uno o más derivados aminoácido de origen natural de los veinte aminoácidos patrón. Por ejemplo: la 4-hidroxiprolina puede ser sustituida por prolina; la 5-hidroxilisina puede ser sustituida por lisina; la 3-metilhistidina 40 puede ser sustituida por histidina; la homoserina puede ser sustituida por serina; y la ornitina puede ser sustituida por lisina. Las proteínas o polipéptidos de la presente invención también incluyen cualquier polipéptido que tenga una o más adiciones y/o deleciones o restos relativos a la secuencia de un polipéptido cuya secuencia está codificada por la correspondiente secuencia de ácido nucleico de la presente invención, con tal que se mantenga la actividad requisito.

45 Según se utiliza en la presente memoria, el término “HER-2/neu” hace referencia a un oncogén, que expresa o expresa en exceso, una o más proteínas del oncogén de tipo receptor, asociadas a la membrana. Entre los cánceres que se ha encontrado que están asociados con la expresión o la expresión en exceso de HER-2/neu se encuentran ciertos cánceres de mama, estómago, ovario, colon o glándulas salivares. El oncogén HER-2/neu es un miembro de la familia de oncogenes de la proteína tirosina quinasa y comparte un alto grado de homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se ha demostrado que HER-2/neu juega un papel en el crecimiento y/o diferenciación celular. HER 2/neu parece inducir malignidades por medio de mecanismos cuantitativos que resultan de una expresión incrementada o desregulada de un producto génico esencialmente normal. La patente de los Estados Unidos Núm. 6.075.122, presentada el 13 de Junio de 2.000 titulada “*Immune Reactivity to HER-2/neu Protein for Diagnosis and Treatment of Malignancies in Which the HER-2/neu Oncogene is Associated*” describe péptidos que 55 logran respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> en la columna 12, línea 31 a la columna 13, línea 7.

HER-2/neu (p185) es el producto proteico del oncogén HER-2/neu. El gen HER-2/neu es amplificado y la proteína HER-2/neu es expresada en exceso en una variedad de cánceres incluyendo cáncer de mama, ovario, colon, pulmón y próstata. HER-2/neu está relacionado con la transformación maligna. Se encuentra en 50% a 60% de los carcinomas 60 ductales *in situ* y 20% a 40% de todos los cánceres de mama, así como una fracción sustancial de adenocarcinomas que se originan en los ovarios, próstata, colon y pulmón. HER-2/neu está íntimamente asociado no solamente con el fenotipo maligno, si no también con la agresividad de la malignidad, que se encuentra en un cuarto de todos los cánceres de mama invasivos. La expresión en exceso de HER-2/neu se corresponde con una prognosis pobre tanto en cáncer de mama como de ovario. HER-2/neu es una proteína transmembrana con una masa molecular relativa de 185 65 kd que tiene aproximadamente 1.255 aminoácidos (aa) de longitud. Tiene un dominio de unión extracelular (ECD) de aproximadamente 645 aa, con una homología del 40% con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un dominio ancla transmembrana altamente hidrófobo (TMD), y un dominio citoplásmico carboxi terminal (CD) de aproximadamente 580 aminoácidos con una homología del 80% con EGFR.

La investigación en marcha que implica a los oncogenes ha identificado al menos cuarenta oncogenes operativos en células malignas y responsables, o asociados con, la transformación. Los oncogenes se han clasificado en grupos diferentes basándose en la supuesta función o localización de sus productos génicos (tales como la proteína expresada por el oncogén). Se cree que los oncogenes son esenciales para ciertos aspectos de la fisiología celular normal.

5

El cáncer continúa siendo un problema principal de la salud, a pesar del progreso significativo realizado en el área de su tratamiento. Los regímenes de tratamiento normalizados de quimioterapia, terapia con radiación, intervención quirúrgica y combinaciones de las tres, a menudo no logran producir una curación de larga duración. En muchos casos, el paciente con cáncer que está siendo sometido a tratamiento a menudo recae de nuevo en el mismo estado de enfermedad después de cierto período de tiempo, exacerbando adicionalmente el problema. En el caso del melanoma, no se ha logrado una cura para el melanoma metastásico utilizando la quimioterapia convencional. Se ha informado de tasas de respuesta del 35% al 50% con el régimen de Dartmouth de combinación de quimioterapia (DTIC, cis-platino, BCNU y tamoxifeno), pero la duración de la supervivencia se ha quedado en seis a diez meses. Se ha informado de altas tasas de remisión para la quimioterapia "con intensidad de alta dosis" agresiva y repleción de la hematopoyesis con trasplantes de médula ósea autólogos. Sin embargo, la duración media de la supervivencia era corta, de aproximadamente cuatro meses.

10

Rosenberg y sus colegas han intentado utilizar una infusión de linfocitos activados como tratamiento para diversos cánceres. Inicialmente, se utilizaron células asesinas activadas por linfoquinas (LAK) y más tarde linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) activados *ex vivo* con IL-2, pero la evidencia de eficacia es equívoca. De hecho, las pruebas clínicas controladas no han logrado mostrar una ventaja en el uso de células activadas *ex vivo* sobre la administración directa de IL-2 a los pacientes. De este modo, los beneficios de la terapia con LAK y TIL son marginales, y los efectos secundarios son típicamente tan graves que muchas pruebas se han interrumpido prematuramente.

20

Los estudios en modelos de tumores en ratones han demostrado que la inmunoterapia adoptiva, inmunización *in vivo* de células T específicas para uno o varios antígenos tumorales, es muy eficaz con una toxicidad mínima. Un obstáculo principal para aplicar esta estrategia al tratamiento de tumores humanos es la identificación de antígenos inmunogénicos que vuelvan las células tumorales susceptibles a la destrucción mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL). El aislamiento de células T reactivas a tumores de pacientes con melanoma ha conducido a la identificación de algunos antígenos tumorales (epítomos) contra los cuales están dirigidos los CTL. Estos incluyen tirosinasa (Brichard *et al.*, J. Exp. Med. (1993) 178:489-495; Robbins *et al.*, Cancer Res. (1994) 54:3124-3126), MART 1/Melan A (Kawakami *et al.*, J. Exp. Med. (1994) 180:347-352), gp 100 (Bakker *et al.*, J. Exp. Med. (1994) 179:1005-1009; y Kawakami *et al.*, J. Immunol. (1995) 154:3961-3968) y MAGE (Gaugler *et al.*, J. Exp. Med. (1994) 179:921-930). De estos, la tirosinasa y MART-1 son expresados casi universalmente en melanomas y de este modo son la elección lógica para la inmunoterapia adoptiva.

25

En los últimos años, se han observado mejoras significativas en la supervivencia del orden de varios años en un pequeño porcentaje de pacientes con melanoma a los que se está administrando terapia inmunológica. Esta incluye la inmunoterapia específica activa con "vacunas contra el cáncer" así como el uso de reforzantes no específicos del sistema inmunitario tales como citoquinas, como IL-2, interferón  $\alpha$  e interferón  $\gamma$ . No obstante, el beneficio de las citoquinas es reducido por los efectos secundarios que a menudo acompañan su uso, tales como, náuseas y fiebre.

40

Las células T citolíticas (CD8<sup>+</sup>) son la principal línea de defensa frente a las infecciones virales. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> reconocen y destruyen específicamente las células anfitrionas que son infectadas por un virus. Teóricamente, debe ser posible aprovechar el sistema inmunitario para combatir otros tipos de enfermedades incluyendo el cáncer. No obstante, pocos procedimientos *in vitro/ex vivo* se encuentran disponibles para activar específicamente los CTL. La identificación de los antígenos de melanoma claves indicada antes y un método para la activación *in vitro* específica de los CTL descrita más abajo permiten ahora someter a ensayo el concepto de inmunoterapia adoptiva del melanoma metastásico.

50

Todas las células T sin activación previa (naive) requieren dos señales para la activación para lograr una respuesta inmunitaria. Para los linfocitos CD8<sup>+</sup> (CTL), la primera señal, que confiere especificidad, consiste en la presentación a la célula CD8<sup>+</sup> de un fragmento peptídico inmunogénico (epítomo) del antígeno unido al complejo MHC de Clase I (HLA) presente sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC). Este complejo es reconocido específicamente por un receptor antigénico de las células T (TCR), que comunica la señal intracelularmente.

55

La unión al receptor de las células T es necesaria pero no suficiente para inducir la activación de las células T, y normalmente no conducirá a la proliferación celular o la secreción de citoquina. La activación completa requiere una o varias segundas señales co-estimuladoras, estas señales sirven para intensificar adicionalmente la cascada de activación. Entre las moléculas co-estimuladoras de las células presentadoras de antígenos, B7 y las moléculas de adhesión celular (integrinas) tales como ICAM-1 ayudan a este procedimiento uniéndose a CD28 y LFA-1, respectivamente, sobre la célula T. Cuando una célula CD8<sup>+</sup> interactúa con una célula presentadora de antígenos que porta un péptido inmunogénico (epítomo) unido por una molécula del MHC de Clase I en presencia de interacciones con moléculas co-estimuladoras apropiadas, la célula CD8<sup>+</sup> se vuelve una célula T citolítica totalmente activada.

65

La destrucción de células mediada por linfocitos implica una secuencia de eventos biológicos que comienzan con la unión del CTL CD8<sup>+</sup> a una célula diana que porta el antígeno (tumor) por medio del procedimiento de reconocimiento descrito antes para la activación de las células T.

## ES 2 306 771 T3

La interacción entre las células CD8+ y las células presentadoras de antígenos o células diana (tumor) descrita antes se representa en la Figura 1. La interacción comienza con la unión del antígeno asociado con la molécula de Clase I del MHC de la APC o la célula diana al receptor antigénico de las células T (TCR). Las moléculas accesorias tales como los antígenos con función de linfocitos (LFA-1, LFA-2 y LFA-3), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), los factores co-estimuladores de las células T (CD2, CD28, B7) potencian la adherencia célula a célula o transducen las señales de activación de las células adicionales.

Tras la interacción célula a célula, el CTL destruye la célula diana por medio de la acción de los mediadores citolíticos solubles (perforina y granzimas almacenadas en los gránulos citoplásmicos en la célula T) y una molécula superficial de CTL (ligando Fas). Después del ataque citolítico, las células diana mueren por necrosis (perforación de la membrana y destrucción de los orgánulos) o apoptosis (condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y vesiculación de la membrana).

Los mecanismos de citolisis mediada por linfocitos se representa gráficamente en la Figura 2. En el Panel A de la Figura 2, después de la unión a la célula diana, los gránulos citoplásmicos de los CTL son rápidamente reorientados hacia la célula diana para la liberación de gránulos que contienen perforina y granzimas en el espacio intercelular. Estas enzimas proteolíticas forman poros en la membrana plasmática de la célula diana conduciendo eventualmente a la necrosis celular. En el Panel B, después de la unión a la célula diana, aumenta el nivel de expresión del ligando Fas sobre los CTL. La interacción del ligando Fas y el receptor Fas sobre la célula diana conduce a la apoptosis. Proteasas tales como CPP32 y otras relacionadas con la enzima convertidora de IL-1b (ICE) han sido implicadas en la inducción de la apoptosis. Es posible utilizar células presentadoras de antígenos naturales, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células tumorales autólogas para la activación de CD8+ *in vitro*. Sin embargo, la eficacia de la activación después de este enfoque es baja. Esto es porque las moléculas de Clase I de las APC nativas contienen muchos otros tipos de epítopos peptídicos además de los epítopos tumorales. La mayoría de los péptidos derivan de proteínas de células inocuas normales, dando como resultado una dilución del número de APC nativas activas que serían realmente eficaces frente a un tumor (Allison *et al.*, Curr. Op. Immunol. (1995) 7:682-686).

Un enfoque más directo y eficaz para este problema es activar específicamente las células CD8+ solamente con aquellos epítopos relevantes para combatir una enfermedad específica, (tales como, el cáncer) o antígenos específicos de tumores (tales como, antígenos específicos del melanoma). A este fin, se crea una célula presentadora de antígenos artificial expresando moléculas de Clase I del MHC en células de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta). Puesto que la *Drosophila* no tiene un sistema inmunitario, los transportadores de péptidos TAP-1,2 implicados en la carga de epítopos peptídicos sobre las moléculas de clase I están ausentes. Como resultado, las moléculas de clase I aparecen sobre la superficie de las células de *Drosophila* como recipientes vacíos. Incubando estas células de *Drosophila* transfectadas con péptidos exógenos que se unen a las moléculas de clase I, tales como, epítopos específicos de cáncer o tumores, incluyendo pero no limitados a, epítopos específicos del melanoma, es posible ocupar cada molécula de clase I con el mismo péptido. La expresión de alta densidad de las moléculas de clase I que contienen un único péptido en estas APC de *Drosophila* permite la generación de células T CD8+ citotóxicas *in vitro* que son completamente específicas para el péptido antigénico. Los métodos y procedimientos para preparar células de *Drosophila* se ilustran en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.529.921, presentada el 25 de Junio de 1.996 titulada "In Vitro Activation of Cytotoxic T-Cells Using Insect Cells Expressing Human Class I MHC and  $\beta_2$ -Microglobulin", y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.314.813, presentada el 24 de Mayo de 1.994 titulada "Drosophila Cell Lines Expressing Genes Encoding MHC Class I Antigens And  $\beta_2$ -Microglobulin and Capable of Assembling Empty Complexes and Methods of Making Said Cell Lines". En particular, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.529.921 se describen en la columna 26, línea 56 a la columna 28, línea 22 diversos métodos de separación y/o enriquecimiento de cultivos con células precursoras.

Adicionalmente, este rasgo elimina la necesidad de estimulación *in vivo* del sistema inmunitario con dosis elevadas de diversas citoquinas, dando como resultado de ese modo un tratamiento que pasa sin los efectos secundarios causados por las citoquinas. Alternativamente, en situaciones o condiciones adecuadas, en las que es apropiado y el sujeto puede obtener un beneficio, el sujeto puede ser tratado concurrentemente con dosificaciones de bajo nivel de un interferón, interferón  $\gamma$ , y/o IL-2.

Eliminando la necesidad de estimulación *in vivo* con citoquinas se proporciona una mejora de la calidad del cuidado del paciente. Los regímenes de tratamiento que incluyen la administración de citoquinas a pacientes a menudo dan como resultado en el paciente el desarrollo de síntomas gripales, tales como náuseas, vómitos, y fiebre. Estas reacciones secundarias generalmente no son amenazantes de la vida, aunque una reacción particularmente grave que se produce en un paciente que ya se encuentra en un estado debilitado podría dar como resultado una situación arriesgada para la vida. Otra consideración es el impacto adverso que tales reacciones secundarias tienen sobre la aceptación del paciente y la conformidad con un régimen de tratamiento por otro lado beneficioso. La eliminación de la necesidad de estimulación *in vivo* con citoquinas da como resultado un régimen de tratamiento que mejora el confort del paciente, y proporciona al médico un método eficaz de tratamiento con el que es más probable su paciente esté conforme.

La utilidad de este método para la inmunoterapia adoptiva de tumores ha sido demostrada en ratones utilizando células de *Drosophila* transfectadas como APC y células CD8+ de la línea 2C de ratones transgénicos para el receptor de células T (TCR). En este sistema, las células 2C CD8+ son altamente sensibles a los péptidos *in vitro* presentados por células de *Drosophila* transfectadas ( $L^d$ ) de Clase I de MHC que también portan las moléculas co-estimuladoras B7-1 e ICAM-1. Las células de *Drosophila* transfectadas como sonda para definir los requerimientos mínimos para

estimular células T CD8+ no cebadas (Cai *et al.*, P. N. A. S. USA (1996) 93:14736-14741). Alternativamente, cuando se utilizan células de bazo de ratón no separadas como respondedoras en lugar de células 2C purificadas, no se aplica la necesidad de moléculas co-estimuladoras. En este caso, las células CD8+ de la población del bazo reciben co-estimulación circunstancial a partir de las células B activadas. Utilizando este descubrimiento, ha sido posible mostrar que las células de *Drosophila* transfectadas-(L<sup>d</sup>) de Clase I de MHC son capaces de inducir a las células de bazo de ratón DBA/2 normales a responder a péptidos específicos del tumor mastocitoma P815 singeneico *in vitro* en ausencia de linfoquinas añadidas. La inyección de estos CTL en ratones DBA/2 que portan el mastocitoma P815 condujo a una rápida regresión del tumor (Sun *et al.*, Immunity (1996) 4:555-564).

Por lo que se refiere al procedimiento, se cultivaron células de bazo de ratón DBA/2 normales *in vitro* con células de *Drosophila* transfectadas-(L<sup>d</sup>) de Clase I del MHC con el péptido P1A.35-43, un epítipo específico de tumor de la línea celular de mastocitoma P815 derivada de DBA/2. Los linfocitos cosechados de los cultivos después de cinco días presentaban una fuerte actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) hacia las células tumorales P815 *in vitro*, pero no lograban lisar P1024, una línea celular mutante de P815 que no expresa P1A.35-43, como se muestra en la Figura 3, Panel A. Cuando estos CTL fueron inyectados en ratones DBA/2 a los que se había inoculado previamente células P815 tres días antes, los tumores crecieron sin impedimento durante la primera semana, pero fueron eliminados con posterioridad en la siguiente semana, como se muestra en la Figura 3, Panel B. La especificidad fue demostrada por la ausencia de cualquier efecto sobre el crecimiento de P815 cuando los CTL fueron inmunizados *in vitro* contra un antígeno irrelevante, tal como el péptido de la nucleoproteína viral, como se muestra en la Figura 3, Panel B. En resumen, las células de *Drosophila* transfectadas (Ld) con el complejo principal de histocompatibilidad de Clase I inducían a las células de bazo de ratón DBA/2 normales a responder a péptidos específicos del tumor de mastocitoma P815 singeneico *in vitro* en ausencia de linfoquinas añadidas. La inyección de estos CTL en ratones DBA/2 que portaban el mastocitoma P815 condujo a una rápida regresión del tumor (Wolfel *et al.*, J. Exp. Med. (1993) 178:489-495).

#### *Estudios en Humanos In Vitro*

Se inmunizaron CTL humanos de sujetos sanos *in vitro* frente tirosinasa. Después de la primera estimulación solamente con células de *Drosophila*, la lisis específica de las células JY que portaban tirosinasa era evidente en todos los efectores de CTL para las proporciones diana de JY sometidas a ensayo. Los CTL específicos de tirosinasa de sujetos sanos fueron inducidos utilizando el protocolo completo de estimulación/re-estimulación y se sometieron a ensayo en cuanto a su capacidad para destruir la línea celular de melanoma Malme 3M. Con una o dos posibles excepciones, la actividad de CTL específica contra Malme 3M fue inducida en todos los donantes hasta un grado variable. Para la mayor parte, la reactividad hacia las células tumorales Malme 3 de control fue mínima. Las células de los pacientes con melanoma también fueron inmunizadas *in vitro* contra el epítipo de tirosinasa para generar CTL de actividad y especificidad similares a los derivados de voluntarios sanos.

El uso de cualquier sistema de células presentadoras de antígenos (APC) natural o artificial para generar linfocitos T citotóxicos *in vitro* está limitado por las especificidades de los antígenos que estos sistemas son capaces de generar.

Se han utilizando los siguientes sistemas de APC para generar CTL específicos de antígenos para epítipos individuales: 1) células dendríticas humanas (DC) pulsadas con péptidos definidos; 2) células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que han sido conducidas a linfoblastos y pulsadas con péptidos; 3) línea celulares linfoblastoides (LCL) donde los péptidos naturales son separados con ácido y cargados con los péptidos de interés; 4) células de *Drosophila* diseñadas para expresar moléculas de Clase I vacías; y células 3T3 de ratón transfectadas con moléculas de Clase I y co-estimuladoras humanas (J. B. Latouche y M. Sadelain, Nature Biotech (2000) 18:405-409).

Las células dendríticas (DC) son consideradas el sistema primario de células presentadoras de antígenos en los seres humanos debido a su amplia aplicación en la presentación de células antigénicas primarias. Las propias proteínas o las proteínas foráneas son procesadas dentro de una DC. Los epítipos peptídicos resultantes son presentados por las moléculas HLA, y transportados a la superficie de la DC. Sin embargo, se encontró que las DC no generarían constantemente *in vitro*, los CTL dirigidos contra cuatro péptidos diferentes. Esto habría proporcionado los CTL con una actividad correspondiente a cada uno de los cuatro péptidos. Además, también se encontró que el fenotipo de la DC en el momento del pulso con los péptidos, madura o inmadura, no afectaba al resultado.

Alternativamente, la estimulación de células de *Drosophila* normalmente daría como resultado CTL dirigidos hasta contra diez tipos diferentes de péptidos. Esto proporciona CTL que son activos para cada uno de los diez péptidos.

Se evaluó la capacidad de las células de *Drosophila* y las DC para obtener CTL, inicialmente para un único tipo de epítipo peptídico, siguiendo los protocolos de estimulación normalizada para cada uno, con el fin de comparar las DC y las células de *Drosophila* transfectadas. Las DC inmaduras fueron generadas cultivando durante una semana monocitos autólogos en presencia de IL-4 y GM-CSF. Las DC maduras fueron obtenidas a partir de DC inmaduras mediante adición de TNF  $\alpha$  al medio de cultivo veinticuatro horas antes de la cosecha. Las DC (inmaduras y maduras) fueron cosechadas, sometidas a pulsos con péptidos y mezcladas con células CD8 purificadas siguiendo el procedimiento utilizado para la estimulación de las células CD8 y células de *Drosophila* pulsadas con péptidos - se encontró que las células de *Drosophila* eran generalmente mejores estimuladores que las DC cuando se evaluó para el epítipo del péptido tirosinasa 689, como se muestra en la Figura 7. Adicionalmente, las DC que presentaban el fenotipo

inmaduro o maduro (Figura 8) no fueron tan eficaces como las células de *Drosophila* al obtener respuestas de CTL específicas cuando se utilizaron péptidos definidos para pulsar las APC. Esto resulta particularmente sorprendente, debido al papel dominante desempeñado por las DC en el sistema inmunitario. Se realizó un estudio comparativo con un donante, como se muestra en la Figura 9. Se generó una destrucción específica contra cuatro péptidos diferentes cuando se utilizaron células de mosca como estimuladores mientras las DC inmaduras dieron como resultado una destrucción específica marginal y las DC maduras dieron como resultado una destrucción específica solamente contra uno de los cuatro péptidos utilizados para la estimulación.

#### 10 *Preparación de Linfocitos Citotóxicos*

Se estimulan las células CD8<sup>+</sup> aisladas de muestras de leucaféresis mediante selección positiva con anticuerpo anti-CD8 contra cuatro péptidos asociados al melanoma diferentes presentados por células de *Drosophila* que expresan las moléculas de Clase I Humanas (HLA-A2.1), B7.1, ICAM-1, LFA-3 y B7.2. Las células CD8<sup>+</sup> son re-estimuladas durante dos rondas con monocitos autólogos cargados con el epítipo peptídico en presencia de IL-2 e IL-7. Los CTL son expandidos no específicamente con OKT3 e IL-2. La actividad de los CTL se mide contra las células Malme 3M y se evalúa la pureza de las células T CD8<sup>+</sup> mediante citometría de flujo.

Los procedimientos y protocolos de fabricación se realizan de acuerdo con Good Laboratory Practices y Good Manufacturing Practices. “Good Laboratory Practices” y “Good Manufacturing Practices” son patrones de laboratorio y prácticas de elaboración que son establecidas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos, y son fácilmente conocidas por los expertos en la técnica. Los CTL son controlados en cuanto a la identidad, viabilidad, actividad de CTL, esterilidad, y contenido de endotoxinas.

En la siguiente Tabla 1 se muestra una lista de los epítopos peptídicos adecuados para su uso en los métodos de la presente invención para tratar cánceres de mama y ovario. Es fácilmente evidente para los expertos en la técnica que también serán adecuados para su uso en los métodos de la presente invención una amplia variedad de epítopos peptídicos, además de los enumerados en la siguiente Tabla 1, para tratar cánceres de mama y ovario, siempre que tales péptidos sean epítopos de las células T.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 306 771 T3

TABLA 1

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

Epítomos Restringidos a HLA-A2.1 Identificados para Antígenos Asociados con Tumores como Dianas para Cánceres de Mama y Ovario					
<u>Diana</u> (restos)	<u>Nombre</u>	<u>PRI</u> <u>núm.</u>	<u>AKA</u>	<u>Secuencia</u> (SEQ ID NO:)	<u>Predicción de</u> <u>Unión al</u> <u>Péptido-HLA</u>
<b>Her-2/neu</b>					
789-797		826	E90	CLTSTVQLV (SEQ ID NO: 7)	160
48-56		827	D113	HLYQGCQW (SEQ ID NO: 13)	
369-377		835	E75	KIFGSLAFL (SEQ ID NO: 8)	481
654-662		837	GP2	IISAVVGIL (SEQ ID NO: 14)	
650-658		838	GP1	LTSILSAV (SEQ ID NO: 15)	
773-782		861		VMAGVGSPYV (SEQ ID NO: 16)	
851-859		862	E89	VLVKSPNHV (SEQ ID NO: 17)	118
971-979		863	C85	ELVSEFSRM (SEQ ID NO: 18)	

60  
65

ES 2 306 771 T3

5	<b>AES</b>	Potenciador amino de Notch dividida				
10	G128- 135		893	G76	GPLTPLPV (SEQ ID NO: 19)	
15	<b>MUC-1</b>	Mucina				
20	950-958		908	1.1	STAPVHNV (SEQ ID NO: 20)	
25	<b>CEA</b>	Ag Carcino- embriogénico				
30	571-579		879	CAP- 1	YLSGANLNL (SEQ ID NO: 21)	
35	<b>FBP</b>	Proteína de unión a Folato				
40	191-199		914	E39	EIWTHSYKV (SEQ ID NO: 22)	
45	<b>C- Lectina</b>	MESM, RELP				
50	8-16			C8	.KMASRSMRL (SEQ ID NO: 9)	Actividad CTL
55	77-86			C77	SILSLKEAST (SEQ ID NO: 23)	Actividad CTL

ES 2 306 771 T3

	<b>NY-ESO-1</b>				
5	157165C	894		SLLMWITQC (SEQ ID NO: 24)	nativo
10	157-165V	906		SLLMWITQV (SEQ ID NO: 25)	modificado
15	155-163	913		QLSLLMWIT (SEQ ID NO: 26)	
20	<b>Pec60</b>				
25	20		P20	ALALAALLVV (SEQ ID NO:10)	Actividad CTL
30	25		P25	ALLVVDREV (SEQ ID NO:11)	Actividad CTL
35	<b>CA-125</b>				
40	157165	900		YLETFIZEQV (SEQ ID NO: 27)	38
45	255-263	902		VLLKLRRPV (SEQ ID NO: 28)	88
50	337-345	901		GLQSPKSPL (SEQ ID NO: 29)	21
55	546-554	903		ELYIPSVDL (SEQ ID NO: 30)	5
60	898-906	899		KALFAGPPV (SEQ ID NO: 31)	13
65	414-422	910		FMWGNLTLA (SEQ ID NO: 32)	315

ES 2 306 771 T3

CA-125					
<b><u>MAGE-3</u></b>					
5	271-279		909	FLWGPRALV (SEQ ID NO: 33)	
10					
<b><u>Telomerasa</u></b> hTRT					
15	540-548		907	ILAKFLHWL (SEQ ID NO: 34)	
20	865-873		911	RLVDDFLLV (SEQ ID NO: 35)	
<b><u>G250</u></b>					
25	245-262		912	HLSTAFARV (SEQ ID NO: 36)	
30					

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar la presente invención, pero no para limitar la presente invención al contenido de los ejemplos.

Ejemplo 1

*Fabricación de Células Presentadoras de Antígenos de Drosophila*

Se preparó la línea celular S2 de Schneider a partir de huevos de *Drosophila melanogaster* (Oregon-R) de acuerdo con los procedimientos publicados y se depositó en la Colección de Cultivos Tipo Americana (CRL 10974). Las células S2 se hicieron crecer en medio para *Drosophila* de Schneider con un suplemento de suero bovino fetal al 10%.

El vector plasmídico pRmHa-3 para expresar las proteína de Clase I del MHC y co-estimuladoras en las células S2 estaba derivado del vector de expresión pRmHa-1 construido como se ha descrito en la literatura. Contiene un promotor de metalotioneína, secuencias consenso de respuesta a metales y un gen de alcohol deshidrogenasa que porta una señal de poliadenilación aislada de *Drosophila melanogaster*.

*Los ADN Complementarios para la transfección se prepararon como sigue:*

HLA-A2.1 y microglobulina  $\beta$ -2:

Transcripción inversa-PCR a partir de células K562 utilizando cebadores derivados de la secuencia publicada

B7.1:

Transcripción inversa-PCR a partir de células K562 utilizando cebadores derivados de la secuencia publicada

ICAM-1:

Transcripción inversa-PCR a partir de células K562 utilizando cebadores derivados de la secuencia publicada

B7.2:

Transcripción inversa-PCR a partir de células HL-60 (ATCC CCL-240) utilizando cebadores derivados de la secuencia publicada

## ES 2 306 771 T3

### LFA-3:

Transcripción inversa-PCR a partir de células HL-60 (ATCC CCL-240) utilizando cebadores derivados de la secuencia publicada

5

Los ADN complementarios fueron insertados individualmente en el vector pRmHa-3. Las células S2 fueron transfectadas con una mezcla de ADN plasmídicos de HLA-A2.1, B7.1 y ICAM-1 y el plásmido pshneo utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio. Las células transfectadas establemente se seleccionaron cultivando en medio de Schneider que contenía geneticina. Veinticuatro horas antes de su uso, se indujo la expresión de los genes transfectados mediante adición de CuSO<sub>4</sub>. El nivel de expresión se evaluó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-HLA-A2.1, anti-B7.1 y anti-ICAM-1. Es necesaria una expresión de HLA de más del 30% de las células para una activación eficaz *in vitro* de los linfocitos CD8<sup>+</sup>.

### 15 Aislamiento de Células CD8<sup>+</sup> Humanas

Se aislaron células CD8<sup>+</sup> de muestras de leucaféresis mediante selección positiva utilizando el procedimiento de aislamiento Dynabeads<sup>®</sup> (Dynal). Se añade anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD8 humano (50 µg/ml en gammaglobulina humana [Gammagard<sup>®</sup>]) a las células lavadas en PBS de Dulbecco con un suplemento de seralbúmina humana al 1% (Baxter-Hyland) y citrato de Na al 0,2%. Después de incubar a 4°C durante cuarenta y cinco minutos con mezclado suave, las células se lavan y se re-suspenden en el mismo tampón conteniendo cuentas magnéticas Dynal (Dynabeads<sup>®</sup>) recubiertas con IgG de anti-ratón de cabra a una razón de cuenta a célula de 1:1. Las células y las cuentas se colocan en un tubo estéril y se mezclan suavemente a 4°C durante cuarenta y cinco minutos. Transcurrido este tiempo, se separan magnéticamente las células unidas a anticuerpo utilizando el separador MPC-1<sup>®</sup> de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Dynal). La disociación del complejo célula CD8-cuenta se logra mediante incubación a 37°C durante cuarenta y cinco minutos en presencia de péptidos<sub>59-70</sub> CD8 (AAEGLDTQRFSG; SEQ ID NO: 12). Las cuentas libres se separan magnéticamente y se someten a recuento las células CD8 y se analizan mediante citometría de flujo para evaluar la pureza. La recuperación de las células CD8<sup>+</sup> es típicamente mayor del 80%. La Tabla 1 resume la composición celular de catorce preparaciones de CD8<sup>+</sup> separadas a partir de preparaciones de PBMC humanas normales y selección positiva con anticuerpo anti-CD8.

30

TABLA 2

35

<b>Purificación de Células CD8<sup>+</sup> Mediante Selección Positiva</b>				
<b>Analizadas por Citometría de Flujo</b>				
<b>TIPO CELULAR</b>	<b>PBMC</b>		<b>POST SELECCIÓN</b>	
	<b>Media %</b>	<b>(Intervalo)</b>	<b>Media %</b>	<b>(Intervalo)</b>
células T CD8	15%	(7-24)	82%	(56-95)
células T CD4	36%	(14-52)	2%	(0,1-10)
Monocitos CD 14	15%	(7-26)	0,8%	(0,2-2)
Neutrófilos CD15	12%	(8-21)	0,6%	(0,1-3)
células B CD19 B	2%	(0,4-7)	3%	(0,5-9)
células NK CD56	6%	(2-17)	6%	(0,1-20)

60

### Immunización *In Vitro* de Células CD8<sup>+</sup> Humanas Purificadas

#### Estimulación Primaria

65

Se incuban células S2 de *Drosophila* transfectadas en medio de Schneider (10<sup>6</sup> células/ml) con un suplemento de suero de ternera fetal al 10% y CuSO<sub>4</sub> a 27°C durante veinticuatro horas. Las células se cosechan, se lavan y se re-suspenden en medio Insect X-press (BioWhittaker) que contiene 100 µg/ml de tirosinasa<sub>369-377</sub> humana. Después de la

## ES 2 306 771 T3

incubación a 27°C durante tres horas, las células S2 se mezclan con células CD8<sup>+</sup> a una razón de 1:10 en medio RPMI (Gibco) con un suplemento de suero autólogo al 10%. La mezcla celular se incuba durante cuatro días a 37°C durante los cuales las células de *Drosophila* mueren. El día cinco, se añaden IL-2 (20 U/ml) e IL-7 (30 U/ml) para expandir selectivamente la población de CTL específica de tirosinasa.

5

### *Re-Estimulación*

Se descongelan las PBMC empobrecidas en CD8, autólogas, congeladas, obtenidas en el momento de la leucaféresis, se lavan y se re-suspenden a 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI que contiene suero autólogo al 10% (como fuente de microglobulina β2) y 20 μg/ml de tirosinasa<sub>369-377</sub>. Después de la irradiación con γ (5.000 rads), las células se incuban a 37°C durante dos horas. Las células no adherentes se separan lavando con PBS de Dulbecco. Los monocitos adherentes se cargan con el epítipo de tirosinasa mediante incubación durante 90 minutos en medio RPMI tamponado con Hepes que contiene suero autólogo al 10% y 10 μg/ml de tirosinasa<sub>369-377</sub>. El sobrenadante se separa y se añade la suspensión de células CD8<sup>+</sup> activadas de *Drosophila* (3 x 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI con suero autólogo al 10%) a una razón de 10 células CD8<sup>+</sup> por 1 monocito adherente. Después de tres a cuatro días de cultivo a 37°C, se añaden IL-2 (20 U/ml) e IL-7 (30 U/ml) con un cambio de medio para expandir selectivamente la población de CTL específicos de tirosinasa.

10

15

### *Expansión No-Específica*

20

Las células efectoras son expandidas no específicamente cultivándolas en medio RPMI con un suplemento de suero autólogo, anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT<sup>®</sup>3), IL-2 y PBMC autólogas irradiadas con γ.

### *Análisis de la Actividad y la Pureza*

#### *Análisis de CTL*

Se utilizan células Malme 3M como células diana en un análisis de liberación de Cr<sup>51</sup>. Se marcan 5 x 10<sup>6</sup> células Malme 3M en medio RPMI que contiene suero de ternera fetal al 4%, tampón HEPES al 1% y gentamicina al 0,25% a 37°C durante una hora con Cr<sup>51</sup> de 0,1 mCi. Las células se lavan cuatro veces y se diluyen a 10<sup>5</sup> células/ml en RPMI con suero bovino fetal al 10% (ByGone). En una placa de microtitulación de 96 pocillos, se combinan 100 μl de CrL efectores y 100 μl de células diana Malme 3M marcadas con Cr<sup>51</sup>, cargadas de péptido a razones de 100:1, 20:1 y 4:1 (efector:diana). Se añaden células K562 a una razón de 20:1 (K562:Malme 3M) para reducir la lisis de fondo de las células asesinas naturales. Se evalúa la lisis no específica utilizando la línea de células fibroblásticas HLA-A2.1 no tumorales, Malme 3. Los controles para medir la liberación espontánea y la liberación máxima de Cr<sup>51</sup> se incluyen por duplicado. Tras una incubación a 37°C durante seis horas, las placas se centrifugan y los sobrenadantes se someten a recuento para medir la liberación de Cr<sup>51</sup>.

30

35

El porcentaje de lisis específica se calcula utilizando la siguiente ecuación:

45

$$\frac{\text{cpm muestra} - \text{cpm liberación espontánea}}{\text{cpm liberación máxima} - \text{cpm liberación espontánea}} \times 100$$

50

### *Citometría de Flujo*

Se analizaron las células CD8<sup>+</sup>, antes y después de la activación *in vitro*, en cuanto al número de marcadores de la superficie celular utilizando anticuerpos monoclonales fluorescentes y análisis FACS. Los resultados de un protocolo de activación típico utilizando células de un donante sano se muestran en la Tabla 2.

55

60

65

ES 2 306 771 T3

TABLA 3

<b>Análisis de Citometría de Flujo de Células CD8<sup>+</sup> Activadas In Vitro</b>		
<u>MARCADOR/TIPO DE CÉLULA</u>	<u>PRE- ACTIVACIÓN</u>	<u>POST- ACTIVACIÓN</u>
	Media %	Media %
células T CD8	98	99
receptor de células T TCRαβ	98	92
receptor de anidación en nódulo linfático CD44	91	99
célula T de memoria CD45RO	58	88
CD45RA	41	31
receptor de anidación en HEV CD62L	24	38
célula NK CD56	1	11
célula T activada CD25	0,1	29

Además de la actividad y la pureza, se analizarán las preparaciones de CTL en cuanto a la esterilidad y el contenido en endotoxinas.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 306 771 T3

Reactivos

<u>REACTIVO</u>	<u>PROVEEDOR</u>	<u>CALIDAD</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
rh IL-2	Chiron	USP	solución estéril
rh IL-7	Genzyme	Investigación	liofilizado, solución estéril
tirosinasa 369-377 humana		Investigación	
Dynabeads® M-450	Dynal	GMP	cuentas magnéticas de IgG anti-ratón de oveja
seralbúmina humana	Baxter	USP	estéril, libre de virus de hepatitis no pirogénica, solución el 25%
suero bovino fetal	Gemini	Investigación	estéril, libre de BSE, endotoxinas, micoplasma
Gammagard®	Baxter	USP	estéril, solución de inmunoglobulina humana para inyectables
anticuerpo anti-CD8		Investigación	anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón
péptido 59- 70 de CD8		Investigación	liberación de células CD8 <sup>+</sup> de cuentas magnéticas
W6/32	ATCC	Investigación	anticuerpo monoclonal anti- HLA-A, B, C humana de ratón

## ES 2 306 771 T3

### *Líneas celulares*

<u>LÍNEA</u> <u>CELULAR</u>	<u>PROVEEDOR</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
Drosophila S2	ATCC	CRL 10974
M3	UCSD	Melanoma humano No-HLA-A21
Malme 3	ATCC	Fibroblastos de piel normal de paciente con melanoma
Malme 3M	ATCC	Melanoma Metastásico de pulmón (mismo paciente que Malme 3)
M14	UCSD	Melanoma humano HLA-A2.1
K562	ATCC	Línea celular eritroleucémica humana; diana para células NK
Células JY	ATCC	Línea de células B humanas que expresan HLA-A2.1 y B7
P815 y P1024	ATCC	Líneas celulares de mastocitoma de ratón DBA/2
Jurkat A2.1	ATCC	Leucemia de células T aguda transfectadas con HLA-A2.1 humana
ATCC: Colección de Cultivos Tipo Americana		

#### Ejemplo 2

#### 50 Prueba de Infusiones de Células T Citotóxicas Contra Melanoma

##### *Propósito de la Prueba*

55 Este ejemplo ilustra la eficacia de las infusiones de Células T citotóxicas en el tratamiento del melanoma evaluada de acuerdo con los siguientes factores:

1. seguridad y tolerancia de CTL autólogos re-infundidos después de la inmunización *in vitro*;
- 60 2. cinética de los CTL infundidos en la circulación sistémica factorizando en el análisis de dilución limitante;
3. disposición en el organismo completo de los CTL mediante radioescintografía;
- 65 4. composición celular de nódulos sometidos a biopsia mediante inmunohistología (células CTL, TH, NK, B); y
5. regresión de lesiones medibles y duración de las respuestas a lo largo de dos meses.

*Población de Pacientes*

La capacidad para elegir el tratamiento requirió pacientes que tenían un melanoma maligno no reseccionable, histológicamente documentado que era medible o evaluable, y el haplotipo HLA-2.

La evaluación del pretratamiento incluyó la evaluación radiológica del cerebro mediante MRI o barrido CT, barrido CT del pecho y el abdomen, y examen físico, especialmente de la piel y los nódulos linfáticos. El número total de pacientes tratados fue de quince (nueve varones y seis mujeres). Las edades oscilaron entre 33 y 75 años con una media de 58 años. La duración media de la enfermedad metastásica fue de 1,5 años. Un ensayo de pretratamiento de la piel para determinar si existía un estado de anergia se realizó en 14/15 pacientes con 5/14 ensayos negativos para los siete antígenos comunes evaluados. Los pacientes fueron escrutados en cuanto al haplotipo HLA-A2 mediante análisis FACS con un anticuerpo monoclonal específico de HLA-A2 (BB7.2). La subtipificación se realizó mediante análisis PCR. Todos menos uno de los pacientes fueron HLA-A\*0201; la excepción (paciente 08) fue HLA-A\*0205.

*Tratamiento con CTL Autólogos Generados Ex Vivo*

Se trataron quince pacientes en este protocolo clínico. Todos los pacientes recibieron, como mínimo, una única infusión de CTL autólogos. El número de ciclos y la dosis de células administrada a cada paciente se resumen en la Tabla 1. El número de células generadas *in vitro* dependió de factores relacionados con el paciente tales como el número de PBMC aislados del procedimiento de aféresis y el número de células T CD8<sup>+</sup> presentes en cada preparación de PBMC. Puesto que todas las células generadas *in vitro* fueron re-infundidas en el donante, las dosis administradas a cada paciente variaron necesariamente. En un intento para normalizar las dosis entre pacientes, se registró una puntuación de "potencia" calculada para cada dosis. El valor se obtuvo multiplicando el número total de células por la actividad lítica obtenida con las células diana cargadas de péptidos. Las dosis de células T infundidas oscilaron entre un mínimo de  $4 \times 10^7$  (paciente 08) y un máximo de  $32 \times 10^9$  (paciente 13). Los pacientes se hicieron entrar en un segundo, tercer o cuarto ciclo de tratamiento basándose en su estado clínico al final de cada ciclo. El número de PBMC obtenidas de las muestras de aféresis tendía a disminuir en los pacientes que fueron sometidos a ciclos adicionales, especialmente si el inicio del siguiente ciclo era administrado al final del anterior. Esto se atribuyó a una linfopenia persistente debida al IFN $\alpha$ -2b administrado durante el ciclo anterior. El número total de células T CD8<sup>+</sup> sin activación previa aisladas dependió de su porcentaje en cada una de las preparaciones de PBMC. El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> varió entre 8% y 31% entre los pacientes. El factor de expansión obtenido también contribuyó al número final de células y osciló entre 0,1-6,0 veces. El procedimiento para generar los CTL *ex vivo* se ilustra en la Memoria y en el Ejemplo 1, anteriores.

*Regulación al Alza de Antígenos de Clase I y Asociados al Melanoma en Respuesta al IFN $\alpha$ -2b*

En un intento de potenciar la capacidad de los CTL específicos de los antígenos para lisar las células de melanoma *in vivo*, se administró una dosis baja de IFN $\alpha$ -2b durante cinco días seguidos antes de la infusión de CTL, y tres veces por semana durante cuatro semanas más. Un modo de medir la respuesta *in vivo* a la citoquina es evaluar las biopsias obtenidas en momentos puntuales seriados mediante análisis inmunohistoquímico para la tinción positiva con anticuerpos específicos. Las biopsias seriadas se obtuvieron de un paciente con múltiples lesiones en la piel (paciente 04) durante la evaluación de la expresión tanto de Clase I como de antígeno. Las biopsias indicaron que la expresión de la Clase I y de MART-1 eran débilmente positivas antes de cualquier tratamiento (biopsia A). Después de cinco días de inyecciones subcutáneas de 10 MU/m<sup>2</sup>, se observó un incremento espectacular en estos marcadores (biopsia B). Para la tirosinasa y la gp100, la tinción inmunohistoquímica fue negativa y débilmente positiva, respectivamente en las muestras de pre-tratamiento (biopsia A). Después de la dosis de IFN $\alpha$  inicial de cinco días, y trece tratamientos adicionales, la expresión de estos antígenos aumentó en las muestras de tejido teñido (biopsia C).

*Especificidad Antigénica de CTL Generados Ex-Vivo*

Los CTL generados a partir de todos los pacientes se evaluaron el día de la liberación contra las dianas de T2 cargadas de péptidos, una línea celular de melanoma HLA-A2 (Malme3M) y una línea de melanoma autólogo, si el material de la biopsia se encontraba disponible para establecer una línea. Cada dosis de células preparada se evaluó en cuanto a su actividad citolítica. Se utilizaron las células T2 cargadas de péptidos, que presentaban cada una un único péptido, o los cuatro péptidos simultáneamente, para determinar la especificidad de la respuesta de los CTL generada por cada paciente. La capacidad para lisar las células portadoras de antígenos, asociadas al melanoma, expresadas endógenamente fue evaluada con una línea emparejada con HLA-A2 o una línea tumoral autóloga. Además de la actividad citolítica, se evaluó la especificidad antigénica con un método establecido para detectar la producción de interferón gamma intracelular, realizada en respuesta a un estímulo peptídico específico. Los CTL generados al final del protocolo *ex vivo* se evaluaron mediante este método. El porcentaje de células específicas para cada uno de los péptidos se registró individualmente. El número total de células específicas de cada cultivo masivo de CD8 del paciente 13 se calculó añadiendo cada una de las especificidades peptídicas detectadas en esta población de células T. Se pudo detectar un incremento en el número total de células específicas con cada ciclo de tratamiento sucesivo.

## ES 2 306 771 T3

### *Detección de Células CD8 y CD4 Infiltrantes de Tumores Post-Terapia con CTL*

Hubieran sido ideales muestras de biopsia de todos los pacientes antes, durante y después del tratamiento. No obstante, las condiciones experimentales permitieron muestras de biopsia solamente de un número limitado de pacientes. Se obtuvo tejido tumoral de cinco de los quince pacientes enrolados en el estudio. En dos pacientes (pacientes 08 y 13) las muestras de biopsia fueron asequibles a las cinco y seis semanas de la terapia con células T, respectivamente. El examen de las muestras de tejido reveló la presencia de células infiltrantes CD8 y CD4. Una de las muestras de tumor se extrajo de una lesión en la piel en la región occipital del cuero cabelludo, que aumentó de tamaño con el tiempo del examen de seguimiento, cuatro semanas después de una segunda infusión de células T. La biopsia reveló necrosis del tejido que fue infiltrado intensamente con linfocitos. La otra biopsia fue de la cabeza del fémur, separada durante cirugía de sustitución de cadera. La lesión de la piel del paciente 08 fue fuertemente positiva (4+) tanto para la clase U general, como para el marcador HLA-A2 específico. La tirosinasa y la gp100 fueron débilmente positivas (1+ y 2+, respectivamente), mientras MART-1 resultó negativo en esta misma muestra. Las regiones de la biopsia del paciente 13 también fueron necróticas, con una tinción más heterogénea; distintas poblaciones de células tumorales que carecían de expresión de la molécula HLA-A2.1, y una o más de MAA. Sin embargo, las regiones de tejido intacto revelaron una clase I potente (4+), y todos los antígenos asociados con el melanoma. Las infiltraciones linfocíticas de esta última muestra parecían rodear los nódulos tumorales en lugar de infiltrarse profundamente en ellos. Sin embargo, el mayor porcentaje de células asociadas directamente con el tumor fueron células CD8. La carencia de muestras de biopsia pre-tratamiento de estos dos pacientes evitó la confirmación de tipos de células infiltrantes similares en las muestras de tejido antes del tratamiento.

### *Barridos CT Post-Terapia con Células T Confirman una Respuesta Objetiva*

Los barridos CT fueron parte de los criterios de escrutinio pre-tratamiento y del examen de seguimiento post-tratamiento. El paciente 10 recibió una única infusión de  $8 \times 10^8$  CTL (27/7/99) cinco semanas después del barrido de pre-tratamiento (23/6/99). Cuando se repitió el barrido CT del pecho un mes después de la infusión (27/8/99), se observó un espectacular descenso del tamaño de una lesión en el pulmón. De un modo similar, el paciente 14 fue sometido a un barrido CT del pecho como parte del proceso de enrolamiento (10/9/99), tres semanas y media antes de la primera infusión con  $6,6 \times 10^8$  (5/10/99). Un barrido CT de seguimiento (7/1/99), un mes después de una segunda infusión con  $11,5 \times 10^8$  células, reveló un espectacular arrugamiento en tres lesiones separadas. El paciente 13 también tuvo una respuesta objetiva medida en barridos CT pre y post. La adenopatía paratraqueal fue de  $7,8 \text{ cm}^2$  (pre-estudio) a  $4,4 \text{ cm}^2$  después del ciclo I, y desapareció después del ciclo II.

### *La Presencia de un Estado Anérgico No Excluyó la Capacidad para Generar CTL o Evitar una Respuesta Clínica*

La mayoría de los pacientes tratados bajo este protocolo habían recibido intervención médica previa. Se realizó un ensayo en la piel pre-tratamiento para determinar si una respuesta anérgica a un panel de siete antígenos comunes se correspondía con su incapacidad para generar CTL *ex vivo*, o evitar una respuesta clínica documentada. La capacidad para generar CTL *ex vivo* no se correspondió con los resultados del ensayo de la piel pre-tratamiento del paciente. Se debe observar que los pacientes 03 y 04 (ambos respondedores mixtos) tuvieron ensayos de piel repetidos antes del inicio del segundo ciclo y permanecieron anérgicos.

### Ejemplo 3

#### *Generación de CTL Específicos de HER-2/neu Capaces de Lisar Células de Tumor de Mama y Ovario*

Los autores de la presente invención estaban interesados en aplicar su tecnología de generación de CTL a otros tipos de tumores para determinar si todas las formas de cáncer pueden ser elegidas como objetivo con este enfoque. HER-2/neu es un proto-oncogen con homología con EGFR que es amplificado y expresado en exceso en muchos cánceres de humanos, en su mayor parte adenocarcinomas de mama, ovario y colon. A menudo está asociado con una enfermedad agresiva y puede ser un indicador de una escasa prognosis. Se ha estudiado en numerosas pruebas clínicas como posible diana para estos tipos de cánceres.

A principios de los 90 se identificaron epítomos peptídicos restringidos a HER-2/neu HLA-A2.1 mediante algoritmos de unión a péptidos asistidos por ordenador o mediante mapeo de CTL aislados de ascitis de pacientes con cáncer de ovario (Tabla 3).

ES 2 306 771 T3

TABLA 3

Péptidos HER-2/neu Restringidos por HLA-A2.1					
<u>Péptidos</u> HER- 2/neu	<u>PRI#</u>	<u>Otros</u> Núm. ID	<u>Locali-</u> <u>zación</u>	<u>Secuencia</u> (SEQ ID NO)	<u>Referencia</u>
48-56	827	D113	EC	HLYQGCQW (SEQ ID NO: 13)	<u>Disis</u> et al., 1994
369-377	835	E75	EC	KIFGSLAFL (SEQ ID NO: 8)	<u>Fisk</u> et al, 1995
650-658	838	GP1	TM	PLTSIISAV (SEQ ID NO: 15)	<u>Fisk</u> et al, 1995
654-662	837	GP2	TM	IISAVVGIL (SEQ ID NO: 14)	<u>Peoples</u> et al., 1995
773-782	861	N/A	IC	VMAGVGSPYV (SEQ ID NO: 16)	<u>Lustgarten</u> et al., 1997
789-797	826	E90	IC	CLTSTVQLV (SEQ ID NO: 7)	<u>Disis</u> et al., 1994
851-859	862	E89	IC	VLVKSPNHV (SEQ ID NO: 17)	<u>Disis</u> et al., 1994
971-979	863	C85	IC	ELVSEFSRM (SEQ ID NO: 18)	<u>Fisk</u> et al., 1995

Se sintetizaron todos los péptidos, se les dio un número de identificación (núm. PRI) y se evaluaron en cuanto a la capacidad para generar CTL *ex vivo* utilizando el mismo método que emplearon los autores de la presente invención para los epítomos peptídicos de las células T asociados con melanoma. Las células CD8 se aislaron de donantes normales para determinar la capacidad para generar CTL rutinariamente *ex vivo* con células de *Drosophila* cargadas con epítomos peptídicos de CTL conocidos. Los péptidos 826, 835, 861 y 863 tenían la frecuencia de generación de CTL más alta (Tabla 4).

TABLA 4

Frecuencia de Generación de CTL para HER-2/neu en Donantes Normales								
Donante	826	827	835	837	838	861	862	863
193	+		+					
194	+	-	+	-	-	+	-	+
195	+		+			+		+
196	+	-	+	-	-	+		
197	+	-	+	-	+	+	-	+
198	-	-	+	-	+	+	-	+
207	+		+			+		+
212	+		+			+		+
218	+		+			+		+
232	-		+			+		-
233	+		+			+		+
241		+				+		
243		+				+		

Si bien las células de *Drosophila* transfectadas tienen la capacidad única de presentar hasta diez epítopos peptídicos diferentes (Figura 10), los autores de la presente invención seleccionaron los cuatro péptidos HER-2 826, 835, 861 y 863 debido a la frecuencia de generación de CTL para estos péptidos *ex vivo*. Estos cuatro péptidos HER-2 diferentes representan aglutinantes débiles a moderados para la molécula HLA-A2.1 presentada sobre la superficie de las células de *Drosophila* transfectadas. Los autores de la presente invención tienden a incluir los aglutinantes A2 que son débiles, ya que su experiencia con los péptidos asociados con melanoma sugiere que los aglutinantes de clase I débiles generalmente generan CTL potentes que reconocen las células tumorales, si en efecto representan epítopos de las células T nativas. La mayoría de las proteínas asociadas con tumores que han elegido como diana los autores de la presente invención son auto-antígenos y como tales cabría esperar que tuvieran una afinidad elevada por la molécula de clase I que se observa con los péptidos virales. Los aglutinantes bajos a moderados generan generalmente CTL que lisan las células tumorales muy eficazmente. Esto fue demostrado con el péptido MART-1 que es un aglutinante de baja afinidad de las células de *Drosophila* (Figura 3), todavía representa un epítipo que genera rutinariamente CTL potentes capaces de lisan tanto las células diana cargadas con péptidos (T2), o más importantemente, células de melanoma (Maline3M) (Figura 12).

HER-2/neu es un miembro de la familia del EGF-R y funciona como receptor del factor de crecimiento. La proteína HER-2 es expresada durante el desarrollo fetal en seres humanos. En adultos, la proteína es débilmente detectable en las células epiteliales de muchos tejidos normales. En las células normales el gen HER-2 está presente en forma de una copia única. La amplificación del gen y/o la expresión excesiva de la proteína asociada ha sido identificada en muchos cánceres humanos incluyendo el de mama, ovario, útero, estómago, y adenocarcinoma de pulmón. Las diferencias en la secuencia entre HER-2 y el receptor EGF-R se observan en la Tabla 5. Tres de los cuatro péptidos HER-2 que han evaluado los autores de la presente invención tienen tres o más cambios de aminoácidos entre las dos proteínas. Un único cambio de aminoácido es suficiente para discriminar entre las dos proteínas.

TABLA 5

<b>HER-2/neu Frente a EGF-R</b>			
<b><u>PROTEÍNA</u></b>	<b><u>NÚM. PÉPTIDOS</u></b>	<b><u>SECUENCIA (SEQ ID NO)</u></b>	<b><u>NÚM. de CAMBIOS</u></b>
HER-2/neu EGFR	835	KIFGSLAFL (SEQ ID NO: 8) SISGDLHII (SEQ ID NO: 37)	5
HER-2/neu EGFR	861	VMAGVGSPYV (SEQ ID NO:16) VAASVDNPHV (SEQ ID NO: 38)	5
HER-2/neu EGFR	863	ELVSEFSRM (SEQ ID NO 18) ELIIEFSKM (SEQ ID NO: 39)	3
HER - 2/neu EGFR	826	CLTSTVQLV (SEQ ID NO: 7) CLTSTVQLI (SEQ ID NO: 40)	1
HER-2/neu EGFR	689-697	RLLQETELV (SEQ ID NO: 41) RLLQERELV (SEQ ID NO: 42)	1

Una vez que se han generado los CTL después de un protocolo de estimulación *ex vivo* de cuatro semanas, los autores de la presente invención evaluaron si se encontraban presentes células específicas de los péptidos utilizando moléculas tetraméricas HLA-A2.1 preparadas con los péptidos inmunizantes. Como se demuestra en la Figura 13, la capacidad para generar CTL específicos de péptidos dependía del donante. En el Panel A (donante 261), el donante generó una fuerte respuesta de CTL para el péptido 835 (37,55%). En el Panel B (donante 262), se pueden detectar CTL específicos de péptidos con ambas moléculas tetraméricas 835 y 861 (3,6% y 15,1%, respectivamente). Esto apoya el uso de múltiples péptidos para garantizar los CTL específicos de péptidos al final del protocolo de estimulación. Este protocolo *ex vivo* permite generar múltiples CTL específicos de una manera relativamente fácil.

#### 65 Respuestas Anti-Péptido y Anti-Tumor

Una vez completado el protocolo *ex vivo* completo, los CTL generados se evaluaron en cuanto a la especificidad antigénica. Para generar los CTL, el Día 0 las células de *Drosophila* se cargaron con una combinación de los cuatro

## ES 2 306 771 T3

péptidos HER-2. Al final del protocolo de estimulación *ex vivo* de cuatro semanas, se evaluó el cultivo CD8 masivo en cuanto a la especificidad antigénica. Las células T2 cargadas con cada uno de los péptidos inmunizantes se utilizaron como células diana. En la Figura 14, se representa una respuesta típica. El cultivo masivo contiene especificidad para cada uno de los cuatro péptidos HER-2. La respuesta anti-tumoral se evaluó en una línea celular de tumor de ovario (ATCC; HTB-77). Cuando una línea celular diana no está restringida a HLA-A2.1, los autores de la presente invención transfectan la línea celular para tener un sistema de análisis +/- . Cuando HLA-A2.1 fue transfectada en la línea HTB-77, se observó un aumento de la destrucción por las células efectoras CD8 (Figura 15, Paneles A a D). Los efectores específicos de HER-2, que representan los péptidos individuales fueron evaluados para confirmar la presentación de cada uno de los epítomos peptídicos sobre esta línea de células tumorales.

Asimismo se evaluó la línea celular de adenocarcinoma de mama (ATCC; HTB-131), transfectada con HLA-A21 en cuanto a la capacidad para demostrar la lisis tumoral con los efectores peptídicos específicos de HER-2. Los CTL específicos para el péptido 861 pudieron lisar esta línea celular tumoral cuando se transfectaron con HLA-A2.1 (Figura 16).

### *Tratamiento con IFN $\gamma$ y Requerido para la Lisis de las Células Tumorales*

La línea celular HTB-77/A2.1 requiere un pre-tratamiento con IFN  $\gamma$  para demostrar la lisis específica de los péptidos. Las células se trataron con 5000/ml de IFN  $\gamma$  (actividad específica de 25 ng/ml) durante veinticuatro horas antes del inicio del análisis de liberación de Cr<sup>51</sup>. En la Figura 17, la adición del IFN  $\gamma$  dio como resultado un aumento de la lisis de la línea celular transflectada con HLA-A2.1. Para determinar el efecto de esta dosis de IFN  $\gamma$  sobre la expresión superficial tanto de HLA-A2.1 como de HER-2, se realizó un análisis FACS para determinar los niveles de estas moléculas después de veinticuatro y cuarenta y ocho horas de inducción. La Figura 18, Paneles A y B representa los resultados del análisis FACS. En el Panel A, no había aumento de la molécula HER-2 sobre la superficie de las células HTB-77 a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de la inducción con IFN  $\gamma$ . En las células transflectadas con HLA-A2.1, ni HER-2 ni HLA-A2.1 demostraron un incremento en el nivel superficial de expresión después de un protocolo de tratamiento similar. Lo que se observó fue un incremento en el nivel de expresión de TAP-1, así como de HLA-DM y -DR, Catapsina S y D y Caspasa 5, cuando se evaluaron los niveles de ARNm mediante análisis con chips de ADN en micromatrices (Figura 19). Esto explicaría por qué hay un aumento de la destrucción de las células HTB-77/A2.1 en presencia de IFN  $\gamma$ . Una regulación al alza de esta molécula concreta daría como resultado un procesamiento más eficaz de la molécula HER-2, permitiendo una mejor presentación de los péptidos de interés.

### *Péptidos*

Se elaboraron péptidos sintéticos mediante química de Fmoc normalizada utilizando un sintetizador peptídico (Gilson Company, Inc.). Todos los péptidos fueron purificados hasta una pureza de >95% mediante HPLC en fase reversa sobre una columna C-8. La pureza y la identidad se establecieron utilizando un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización. Los péptidos asociados con el melanoma incluyeron: el péptido 819 que era específico de MART-1 (AAGIGILTV SEQ ID NO: 6), 817 y 853 que eran ambos péptidos gp100 (TTDQVPFSV SEQ ID NO: 4 y KTWGQYWQV SEQ ID NO: 5, respectivamente), péptidos específicos de tirosinasa que eran 689 y 792, representando 792 la versión modificada post-traducciona (YMDGTMSQV SEQ ID NO: 2) de la secuencia nativa (YMNGTMSQV SEQ ID NO: 1) representada por el péptido 689. Los péptidos 826 (CLTSTVQLV SEQ ID NO: 7) y 835 (IQFGSLAFL SEQ ID NO: 8) representaban las secuencias HER-2/neu de los dominios intracelular y extracelular, respectivamente de la proteína p185. Pec60<sub>20</sub> (ALALAALLW SEQ ID NO: 10) Pec60<sub>25</sub> (ALLWDREV SEQ ID NO: 11) eran secuencias solapantes que representaban una proteína mucinosa detectada en las líneas tumorales de ovario. La C-lectina también era una proteína detectada en líneas celulares de tumor de ovario y un péptido de su secuencia (C-lectina<sub>8</sub>) está representado por KMASRSMRL SEQ ID NO: 9.

### *Análisis de Citotoxicidad In Vitro*

Se realizaron análisis de liberación de Cr<sup>51</sup> normalizados para determinar el reconocimiento por las células efectoras de CTL de los epítomos peptídicos asociados con el melanoma cargados en células T2. Se hicieron crecer 3x10<sup>6</sup> células T2 cosechadas en RPMI + FBS al 10% (medio). Se añadieron 0,1 mCi de Cr<sup>51</sup> y se incubaron a 37°C en un baño de agua. Las células marcadas se añadieron a 10 ml de lavado al 4% (RPMI + 4% FBS) y sedimentó, se lavaron dos veces más, y se re-suspendieron en medio a una concentración final de 0,2 x 10<sup>6</sup>/mL para registrar la radiactividad de las células lisadas espontáneamente frente a las lisadas con detergente. Las células fueron pulsadas con el péptido o los péptidos apropiados a 20  $\mu$ g/mL durante treinta minutos. Se añadieron 50  $\mu$ L a cada placa de 96 pocillos que contenían cada una células efectoras CD8 a 10, 2, 0,4, y 0,08 x 10<sup>6</sup>/mL, que se incubaron a 37°C durante seis horas, se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes.

### *Citometría de Flujo y Tinción Tetramérica*

Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC o PE mediante incubación a 4°C durante 30 minutos en tampón FACS (BSA al 1%, NaN<sub>3</sub> al 0,02% en PBS), seguido de lavado en el mismo tampón.

## ES 2 306 771 T3

Las células se fijaron en formaldehído al 0,5% antes de la adquisición de datos y del análisis en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) con su soporte lógico CellQuest. La tinción no específica se midió con el mismo anticuerpo secundario utilizado para marcar los anticuerpos primarios purificados, o un control de isotipo emparejado cuando los anticuerpos primarios fueron marcados directamente. La tinción tetramérica se realizó con moléculas tetraméricas HIVgag específicas de HLA-A2.1 (Beckman Coulter) que albergaban la secuencia SLYVTVATL SEQ ID NO: 43 como control negativo. Los tetrámeros específicos de HER-2 se elaboraron con los péptidos de secuencias CLTSTVQLV (826 SEQ ID NO: 7), KIFGSLAFL (835 SEQ ID NO: 8), o VMAGVGFSPYV (861 SEQ ID NO: 16). Se utilizaron los complejos de péptido HLA-A2.1 tetraméricos marcados con PE junto con anticuerpos monoclonales anti-CD8a humano (BD PharMagen) marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para teñir las células T CD8+ específicas del epítipo como se describe en el prospecto del envase. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con dos colores en un FACScan Becton Dickinson, y las células T CD8+ reunidas se examinaron en cuanto a la tinción con los complejos de péptido HLA-A2.1 tetraméricos.

### 15 Ejemplo 4

#### *Generación de CTL Específicos de Mama y Ovario Adicionales con Este Protocolo de Estimulación Ex Vivo*

Los autores de la presente invención demostraron la capacidad para generar respuestas de CTL a todos los epítipos peptídicos restringidos a HLA-A2.1 conocidos para diversos antígenos tumorales de diferentes orígenes tumorales. Los estudios iniciales de los autores de la presente invención se enfocaron al melanoma en los que fueron capaces de demostrar respuestas clínicas objetivas en pacientes tratados con CTL específicos para cuatro epítipos peptídicos específicos diferentes para las proteínas asociadas con melanoma MART-1, gp100 y tirosinasa [Richards *et al.*, *Amer. Soc. Clin. Oncol.*, San Francisco, California (2001, May)].

Para ampliar la capacidad para originar CTL a otros antígenos tumorales presentes en una amplia variedad de otros cánceres, los autores de la presente invención han seleccionado secuencias publicadas y novedosas para antígenos tumorales comunes a varios tipos de tumores diferentes. Estos incluyen AES, MUC-1, CEA, FBP, C-Lectina, NY-ESO-1, Pec60, CA-125, MAGE-3, telomerasa y G250. La Tabla 7 describe estos antígenos, la frecuencia de expresión y los cánceres que los expresan. La frecuencia de respuesta a estos péptidos con el protocolo de estimulación *ex vivo* de los autores de la presente invención se enumera en la Tabla 6.

35 (Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

**TABLA 6**

Frecuencia de Respuesta a Epítomos Peptídicos de Mama y Ovario en Donantes Normales																	
Donante	879	893	894	899	900	901	902	903	906	907	908	909	910	911	912	913	914
<u>248</u>	+	+	+														
<u>249</u>	+	+	+														
<u>250</u>	+	-	+														
<u>251</u>	-	-	+														
<u>252</u>	+	-	+														
<u>253</u>	-	-	+	+													
<u>254</u>	+	-	+	+													
<u>255</u>					-	+	+	-	+	+	+	+					
<u>256</u>					+	-	+	+	+	+	-	+					
<u>257</u>													+	+			
<u>259</u>													+	-			
<u>260</u>					-	-	-	-								+	
<u>261</u>									+	+	+	+					
<u>262</u>									+	+	-	+					-
<u>265</u>	+	+	+	+	-	-	-	-	+				+	+			

TABLA 6

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

<b>Descripciones de Antígenos Tumorales</b>	
<b><u>Antígeno</u></b>	<b><u>Descripción</u></b>
CA-125	El antígeno de Cáncer 125 es un marcador celular epitelial expresado por tumores de ovario y algunas líneas celulares de ovario. Aproximadamente 85% de los pacientes con cáncer de ovario tienen un incremento de CA125 en suero y es utilizado comúnmente como marcador tumoral en suero. (Cancer Letters (1999, Oct.) 145(1-2) págs. 133-141)
MUC-1	La mucina es una glicoproteína transmembrana expresada en epitelio tanto normal como maligno. La forma infra-glicosilada de MUC-1 es expresada en exceso en la superficie celular de muchos adenocarcinomas humanos tales como el cáncer de mama y de ovario, así como malignidades hematológicas incluyendo el mieloma múltiple y el linfoma de las células B. (Blood (1999, Junio) 93(12) págs. 4309-4317)
G250	Un antígeno asociado con el carcinoma renal expresado en 85% de las RCC pero no en tejido de riñón normal. Es idéntico al antígeno asociado con tumores MN/CAIX que es expresado aproximadamente en 50% de los cánceres de mama. (Cancer Research (1999, Nov.);59(21) págs. 5554-5559)
FBP	La proteína de unión a folato es un receptor implicado en el transporte de folato. Es expresada en exceso en más de 90% de los tumores de ovario y en 20-50% de los cánceres de mama. (Anticancer Research (1999 Jul-Ago) 19(4B) págs. 2907-2916)

## ES 2 306 771 T3

### Descripciones de Antígenos Tumorales

<u>Antígeno</u>	<u>Descripción</u>
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p>	<p>HER-2/neu</p> <p>Un proto-oncogen (HER-2) que codifica una proteína transmembrana similar en secuencia y estructura a EGF-R. HER-2/neu es expresado en exceso tanto como 200 veces más que en los tejidos normales en tumores de mama y ovario. También ha sido identificado en carcinomas de pulmón y células renales. (J. Exp. Med. (1995, Junio) Vol. 181, págs. 2109-2117)</p>
<p>25</p> <p>30</p> <p>35</p>	<p>NY-ESO-1</p> <p>Un antígeno cáncer-testis encontrado en 30% de los cánceres de mama, próstata y ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello y melanoma. Los pacientes que tienen cánceres con tumores que expresan este antígeno tienen normalmente también anticuerpos circulantes contra él. (J. Immunology (2000) vol. 165 págs. 948-955)</p>
<p>40</p> <p>45</p> <p>50</p>	<p>CEA</p> <p>El antígeno carcinoembrionario es un antígeno asociado con tumores expresado frecuentemente en tumores epiteliales (colon, mama, pulmón). Los niveles de CEA en suero se pueden corresponder con el estado de la enfermedad y se utilizan para controlar el tratamiento y la reaparición de la enfermedad. (Human Immunology (1998) vol. 59 págs. 1-14)</p>

55

60

65

**Descripciones de Antígenos Tumorales**

<u>Antígeno</u>	<u>Descripción</u>
MAGE-3	Un antígeno cáncer-testis expresado en 70-80% de las lesiones y las líneas celulares de melanoma metastásicas. Es miembro de la familia de las proteínas asociadas al melanoma o MAGE. Además, se ha encontrado MAGE-3 en 20-60% de las células tumorales epiteliales (carcinomas de colon, mama, pulmón, gástricos). (Human Immunology (1998) vol. 59 pg, 1-14)
AES	El potenciador de amino de la proteína discontinua es parte de un grupo de represores transcripcionales codificado por el Potenciador de genes discontinuos. Este antígeno tumoral fue identificado en linfocitos tumorales asociados de tumores de ovario y mama. (Molecular Immunology (1998) 35(17) págs. 1121-1133)
HTR	La telomerasa (hTR) es un tipo especializado de transcriptasa inversa (hTRT o hTER1) que cataliza la síntesis y extensión del ADN telomérico. La actividad de esta enzima es elevada en aproximadamente 90% de todos los tumores humanos incluyendo cánceres de mama, tiroides, vejiga, cérvix, próstata, colon, páncreas y estómago. (Cancer Research (2001, Dec) 61(23) págs. 8366-8370)

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una suspensión CD8<sup>+</sup> para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer que  
5 comprende:
- a. preparar una línea celular presentadora de antígenos no natural (nnAPC), donde dicha nnAPC presenta de  
cuatro a diez moléculas peptídicas diferentes asociadas con dicho cáncer simultáneamente donde dichas  
10 moléculas peptídicas tienen cada una aproximadamente de seis a doce aminoácidos de longitud;
  - b. estimular las células CD8<sup>+</sup> cosechadas a partir de dicho sujeto o donante adecuado con dicha línea celular  
nnAPC;
  - c. añadir dichas células CD8<sup>+</sup> a un medio que contiene una citoquina, seleccionada del grupo que consiste  
15 en IL-2, IL-7 o medio de crecimiento acondicionado (CGM), donde dichas citoquinas se pueden utilizar  
individualmente o combinadas;
  - d. mezclar monocitos de sangre periférica no suspendidos, o alternativamente, monocitos de sangre periférica  
empobrecidos en CD8 recogidos de dicho sujeto o donante adecuado con aproximadamente 1 a 50 µg/ml  
20 de uno de dichos péptidos que dicha nnAPC presenta simultáneamente;
  - e. irradiar dicha suspensión de monocitos de sangre periférica con una dosis suficiente de radiación γ necesaria  
para evitar la proliferación de estas células en la suspensión, excepto los monocitos de sangre periférica  
deseados;
  - 25 f. aislar los monocitos de sangre periférica adherentes;
  - g. cargar dichos monocitos de sangre periférica adherentes con aproximadamente 1 mg/ml a 50 µg/ml de cada  
uno de los péptidos mencionados; y
  - 30 h. combinar dichas células CD8<sup>+</sup> con dichos monocitos de sangre periférica adherentes en una proporción de  
aproximadamente diez células CD8<sup>+</sup> por monocito de sangre de periférica.
2. El método de la reivindicación 1, donde dichas moléculas peptídicas tienen aproximadamente ocho a diez  
35 aminoácidos de longitud.
3. El método de la reivindicación 1, donde dichas moléculas peptídicas están en un intervalo de concentración de  
10 nM a 100 µM.
- 40 4. El método de la reivindicación 1, donde dicho componente citoquina es IL-2.
5. El método de la reivindicación 1, donde dicho componente citoquina es IL-2 e IL-7 combinadas.
6. El método de la reivindicación 1, donde la dosis de irradiación es de 3.000 a 7.000 rads.  
45
7. El método de la reivindicación 1, donde la dosis de irradiación es de aproximadamente 5.000 rads.
8. El método para preparar una suspensión CD8<sup>+</sup> para su uso en el tratamiento de un sujeto con cáncer que com-  
50 prende:
- a. preparar una línea celular presentadora de antígenos no natural (nnAPC), donde dicha nnAPC presenta de  
4 a 10 moléculas peptídicas diferentes asociadas con dicho cáncer simultáneamente;
  - 55 b. estimular las células CD8<sup>+</sup> cosechadas a partir de dicho sujeto con dicha línea celular nnAPC durante  
aproximadamente 6 a 7 días;
  - c. estimular dichas células CD8<sup>+</sup> con IL-2 e IL-7 en el medio;
  - 60 d. mezclar monocitos de sangre periférica no suspendidos, o monocitos de sangre periférica empobrecidos en  
CD8<sup>+</sup> recogidos de dicho sujeto con aproximadamente 20 µg/ml de cada péptido;
  - e. irradiar dichos monocitos de sangre periférica con aproximadamente 5.000 rads de radiación γ;
  - 65 f. aislar los monocitos de sangre periférica adherentes;
  - g. cargar dichos monocitos de sangre periférica adherentes con aproximadamente 1 mg/ml a 50 µg/ml de cada  
uno de los péptidos mencionados;

## ES 2 306 771 T3

- h. combinar dichas células CD8<sup>+</sup> con dichos monocitos de sangre periférica adherentes en una proporción de aproximadamente diez células CD8<sup>+</sup> por monocito de sangre de periférica;
- 5 i. estimular dicha suspensión combinada de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica durante aproximadamente seis a siete días;
- j. estimular dicha suspensión de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica con IL-2 e IL-7 en el medio;
- 10 i. analizar la suspensión de CD8<sup>+</sup> en cuanto a la actividad, pureza, esterilidad y contenido en endotoxinas de los CTL adecuados.

9. El método de la reivindicación 8, donde cada péptido tiene aproximadamente de ocho a diez aminoácidos de longitud.

10. Un método para preparar una suspensión de CD8<sup>+</sup> para su uso en el tratamiento de un sujeto con melanoma que comprende:

- 20 a. preparar una línea celular presentadora de antígenos no natural (nnAPC), donde dicha nnAPC presenta de 4 a 10 moléculas peptídicas diferentes asociadas con dicho melanoma simultáneamente donde cada péptido tiene de ocho a diez aminoácidos de longitud;
- 25 b. estimular las células CD8<sup>+</sup> cosechadas a partir de dicho sujeto con dicha línea celular nnAPC durante aproximadamente 6 a 7 días;
- c. estimular dichas células CD8<sup>+</sup> con IL-2 e IL-7 en el medio;
- 30 d. mezclar monocitos de sangre periférica no suspendidos o monocitos de sangre periférica empobrecidos en CD8<sup>+</sup> recogidos de dicho sujeto con aproximadamente 20 µg/ml de cada péptido que dicha nnAPC presenta;
- e. irradiar dichos monocitos de sangre periférica con aproximadamente 5.000 rads de radiación γ;
- 35 f. aislar los monocitos de sangre periférica adherentes;
- g. cargar dichos monocitos de sangre periférica adherentes con aproximadamente 1 mg/ml a 50 µg/ml de cada uno de los péptidos mencionados;
- 40 h. combinar dichas células CD8<sup>+</sup> con dichos monocitos de sangre periférica adherentes en una proporción de aproximadamente diez células CD8<sup>+</sup> por monocito de sangre de periférica;
- i. estimular dicha suspensión de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica durante aproximadamente seis a siete días;
- 45 j. estimular dicha suspensión de células CD8<sup>+</sup> y monocitos de sangre periférica con IL-2 e IL-7 en el medio;
- y
- k. analizar la suspensión CD8<sup>+</sup> en cuanto a la actividad, pureza, esterilidad y contenido en endotoxinas de los CTL adecuados.
- 50

11. El método de la reivindicación 10 donde dicha nnAPC presenta los péptidos Tirosinasa<sub>369-377</sub>, Tirosinasa<sub>207-216</sub>, gp100<sub>209-217</sub>, gp100<sub>154-162</sub>, MART-1<sub>27-35</sub>, HER-2/neu<sub>789-797</sub>, HER-2/neu<sub>369-377</sub>, C-lectina<sub>8-16</sub>, Pec60<sub>20-29</sub>, y Pec60<sub>25-33</sub>.

55 12. Una célula presentadora de antígenos no natural (nnAPC) derivada de células de *Drosophila melanogaster* transfectadas con ácido nucleico que expresa moléculas HLA de clase I humanas, moléculas de unión, y moléculas co-estimuladoras, donde dicha nnAPC presenta las siguientes diez moléculas peptídicas simultáneamente, Tirosinasa<sub>369-377</sub>, Tirosinasa<sub>207-216</sub>, gp100<sub>209-217</sub>, gp100<sub>154-162</sub>, MART-1<sub>27-35</sub>, HER-2/neu<sub>789-797</sub>, HER-2/neu<sub>369-377</sub>, C-lectina<sub>8-16</sub>, Pec60<sub>20-29</sub>, y Pec60<sub>25-33</sub>.

60

13. Un método para fabricar células presentadoras de antígenos no naturales (nnAPC) capaces de presentar hasta diez moléculas peptídicas simultáneamente, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 65 a. preparar una línea celular de insecto a partir de huevos de *Drosophila melanogaster*;
- b. hacer crecer dichas células de insecto en un medio que es adecuado para desarrollar células de insecto, preferiblemente Medio para *Drosophila* de Schneider®;

## ES 2 306 771 T3

- c. elaborar un plásmido pRmHa-3 a partir de un vector de expresión pRmHa-1, donde dicho plásmido pRmHa-3 incluye un promotor de metalotioneína, secuencias consenso de respuesta a metales y un gen de alcohol deshidrogenasa que porta una señal de poliadenilación aislada de *Drosophila melanogaster*;
- 5 d. insertar en dicho plásmido pRmHa-3 ADN complementario para HLA A21 de clase I humana, B7.1, B7.2, ICAM-1, microglobulina  $\beta$ -2 y LFA-3, donde A2.1 puede ser sustituido por cualquier secuencia de ADN de clase I humana;
- 10 e. transfectar dichas células de insecto con un plásmido phshneo y dicho plásmido pRmHa-3 que contiene ADN complementario; y,
- f. crear nnAPC poniendo en contacto dichas células de insecto con  $\text{CuSO}_4$  para inducir la expresión de los genes transfectados en dichas células de insecto.

15 14. El método de la reivindicación 13, donde dicha línea celular de insecto se prepara haciendo crecer las células durante doce días, seleccionando las células deseadas con péptidos que son capaces de identificar dichas células deseadas, y expandiendo dichas células deseadas con OKT3 e IL-2.

20 15. El método de la reivindicación 14, donde dichos péptidos capaces de identificar dichas células deseadas son tetrámeros.

25 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde dichas moléculas peptídicas de la etapa (a) se selecciona entre los péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 1 a 42.

Figura 1

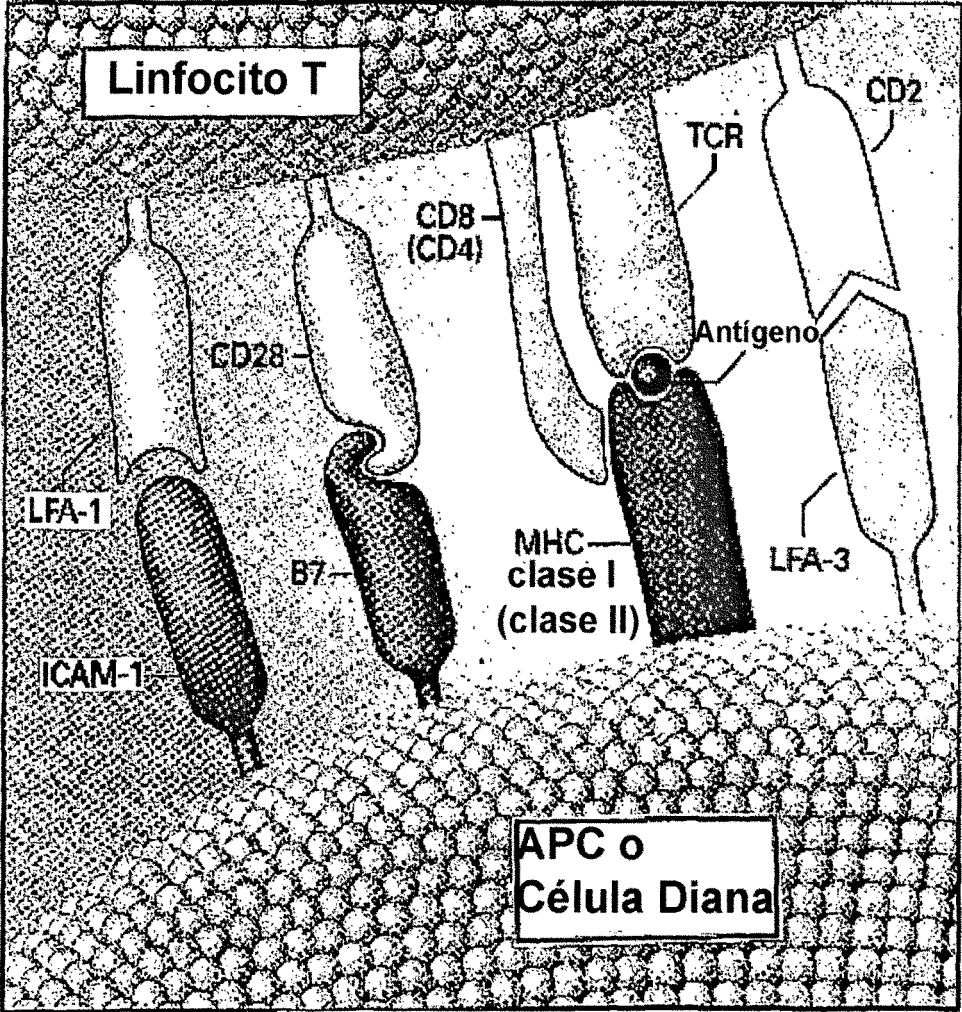
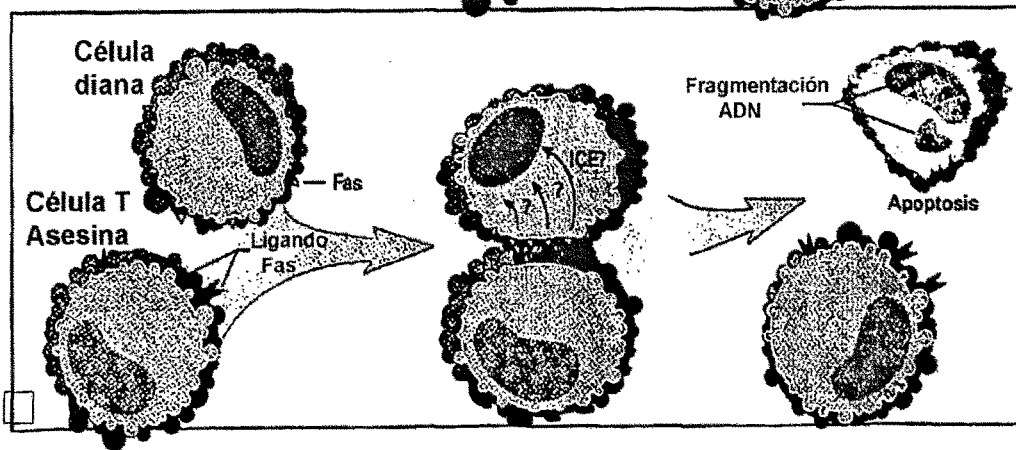
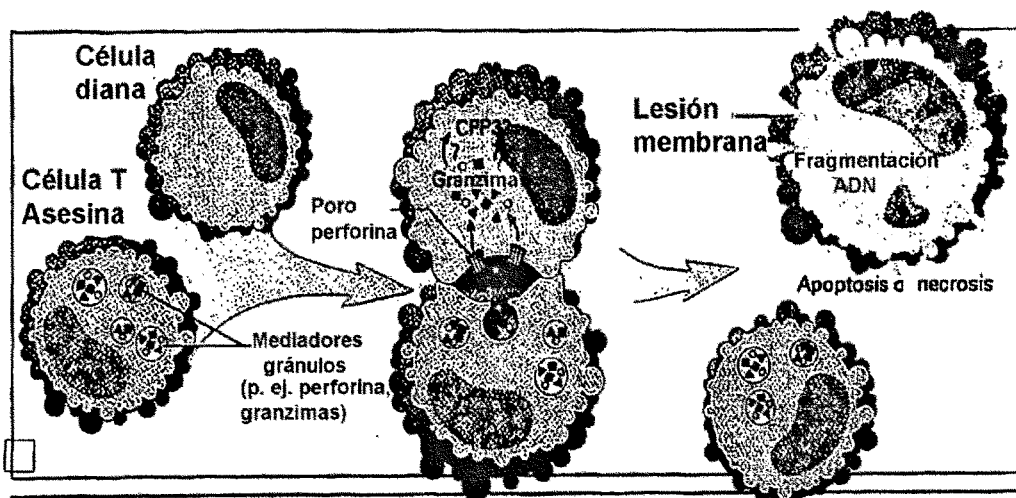


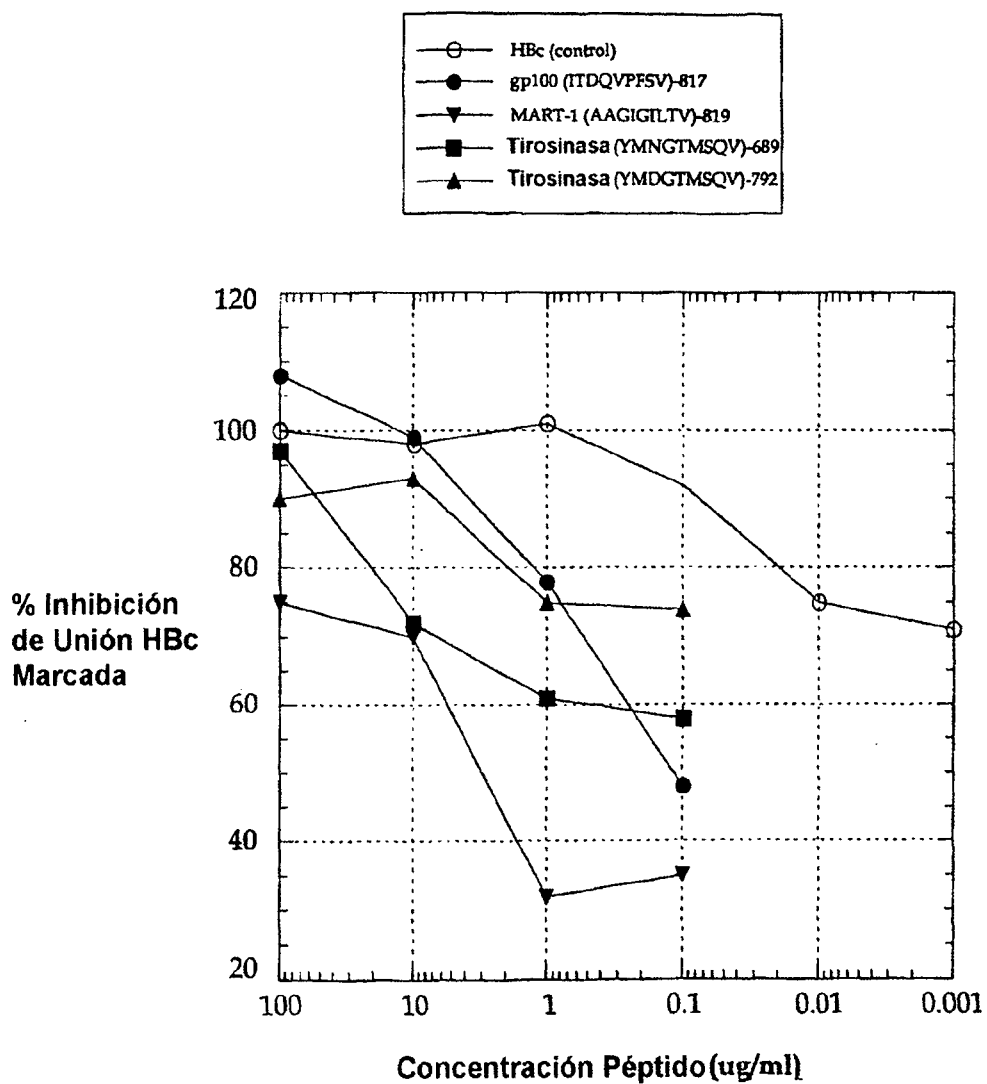
Figura 2

Panel A



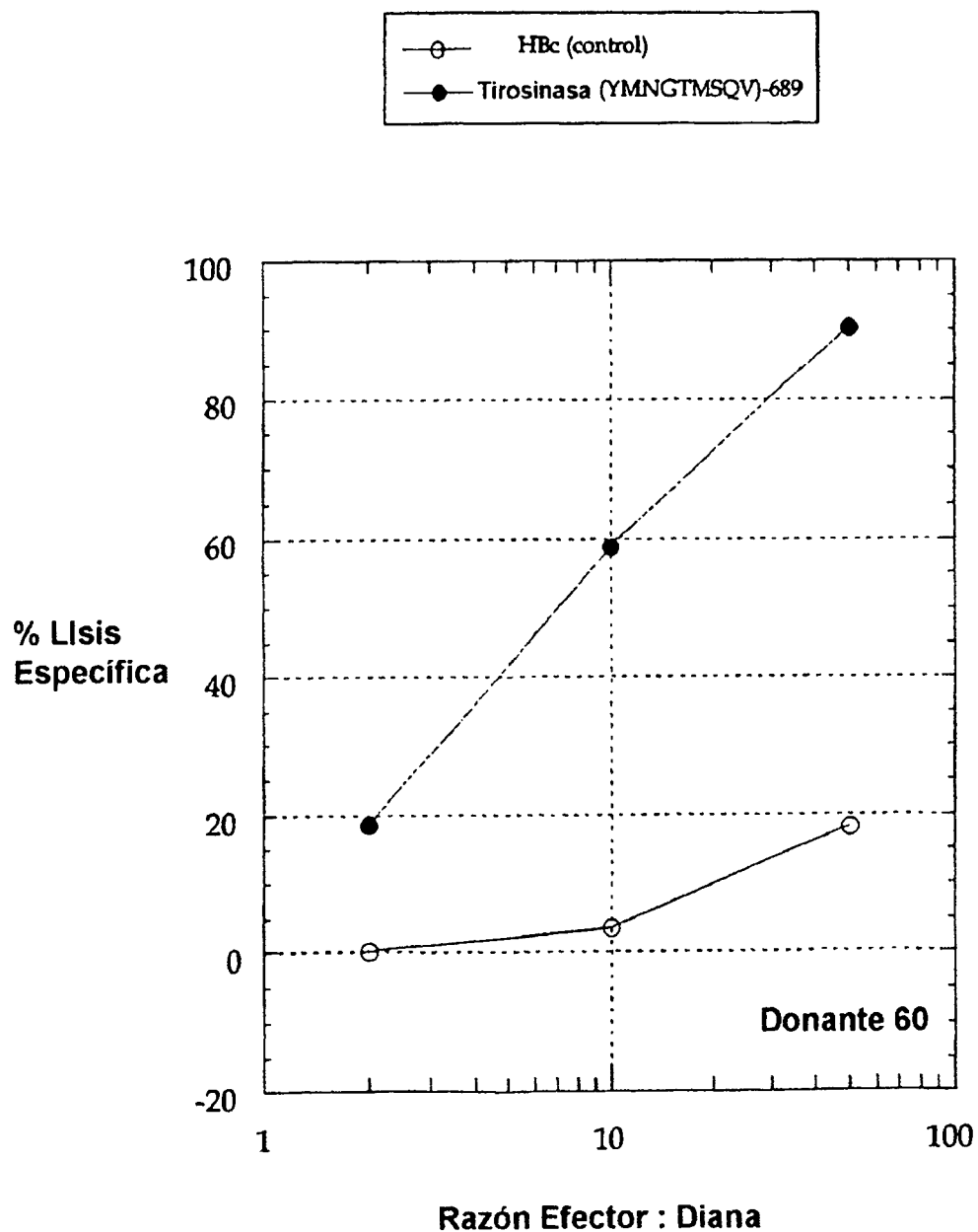
Panel B

Figura 3

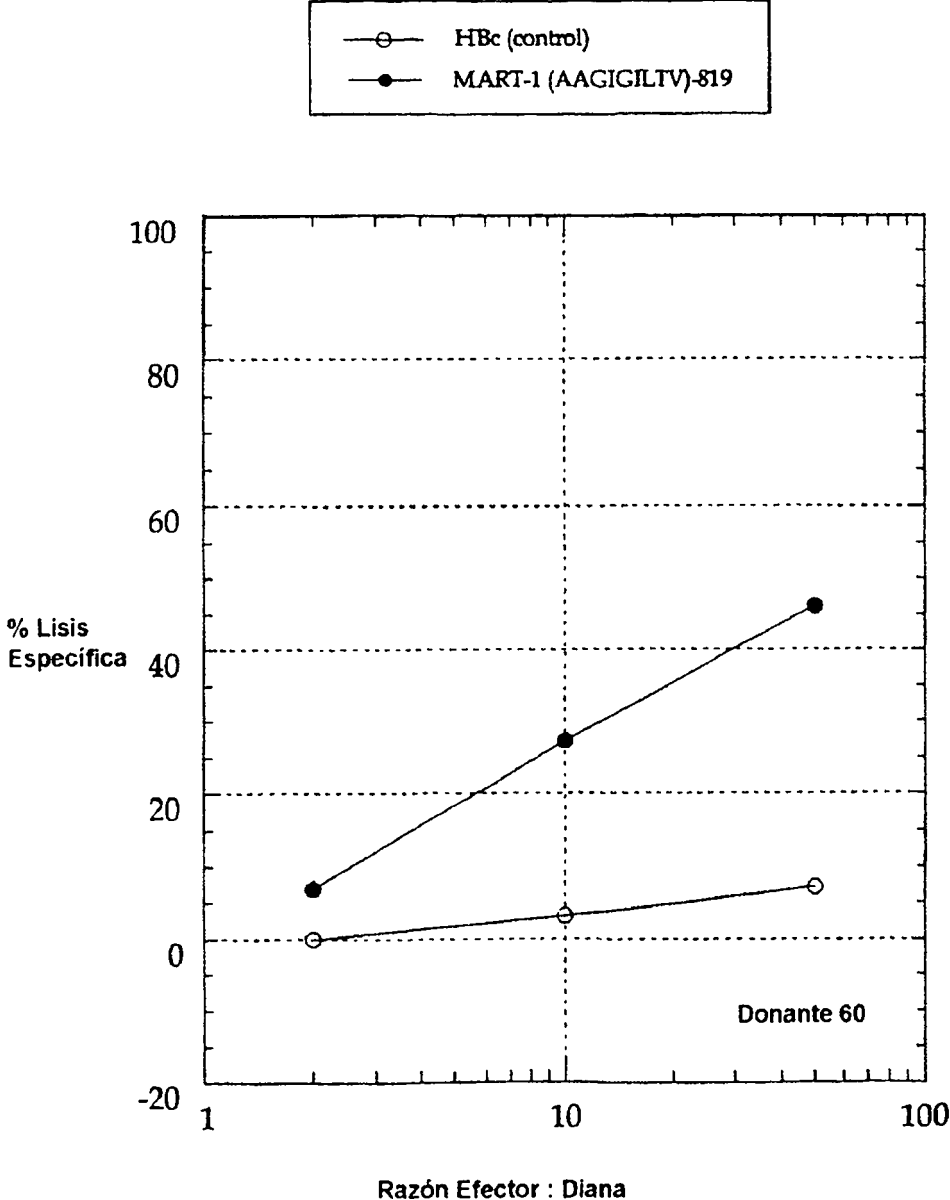


**Figura 4**

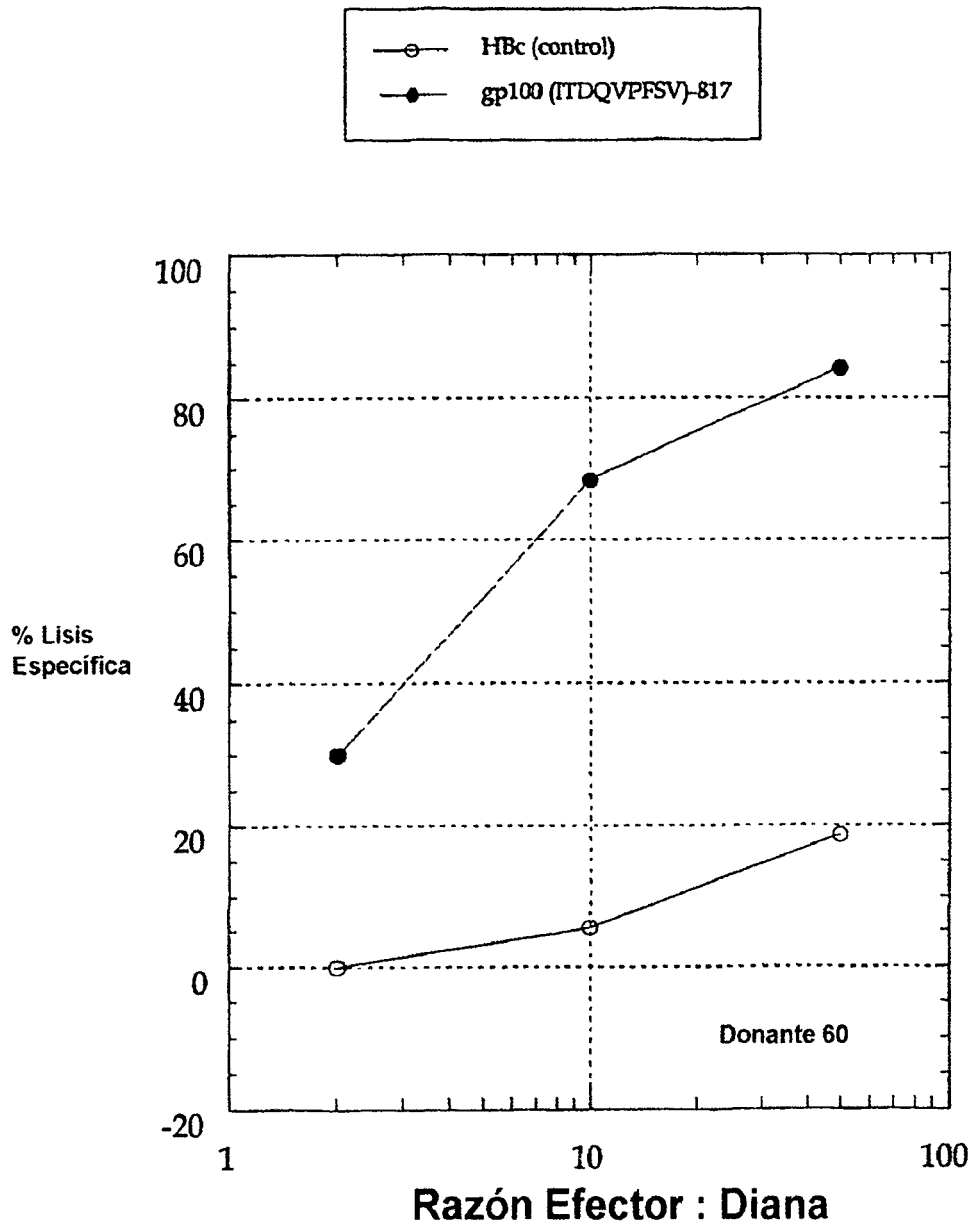
Panel A



**Figura 4**  
**Panel B**

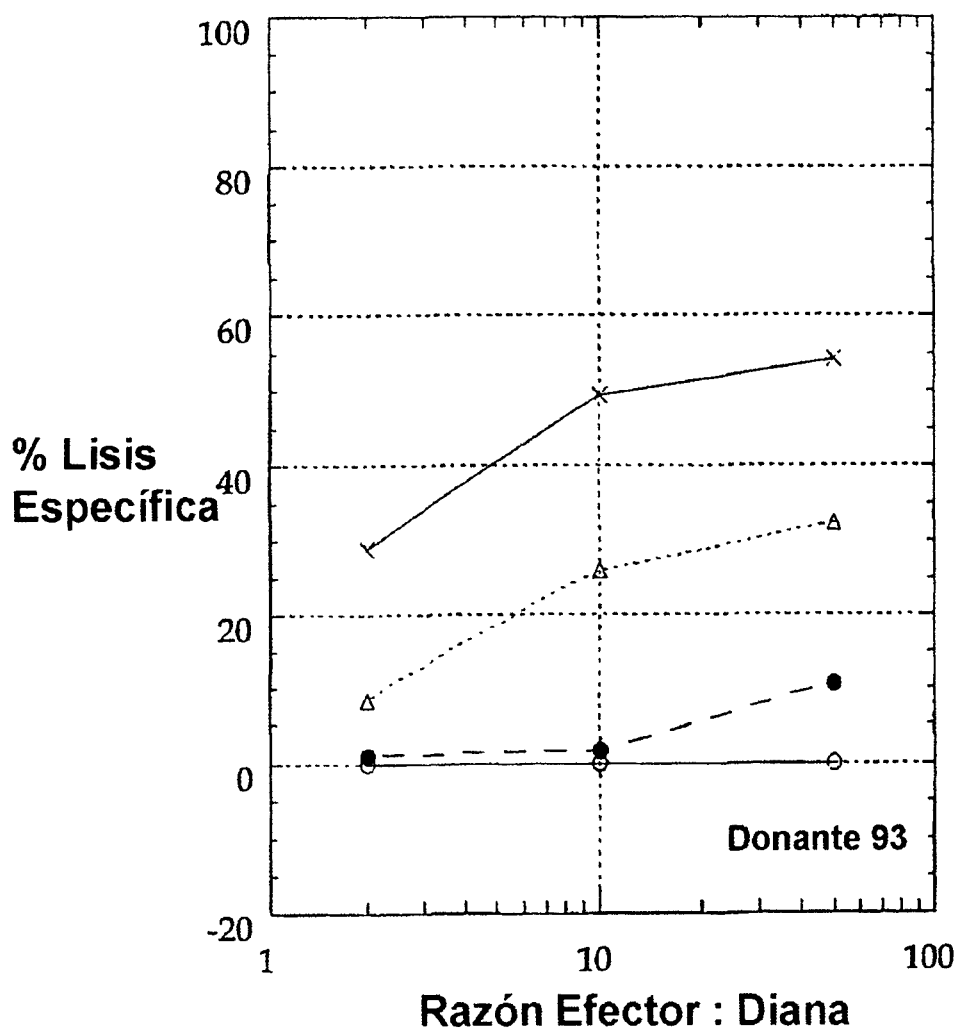
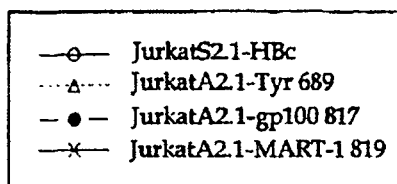


**Figura 4**  
**Panel C**



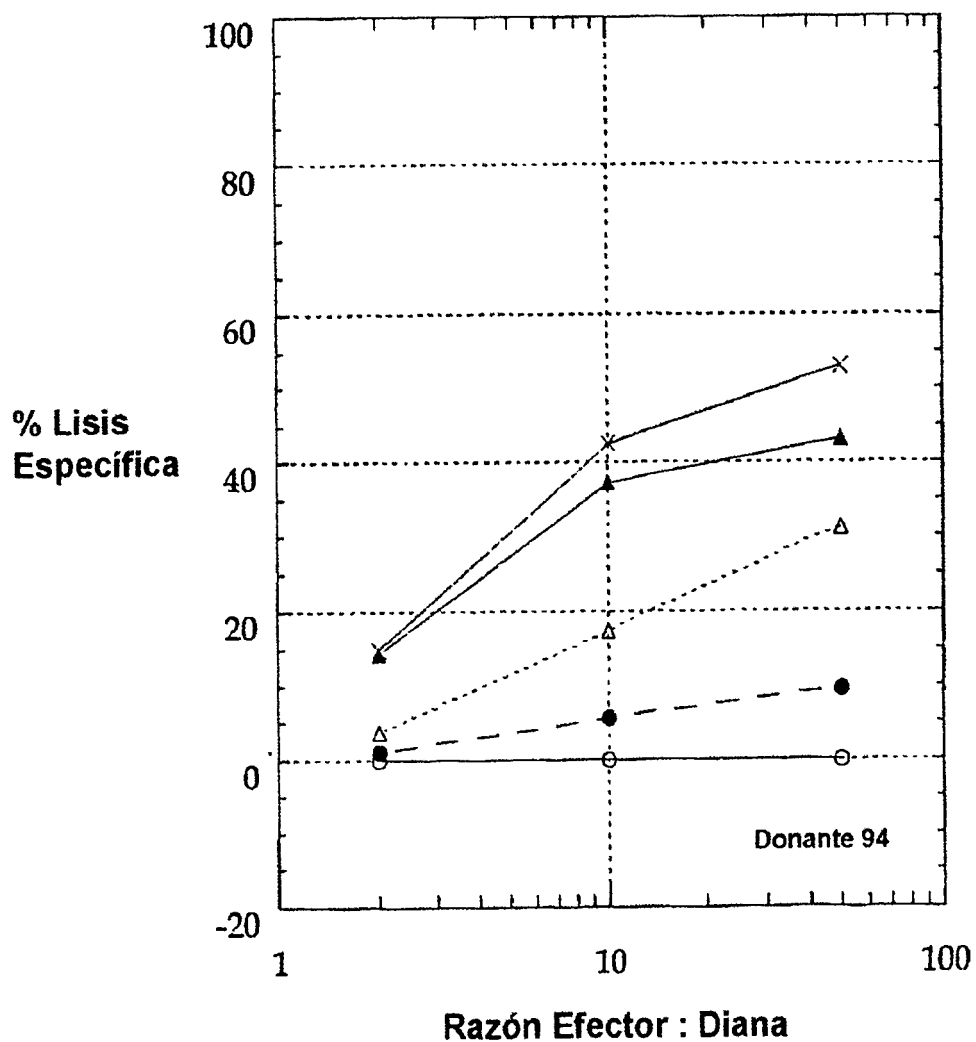
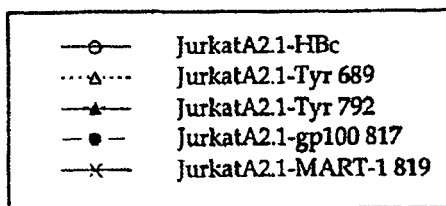
**Figura 5**

Panel A



**Figura 5**

Panel B



**Figura 5**

Panel C

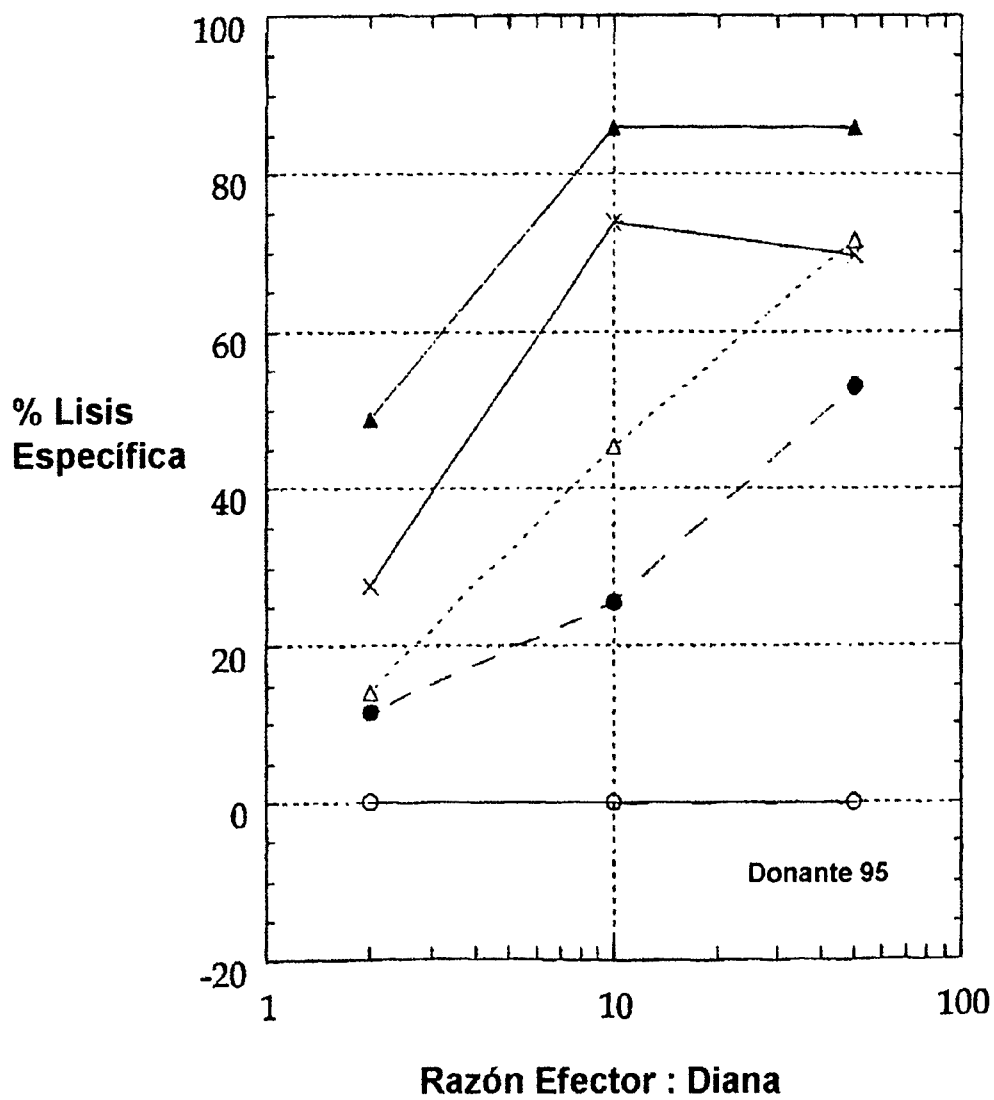
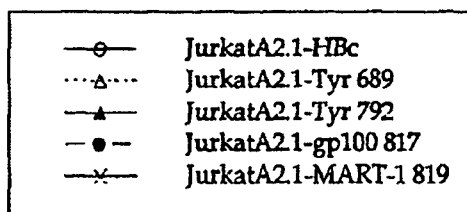
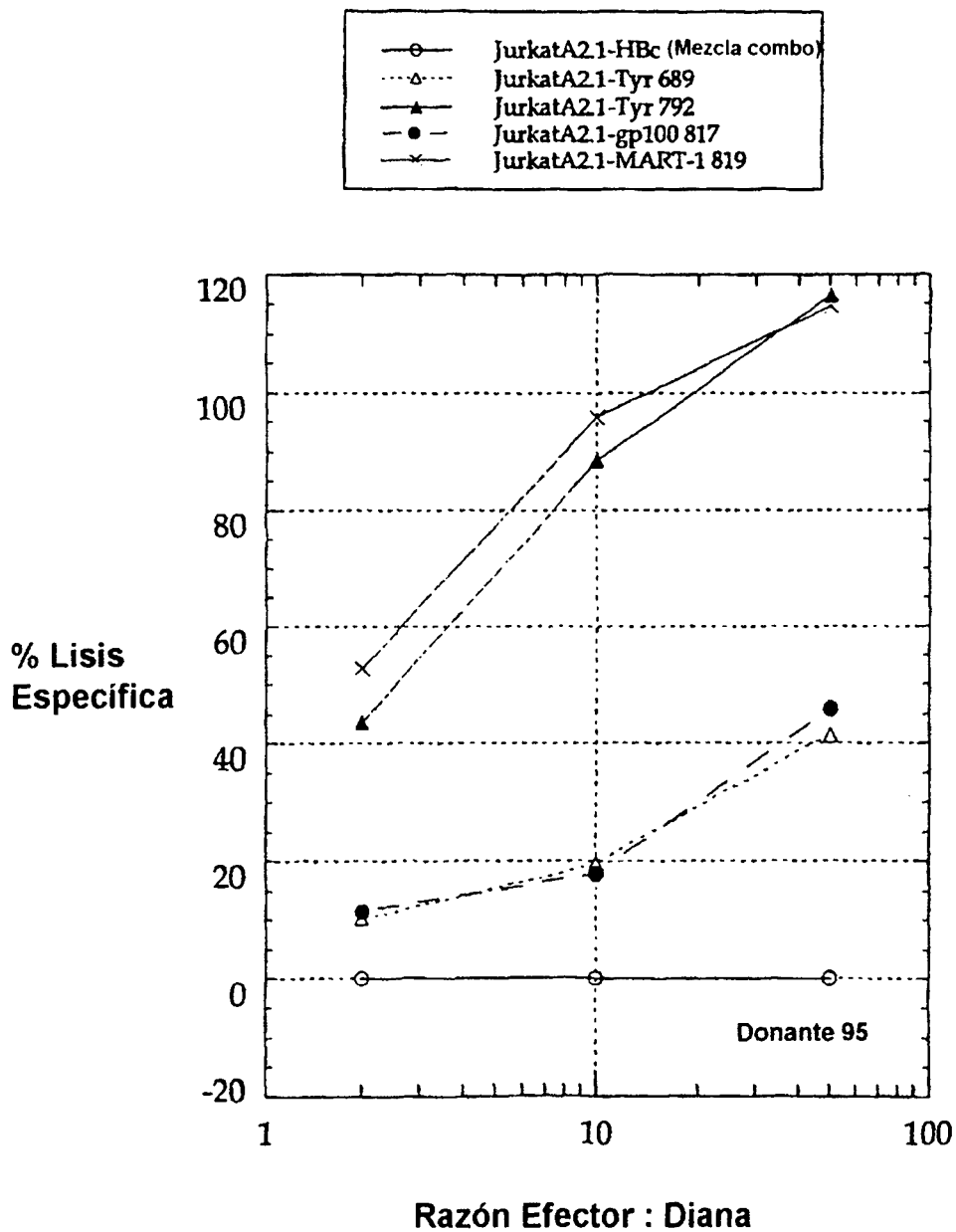


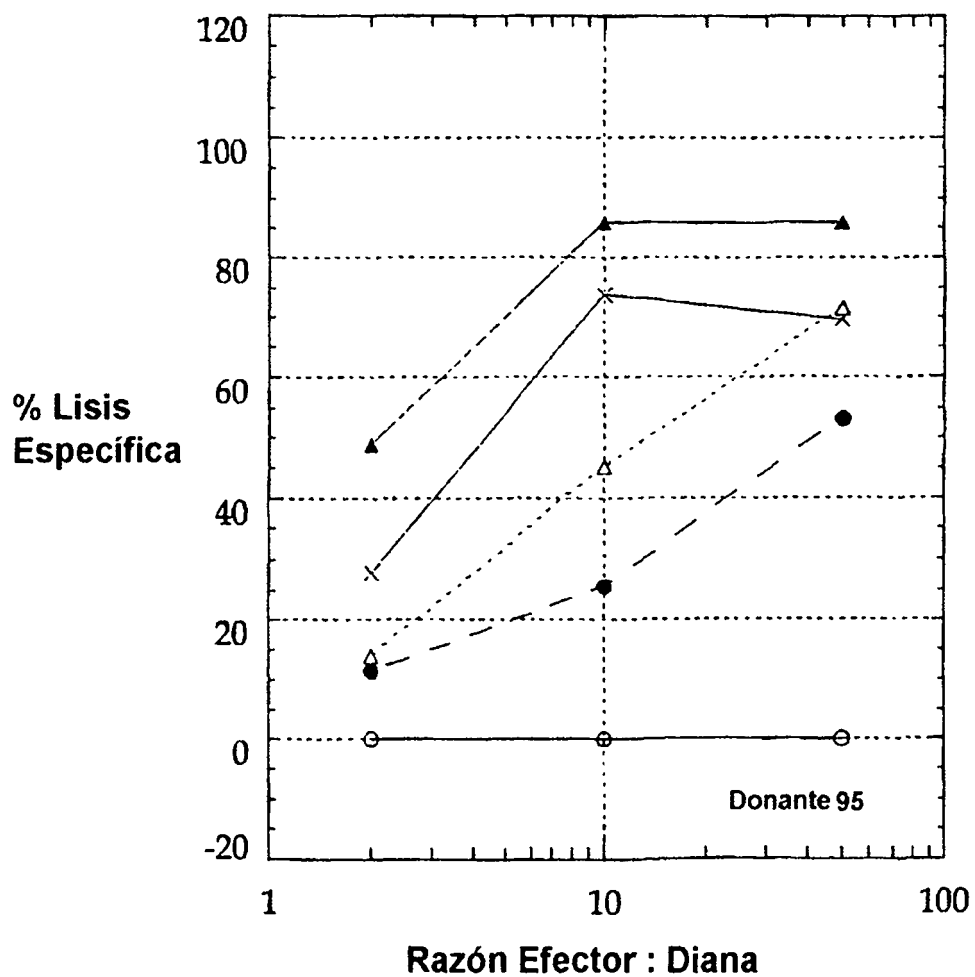
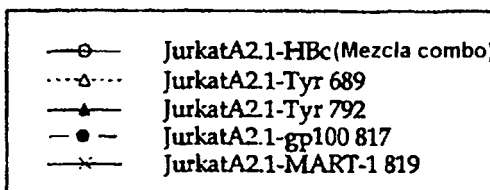
Figura 6

Panel A



**Figura 6**

**Panel B**



**Figura 6**

Panel C

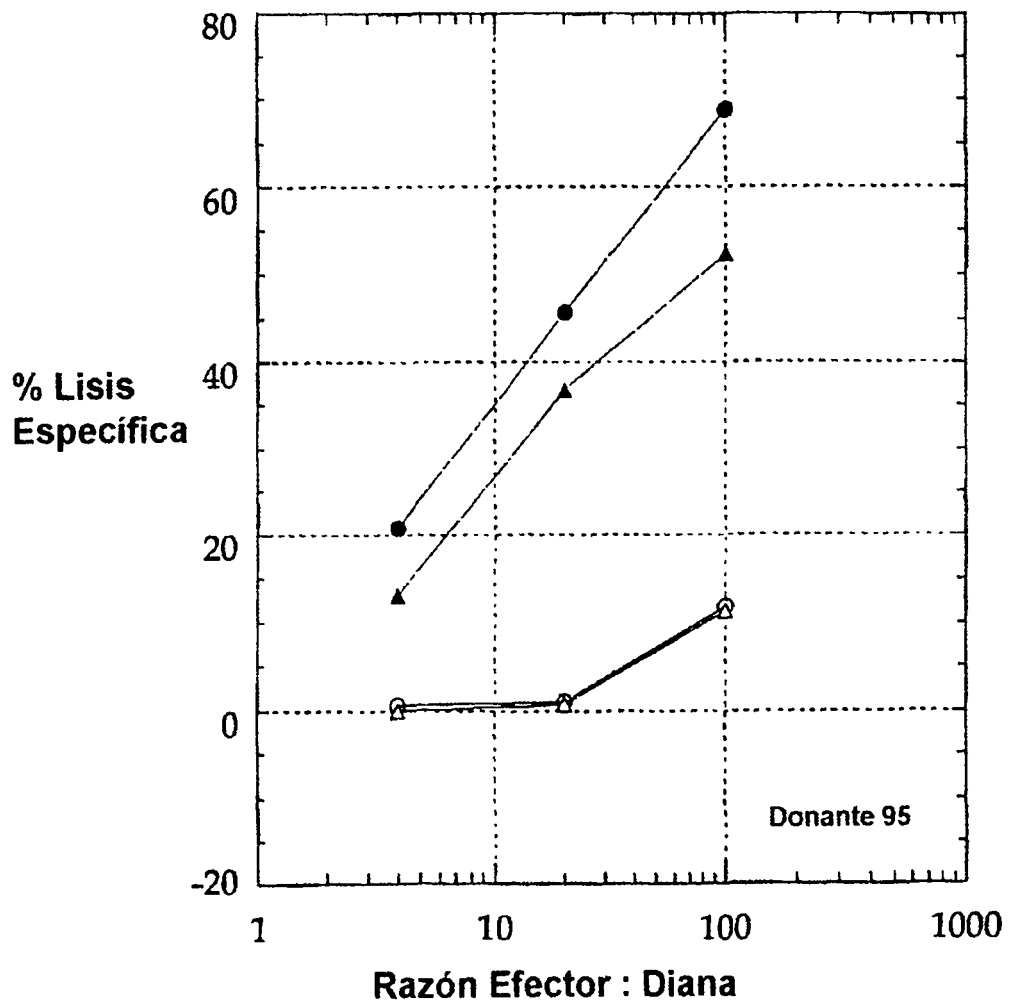
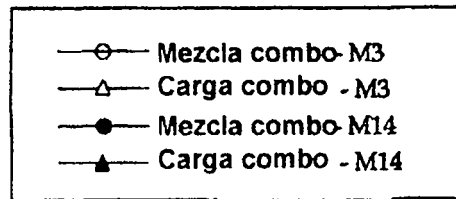
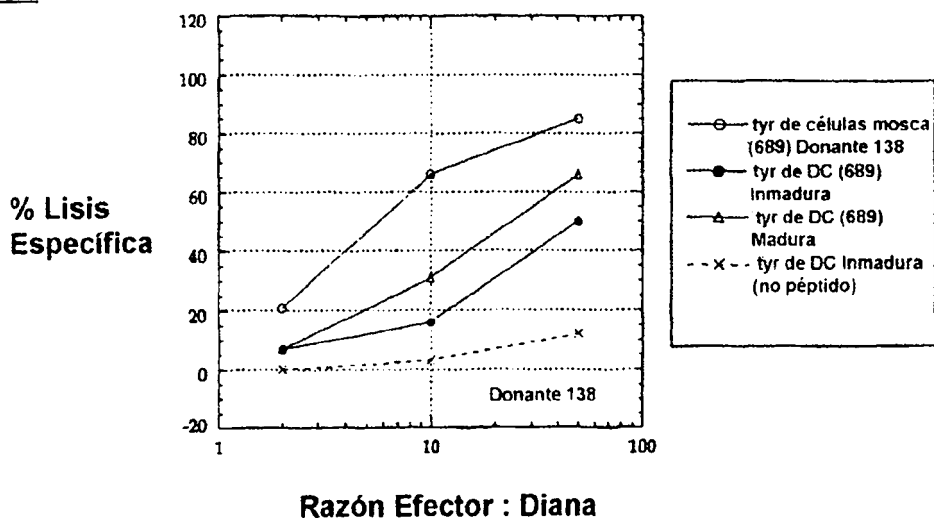


Figura 7

Panel A



Panel B

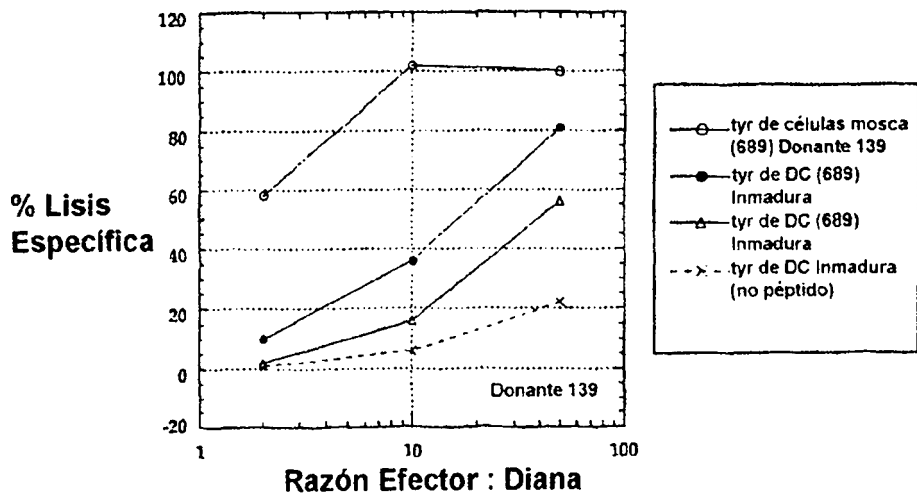
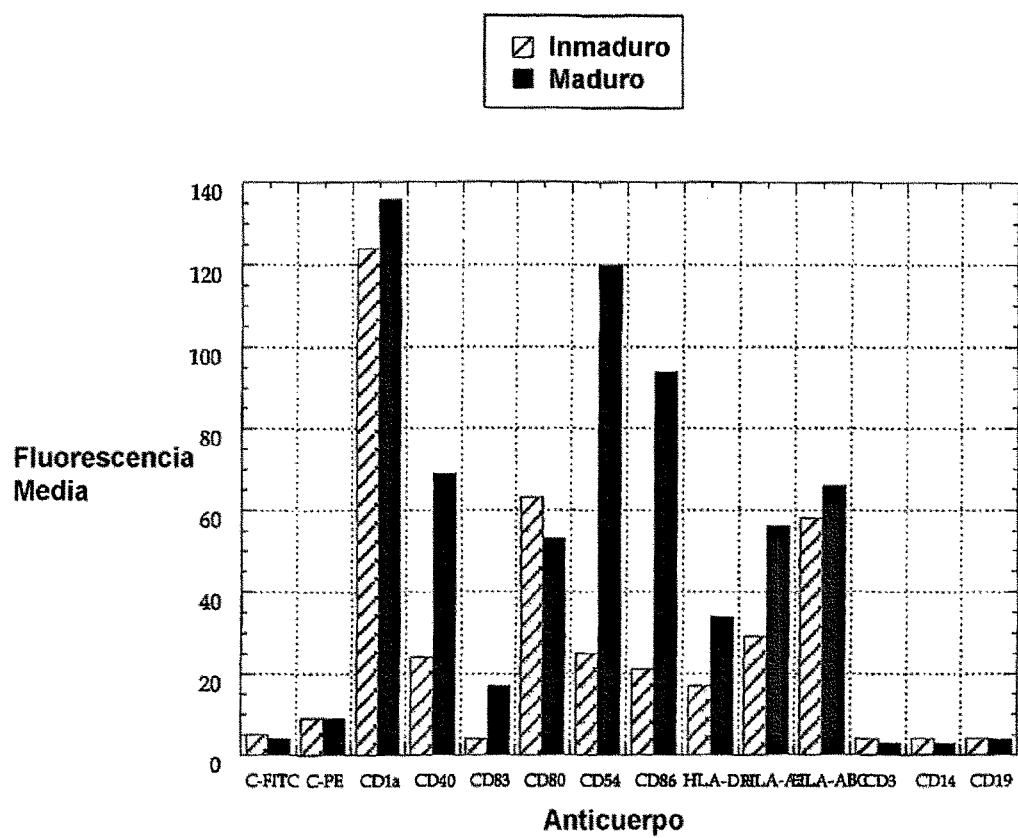
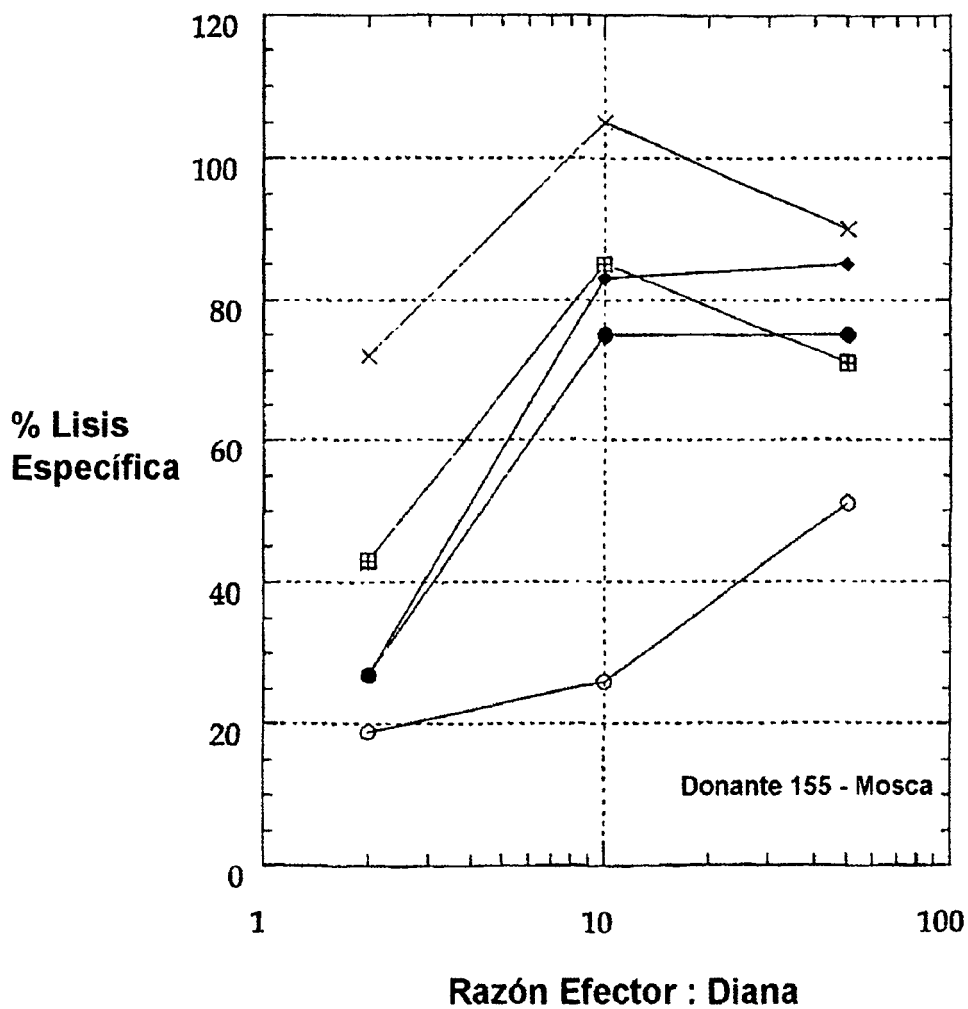
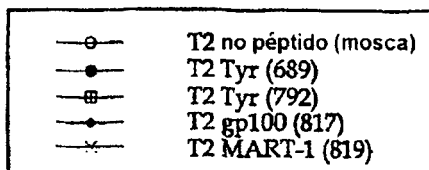


Figura 8

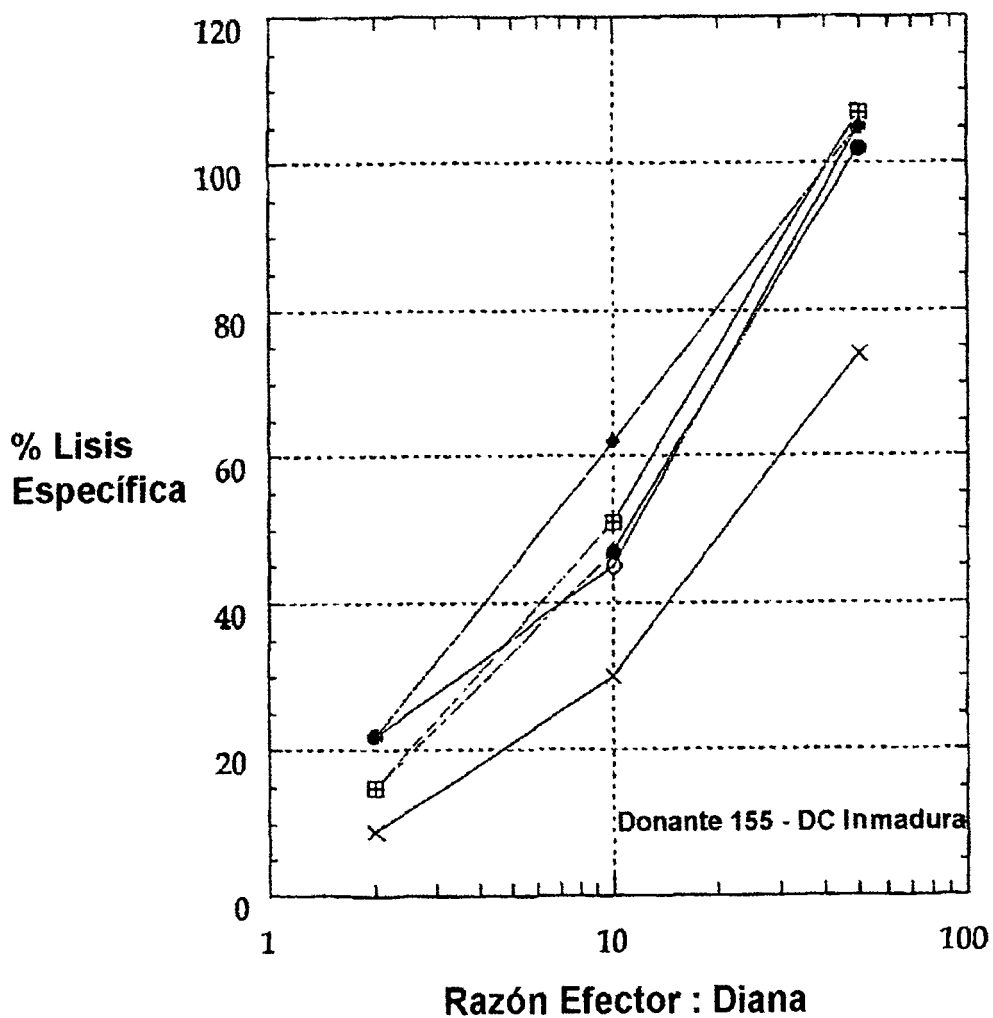
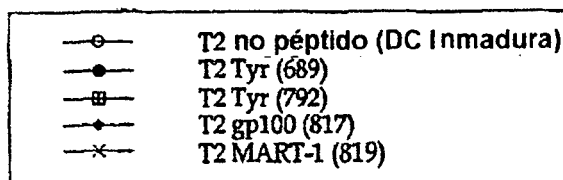


**Figura 9**  
**Panel A**



### Figura 9

#### Panel B



**Figura 9**

Panel C

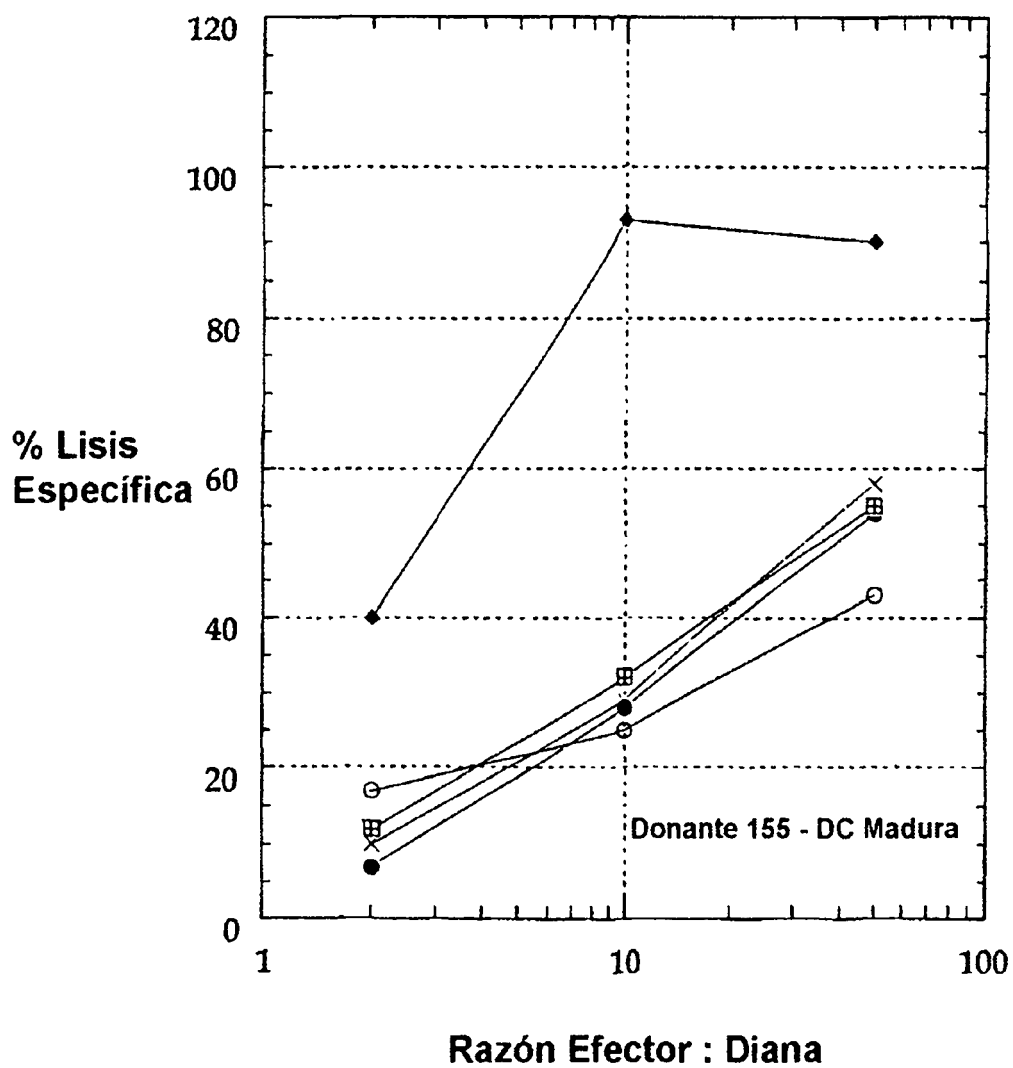
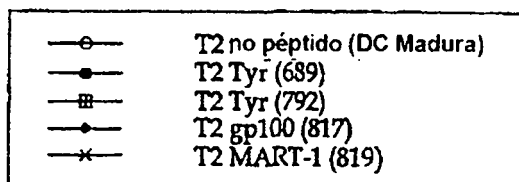
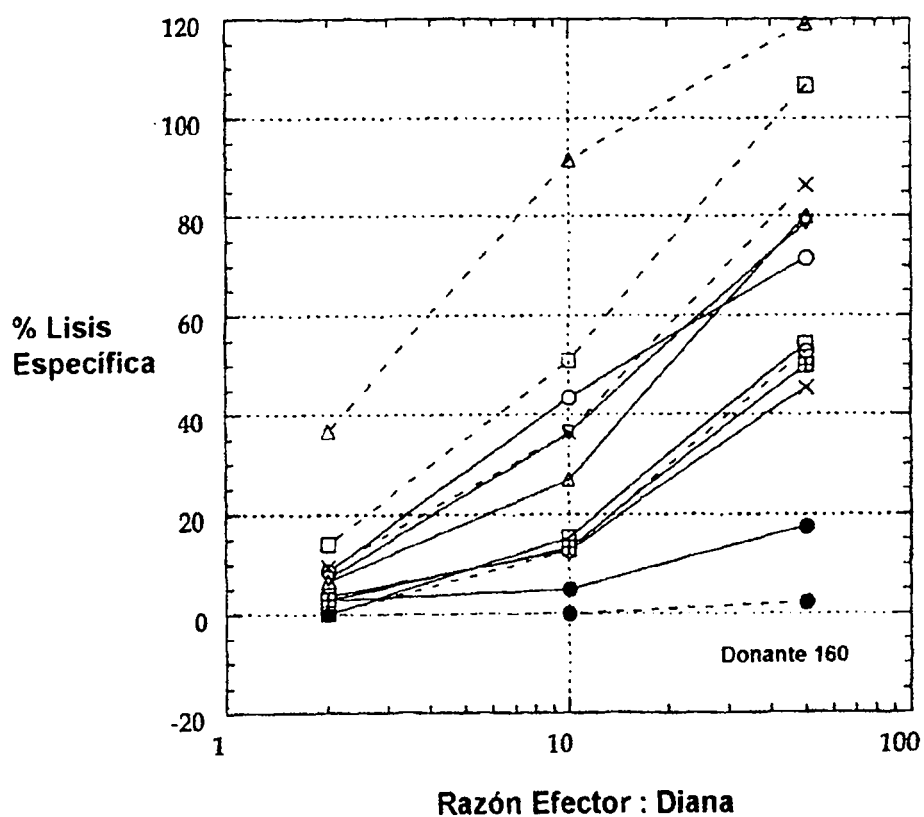


Figura 10



—●—	T2 cargada con HBc (-control)	—▽—	T2 cargada con MART-1 (819)
- - ● - -	T2 sin péptido	—△—	T2 cargada con HER-2/neu (826)
—○—	T2 cargada con tyr (689)	- - △ - -	T2 cargada con HER-2/neu (835)
- - ⊙ - -	T2 cargada con tyr (790)	—×—	T2 cargada con Pec60-20
—□—	T2 cargada con gp100 (817)	- - × - -	T2 cargada con Pec60-25
- - □ - -	T2 cargada con gp100 (853)	—■—	T2 cargada con C-Lectina-8

Figura 11

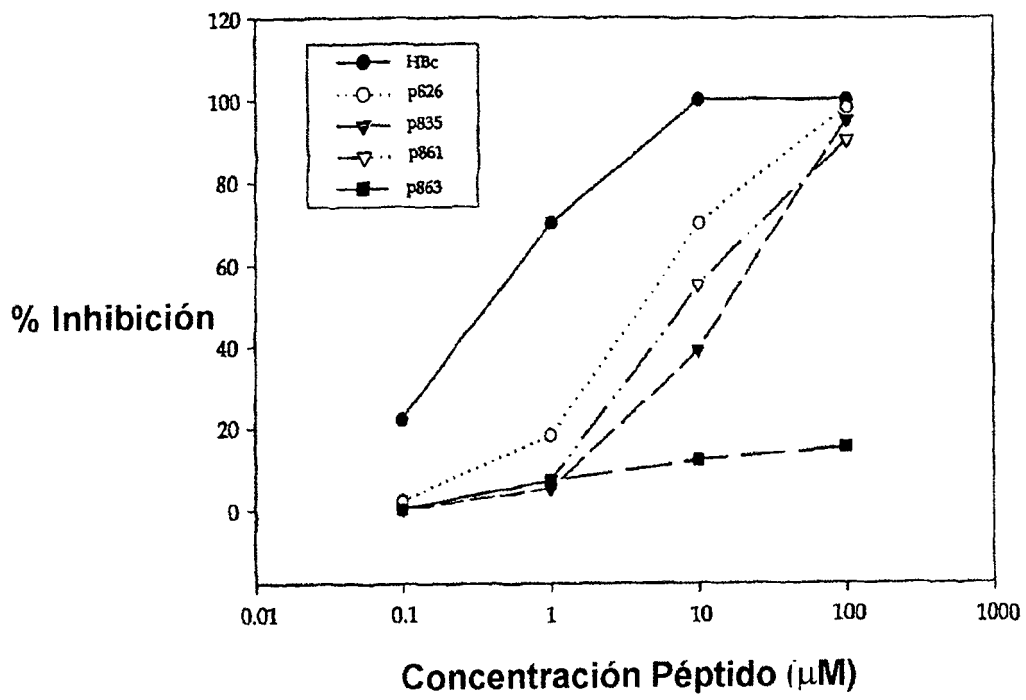
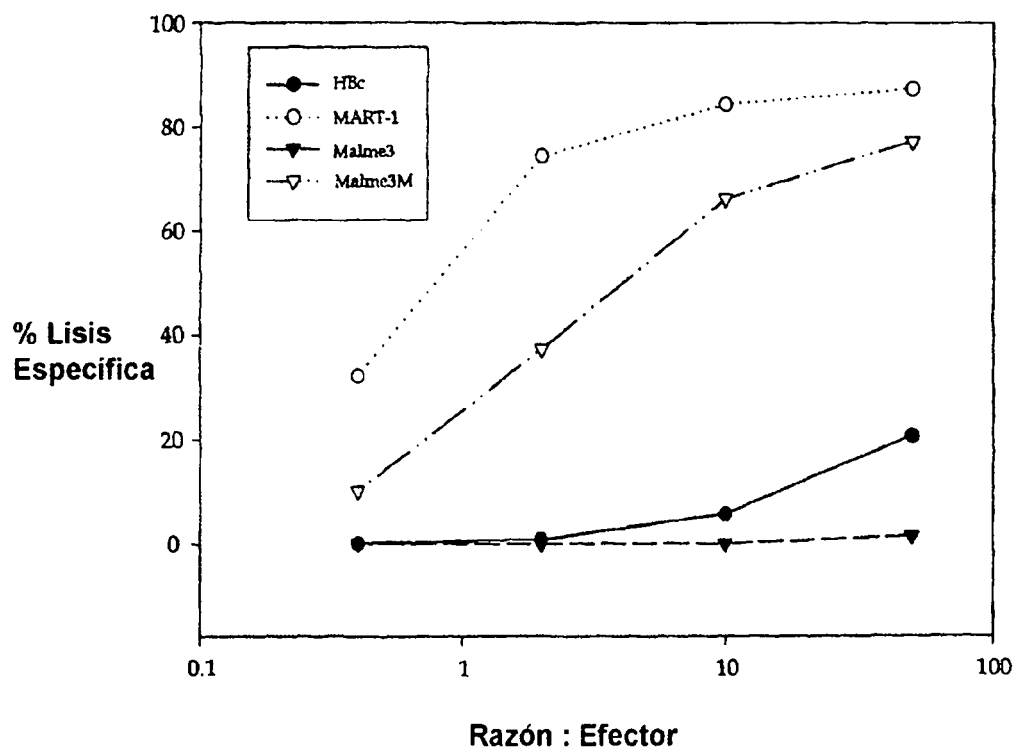
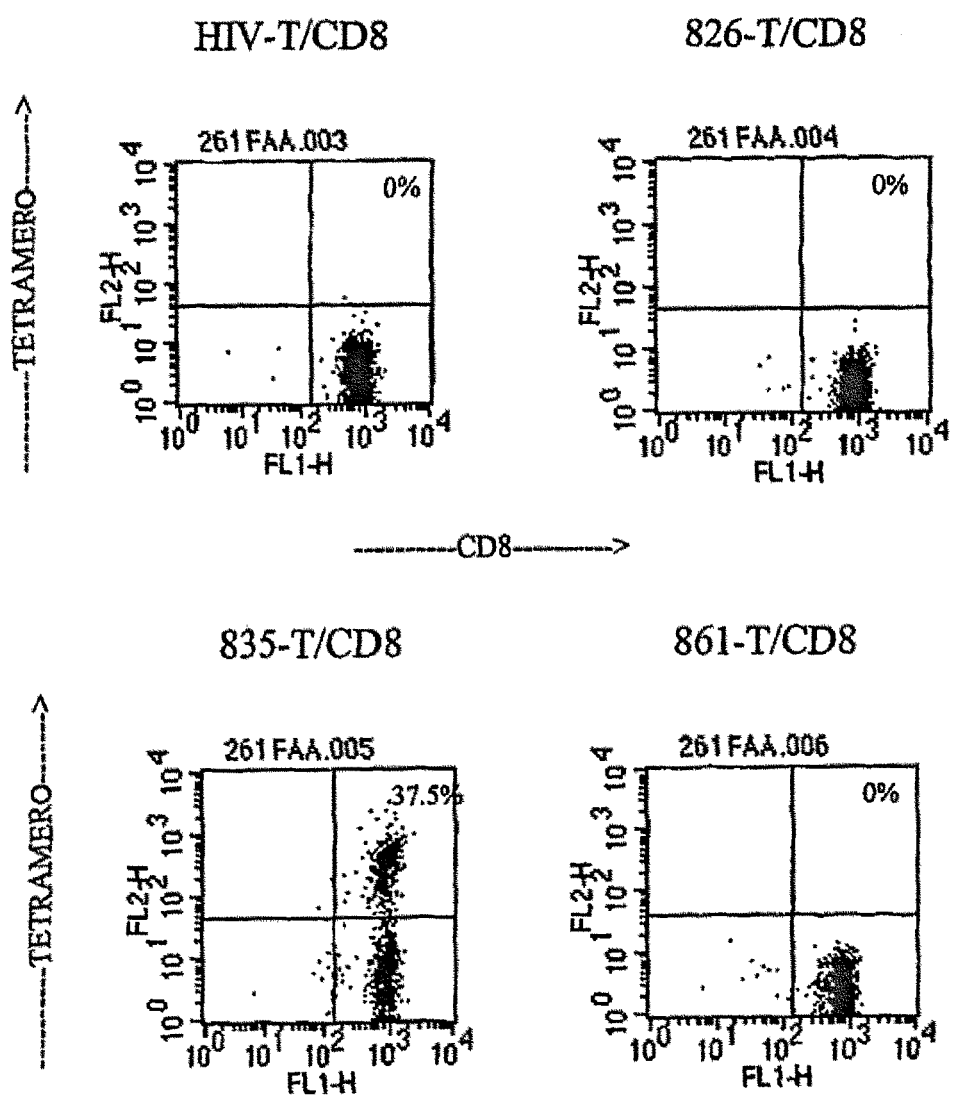


Figura 12



### Figura 13

#### Panel A



# Figura 13

## Panel B

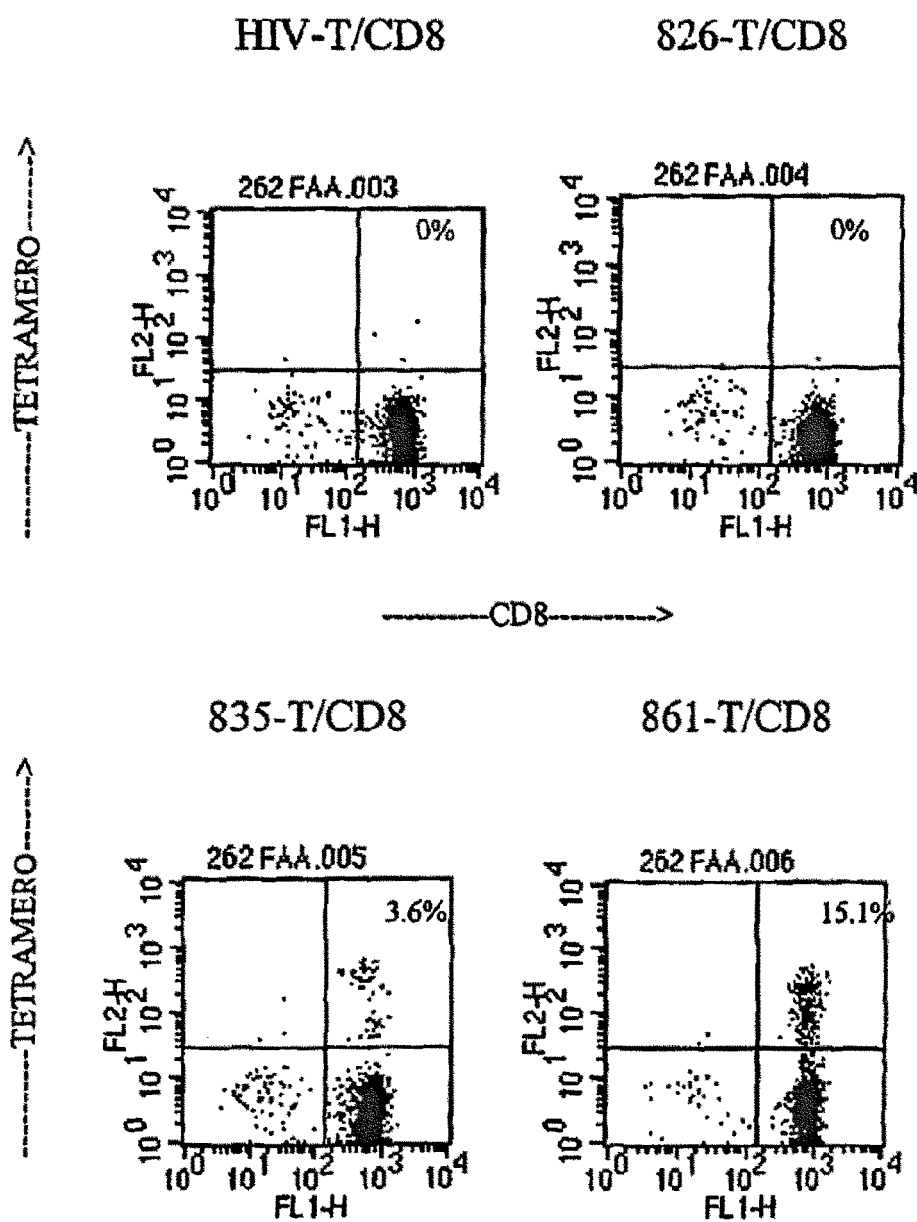
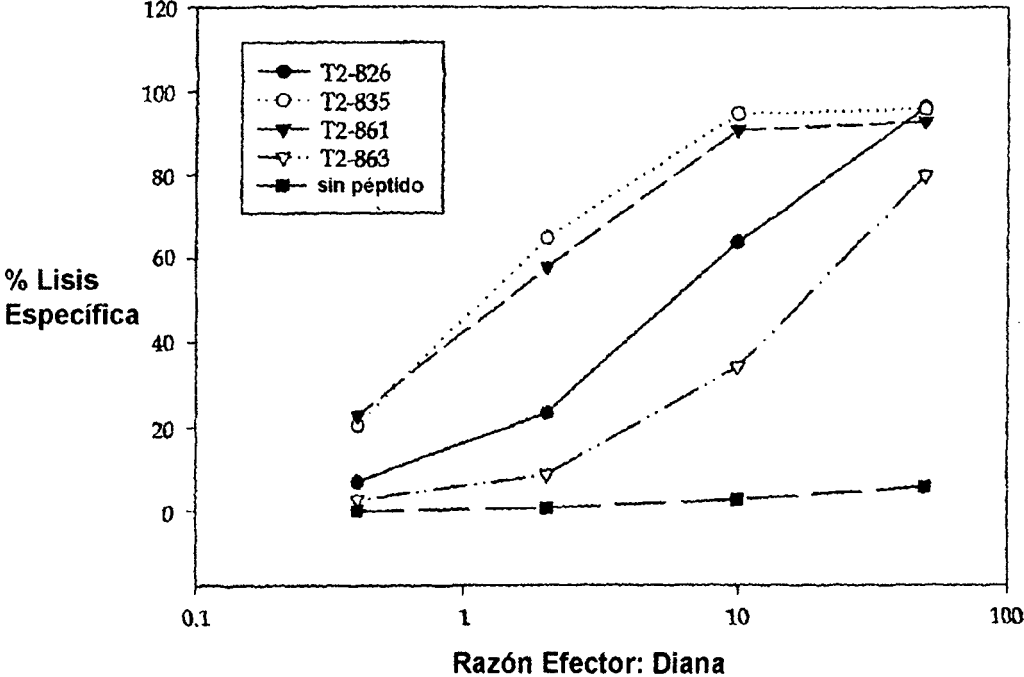
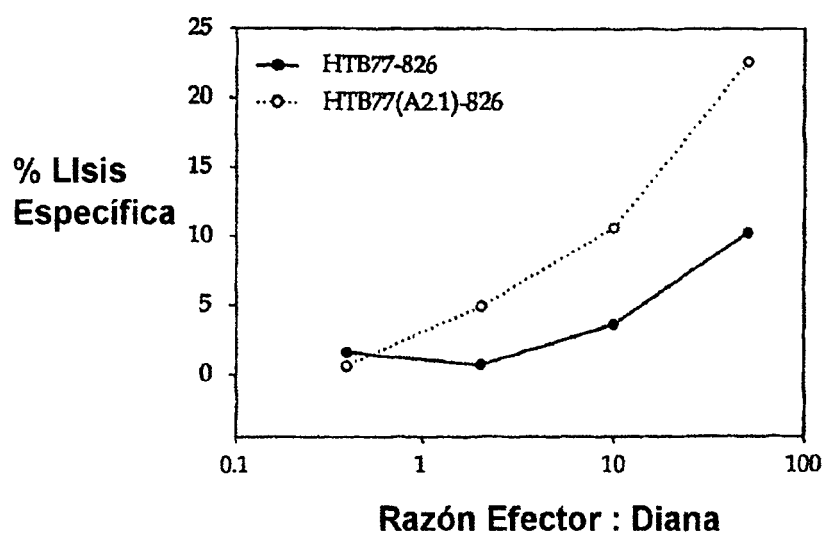


Figura 14



**Figura 15**

Panel A



Panel B

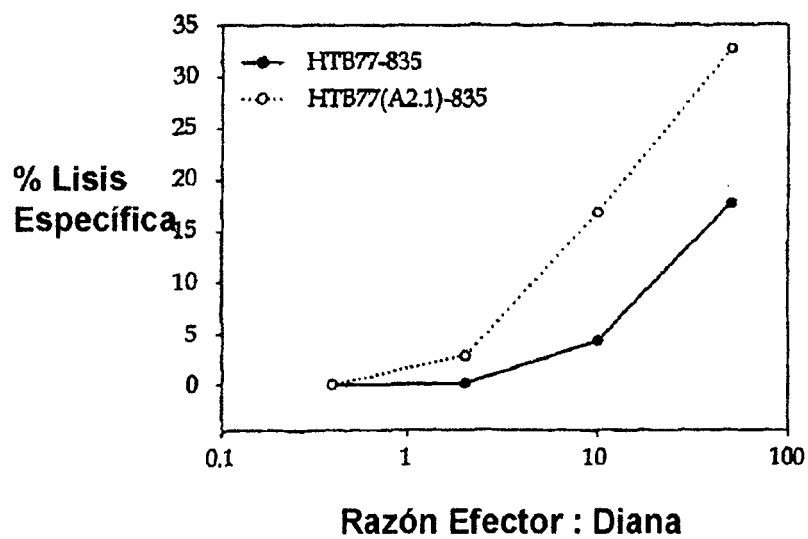
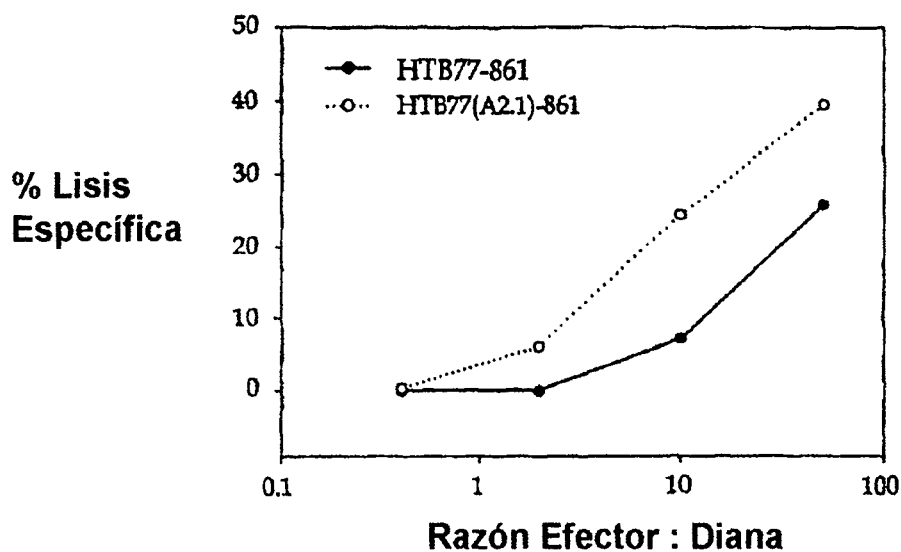


Figura 15

Panel C



Panel D

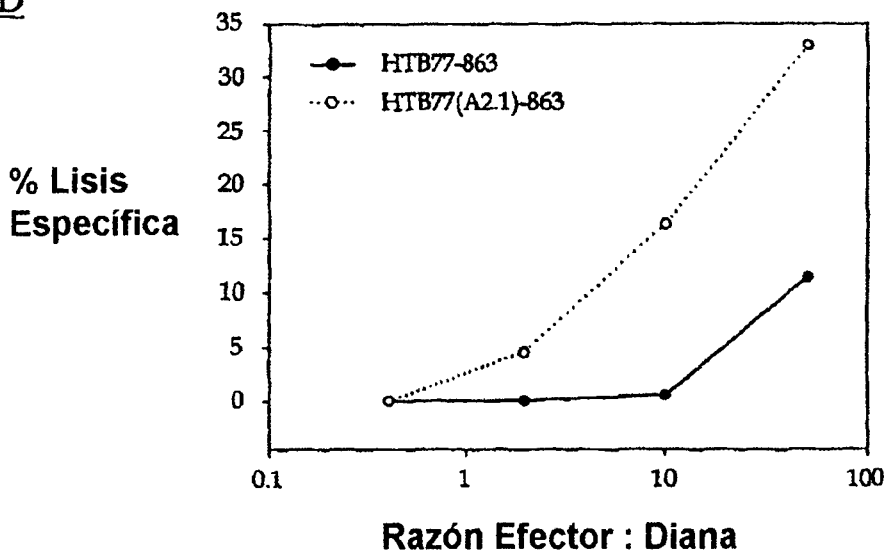


Figura 16

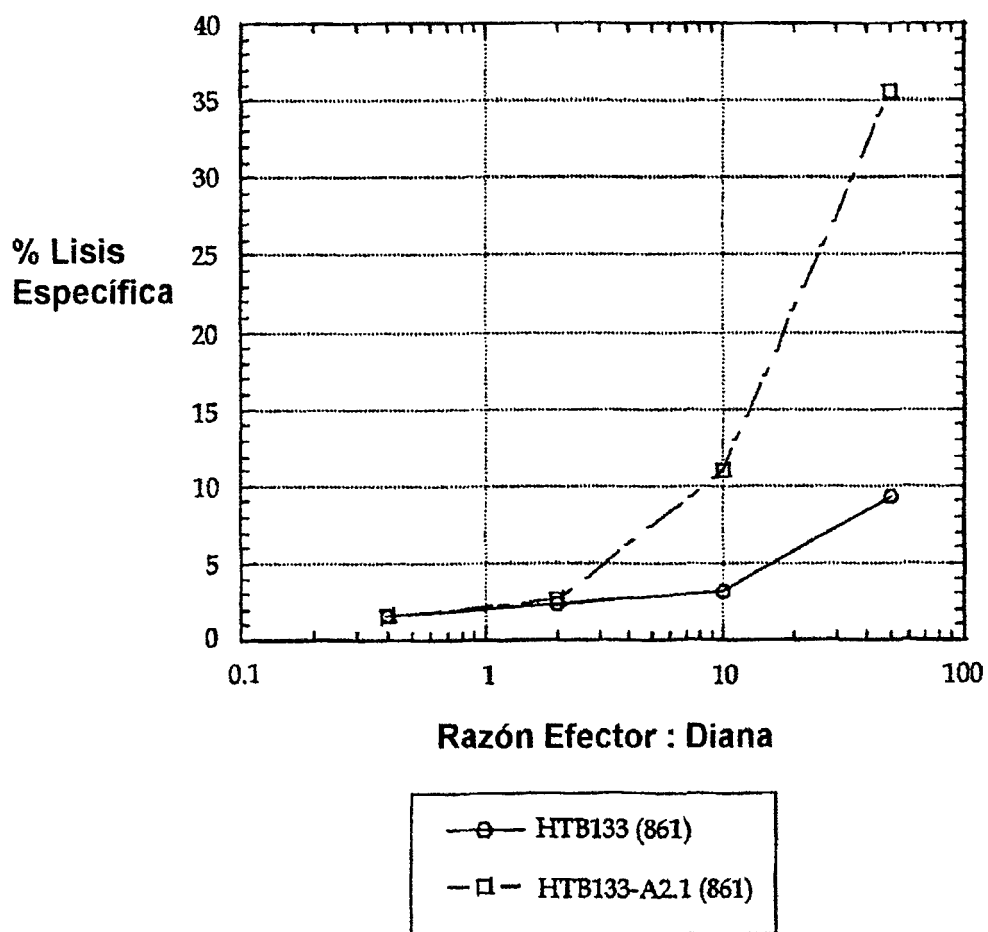
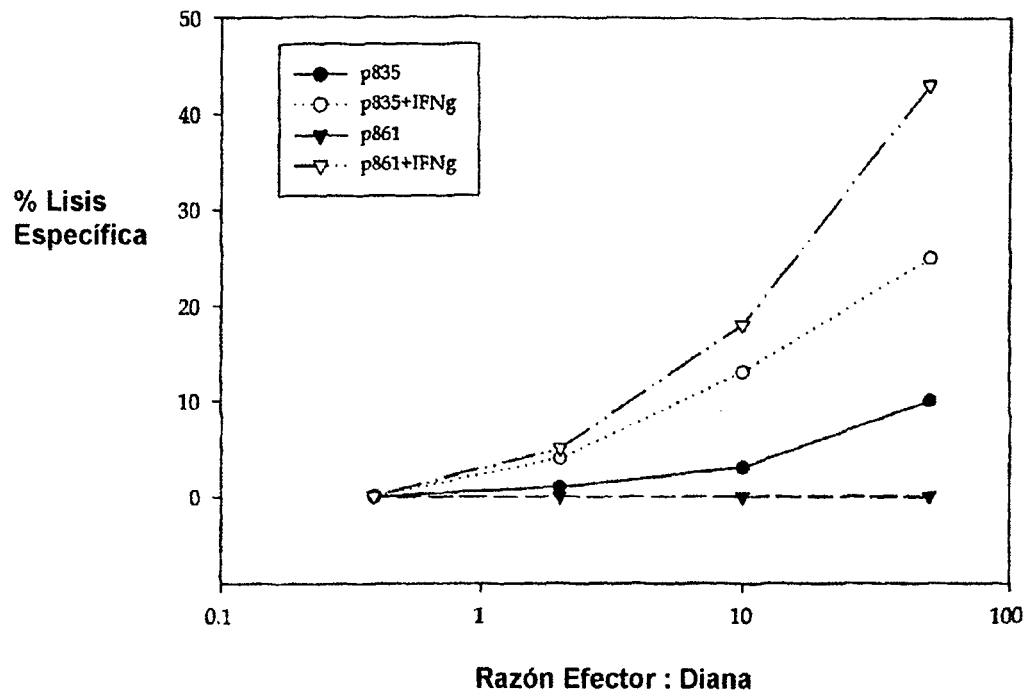
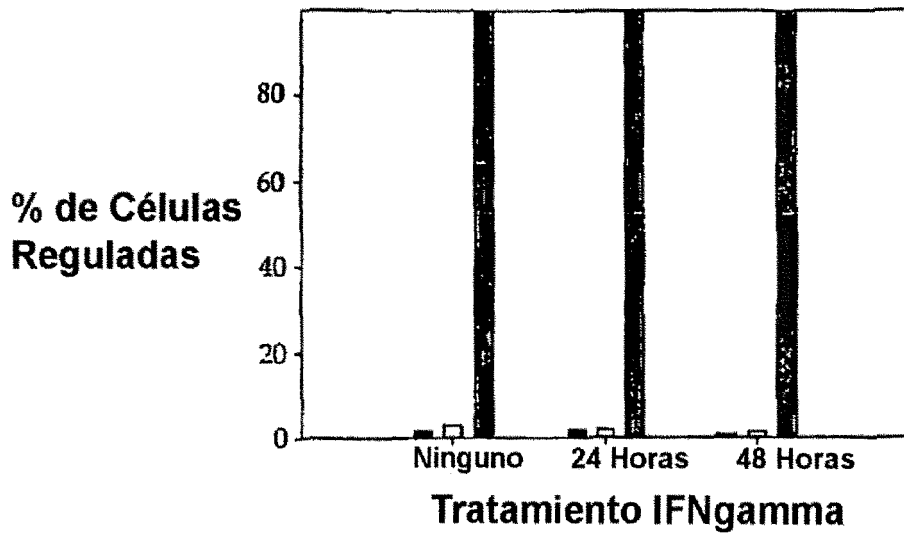


Figura 17



**Figura 18**

Panel A



Panel B

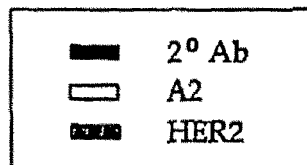
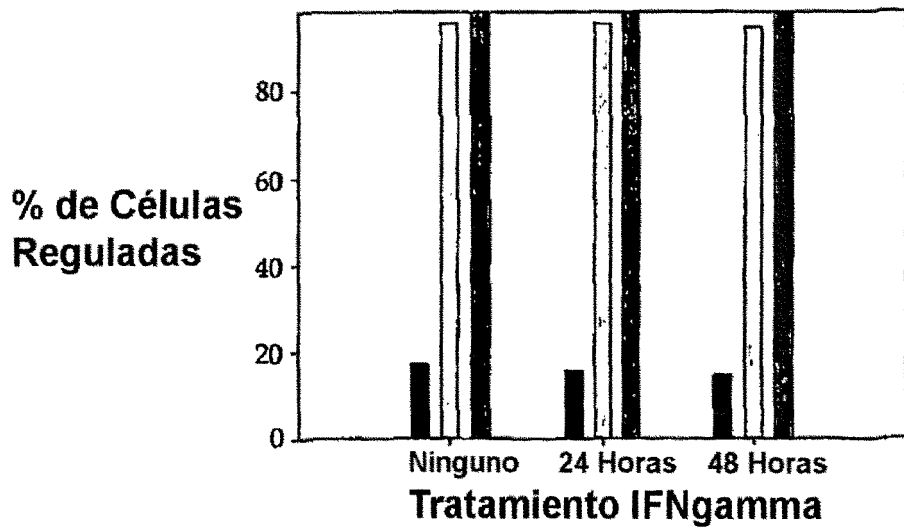
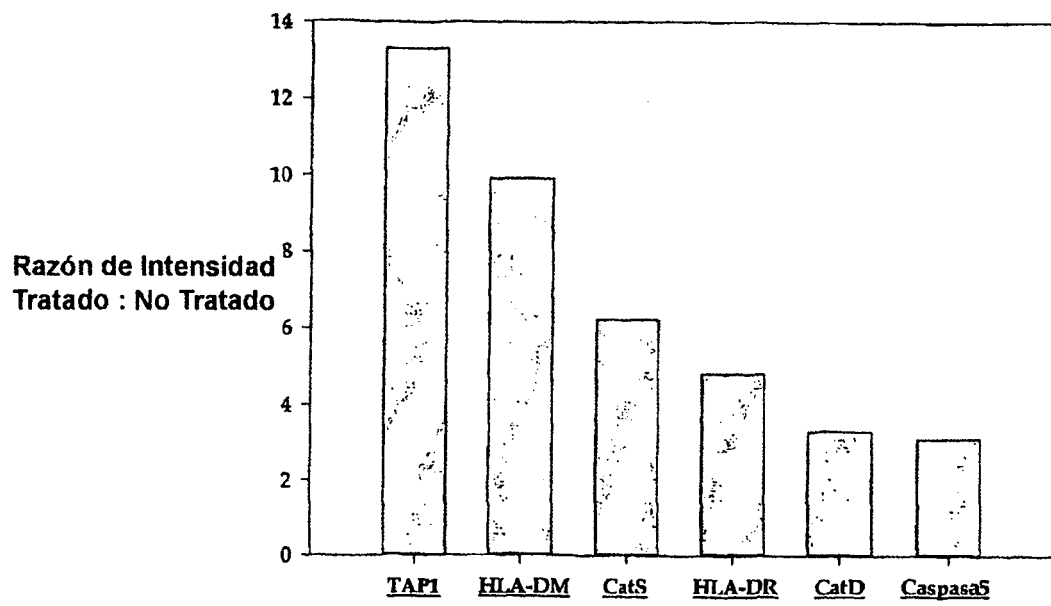


Figura 19



# ES 2 306 771 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Moriarty, Ann  
Leturcq, Didier  
5 Degraw, Juli  
Heiskala, Marja  
Peterson, Per  
Jackson, Michael
- 10 <120> UN MÉTODO DE TERAPIA CELULAR PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES
- <130> ORT-1557
- 15 <160> 42
- <170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1  
Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val  
1 5
- 30 <210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 2  
Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val  
40 1 5
- <210> 3  
45 <211> 10  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*
- 50 <400> 3  
Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe Leu Leu  
1 5 10
- 55 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
60 <213> *Homo sapiens*
- <400> 4  
Ile Asp Thr Gln Val Pro Phe Ser Val  
65 1 5
- <210> 5

ES 2 306 771 T3

<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
5  
<400> 5  
Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val  
1 5  
10  
<210> 6  
<211> 8  
<212> PRT  
15 <213> *Homo sapiens*  
<400> 6  
Ala Ala Gly Ile Gly Leu Thr Val  
1 5  
20  
<210> 7  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 7  
30 cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val  
1 5  
35  
<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
40 <400> 8  
Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu  
1 5  
45  
<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> *Homo sapiens*  
<400> 9  
Lys Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu  
1 5  
55  
<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
60 <213> *Homo sapiens*  
<400> 10  
65 Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Val  
1 5 10

ES 2 306 771 T3

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

10 Ala Leu Leu Val Val Asp Arg Glu Val  
1 5

<210> 12

<211> 12

15 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

20 Ala Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly  
1 5 10

25 <210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 13

35 His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val  
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

45 Ile Ile Ser Ala Val Val Gly Ile Leu  
1 5

<210> 15

50 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 15

Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala Val  
1 5

60 <210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 306 771 T3

<400> 16  
Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val  
1 5 10  
5  
<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
10 <213> *Homo sapiens*  
<400> 17  
15 Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val  
1 5  
<210> 18  
<211> 9  
20 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
25 <400> 18  
Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met  
1 5  
30 <210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
35 <400> 19  
Gly Pro Leu Thr Pro Leu Pro Val  
1 5  
40 <210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
45 <213> *Homo sapiens*  
<400> 20  
50 Ser Thr Ala Pro Val His Asn Val  
1 5  
<210> 21  
<211> 9  
55 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 21  
60 Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu  
1 5  
<210> 22  
65 <211> 9  
<212> PRT

ES 2 306 771 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

5           Glu Ile Trp Thr His Ser Tyr Lys Val  
          1                                   5

<210> 23

10 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 23

          Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr  
          1                                   5                                   10

20 <210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 24

          Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys  
          1                                   5

30

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

35

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

40           Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val  
          1                                   5

<210> 26

<211> 9

45

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

50

          Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr  
          1                                   5

<210> 27

55

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

<400> 27

          Tyr Leu Glu Thr Phe Arg Glu Gln Val  
          1                                   5

65

<210> 28

<211> 9

ES 2 306 771 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 28

Val Leu Leu Lys Leu Arg Arg Pro Val  
1 5

10 <210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 29

Gly Leu Gln Ser Pro Lys Ser Pro Leu  
1 5

20

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

30

Glu Leu Tyr Ile Pro Ser Val Asp Leu  
1 5

<210> 31

<211> 9

35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

40

Lys Ala Leu Phe Ala Gly Pro Pro Val  
1 5

<210> 32

45

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 32

Phe Met Trp Gly Asn Leu Thr Leu Ala  
1 5

55

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

60

<213> *Homo sapiens*

<400> 33

65

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val  
1 5

<210> 34

# ES 2 306 771 T3

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu  
1 5

10

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

15

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val  
1 5

20

<210> 36

<211> 9

25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

30

His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val  
1 5

<210> 37

35

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 37

Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Ile  
1 5

45

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

<400> 38

Val Ala Ala Ser Val Asp Asn Pro His Val  
1 5 10

55

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

60

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

65

Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met  
1 5

