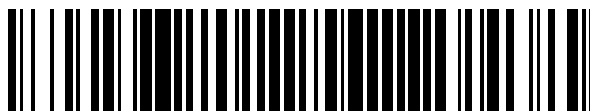


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 207**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008** **E 10014673 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015** **EP 2338907**

54 Título: **Nuevo epítopo inmunogénico para inmunoterapia**

30 Prioridad:

**27.07.2007 EP 07014797**  
**31.07.2007 US 953161 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.12.2015**

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)**  
**Paul-Ehrlich-Strasse 15**  
**72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**SINGH, HARPREET;**  
**SCHOOR, OLIVER;**  
**TRAUTWEIN, CLAUDIA;**  
**HILF, NORBERT;**  
**WEINSCHENK, TONI;**  
**WALTER, STEFFEN y**  
**LEWANDROWSKI, PETER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 553 207 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

Nuevo epítipo inmunogénico para inmunoterapia

La presente invención se refiere a nuevas secuencias de aminoácidos de un péptido derivado de un antígeno asociado a tumor que es capaz de unirse a un complejo MHC de clase I y desencadenar una respuesta inmunitaria.

## 5 Antecedentes de la invención

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL) entre poblaciones de células infiltradas en los tumores o a partir de la sangre periférica apunta a que dichos leucocitos desempeñan un papel importante en la defensa inmunitaria natural contra el cáncer (Cheever et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94; High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy.). En concreto, en dicha respuesta desempeñan un papel importante los linfocitos T CD8-positivos (TCD8+), los cuales reconocen péptidos incorporados en las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que normalmente están compuestos por 8 a 10 residuos de aminoácidos procedentes de proteínas o productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol (Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; *Nature* 2000; 404(6779):770-774). Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: Las moléculas MHC de clase I, presentes en la mayoría de las células nucleadas y que presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRIP y péptidos más grandes. Las moléculas MHC de clase II, presentes predominantemente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan péptidos de proteínas exógenas que son captados por las APC mediante endocitosis, y posteriormente procesados (Cresswell P. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:259-93). Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en abundancia en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4+ cumplen un importante papel en la organización de las funciones efectoras de la respuesta antitumoral de los linfocitos T y, por esta razón, la identificación de los epítipos derivados de los antígenos asociados a tumor (AAT) que reconocen los linfocitos T CD4+ puede tener gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, and E. Celis. 2002. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin. Cancer Res.* 8:3219-3225., Gnjjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth, and L. J. Old. 2003. Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(15):8862-7). Los linfocitos T CD4+ pueden aumentar localmente los niveles de IFN-gamma (Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T; A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells; *Cancer Res.* 2003 J; 63(14):4095-4100).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes oncológicos se ha descubierto con sorpresa que algunas células tumorales expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4163-4170).

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores sin el concurso de las células efectoras CTL (los linfocitos T CD8-positivos) a través de la inhibición de la angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ) (Qin, Z. and T. Blankenstein. 2000. CD4+ T-cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 12:677-686). Además, se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos que reconocen péptidos derivados de antígenos asociados a tumores presentados por las moléculas HLA de clase II pueden contrarrestar la progresión del tumor mediante la inducción de respuestas de anticuerpos (Ac) (Kennedy, R. C., M. H. Shearer, A. M. Watts, and R. K. Bright, 2003. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes play a

critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. Cancer Res. 63: 1040:1045). A diferencia de lo que sucede con los péptidos asociados a tumor reconocidos por las moléculas HLA de clase I, hasta la fecha el número descrito de ligandos de clase II derivados de antígenos asociados a tumor (TAA) es pequeño ([www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org), [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).

- 5 Puesto que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II solo se da normalmente en las células del sistema inmunitario (Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. Annu. Rev. Immunol. 14:301-331), se creía imposible aislar péptidos de clase II directamente de los tumores primarios. Con todo, Dengjel et al. han logrado descubrir recientemente cierto número de epítomos de MHC de clase II directamente en tumores (EP 04 023 546. 7, EP 05 019 254. 1; Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Miller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic" S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; Clin Cancer Res. 2006; 12:4163-4170).

- 15 Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular el péptido ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados («anclaje») en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo, cada alelo del MHC tiene un «motivo de unión» que determina qué péptidos pueden unirse específicamente a la hendidura de unión (Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs, Chapman & Hall 1998).

- 20 En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores de linfocito T específicos (TCR).

- Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. que son expresados en las células del tumor correspondiente. Además, los antígenos pueden ser específicamente tumorales, es decir estar presentes únicamente en células tumorales, como por ejemplo productos de genes mutados o de marcos de lectura abiertos (ORF) alternativos, o del empalme de proteínas (Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, van der Bruggen P, Boon T, Van den Eynde BJ. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. Science 2004 Apr 23; 304 (5670):587-90). Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son los antígenos específicos de tejido, como los antígenos «cáncer-testículo» (CT) que se expresan en diferentes tipos de tumores y en el tejido sano de los testículos.

- Se han descubierto varios antígenos asociados a tumores. Además, se han invertido muchos esfuerzos en identificar nuevos antígenos asociados a tumores. Ciertos grupos de antígenos asociados a tumores, también denominados en la técnica como antígenos específicos de tumores, son específicos de tejido. Los ejemplos incluyen, sin ánimo de limitación, la tirosinasa en el caso del melanoma, el PSA y el PSMA en el del cáncer de próstata y translocaciones cromosómicas como bcr/abl en el linfoma. Sin embargo, muchos antígenos asociados a tumores identificados aparecen en múltiples tipos de tumores, y algunos, como las proteínas oncogénicas y/o los genes supresores de tumores (estos últimos genes son revisados por ejemplo para el cáncer renal en Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. J Urol. 2003 Dec; 170 (6 Pt 1):2163-72), que realmente causan el evento de transformación, están presentes en casi todos los tipos de tumores. Por ejemplo, proteínas celulares normales que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, como la p53 (un ejemplo de gen supresor de tumores), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones que ocasionan una regulación al alza de la expresión de estos productos génicos, lo que los convierte en oncogénicos (McCartey et al. Cancer Research, 1998, 15:58 2601-5; Disis et al. Ciba Found. Symp. 1994, 187:198-211). Estas proteínas mutantes también pueden ser la diana de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor en múltiples tipos de cáncer.

- Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una célula tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a tumores también pueden ser dianas en una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja H., Emmerich N. P., Rammensee H. G., Cancer Immunol. Immunother. 2004 Mar; 453 (3): 187-95). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

- 60 Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito

T. Un prerrequisito para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítipo en particular.

Por consiguiente, los TAA son el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados, entre otros, en el uso de CTL que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales (Lemmel C, Weik S., Eberle U., Dengjel J., Kratt T., Becker H. D., Rammensee H. G., Stevanovic S. Nat. Biotechnol. 2004 Apr.; 22(4):450-4, T. Weinschenk, C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek, W. Loeser, K. H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62 (20):5818-5827, 2002).

No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítopos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítipo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, es importante seleccionar sólo aquellos péptidos derivados de proteínas sobreexpresadas o selectivamente expresadas que sean presentados ligados a moléculas de MHC y que sean diana de linfocitos T funcionales. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítopos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo T<sub>H</sub> apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítopos de linfocitos T cooperadores asociados a tumores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden actuar como principios activos farmacéuticos de composiciones vacunales que estimulen las respuestas inmunitarias antitumorales.

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los CTL CD8+ (ligando: moléculas MHC de clase I + epítipo peptídico) o por los CTL CD4-positivos (ligando: moléculas MHC de clase II + epítipo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales. Por tanto, la presente invención tiene como uno de sus objetos proporcionar nuevas secuencias de aminoácidos de péptidos que son capaces de unirse a complejos MHC de cualquier clase.

WO 2005/116051 da a conocer péptidos asociados a tumor que se unen a MHC de clase I. WO 2005/116051 no da a conocer a NOX1 como fuente de péptidos asociados a tumor.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra los espectros resultantes de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ESI que identifican a los siguientes péptidos asociados a tumor (TUMAP): PCN-002 de la muestra de carcinoma de colon CCA707 (Fig. 1a), TOP-002 de la muestra de glioblastoma GB1006 (Fig. 1b), GAL-001 de la muestra de carcinoma de células renales RCC190 (Fig. 1d), CHI-001 de la muestra de glioblastoma GB1002 (Fig. 1e), JAK-001 de la muestra de glioblastoma GB1002 (Fig. 1f), AKR-001 del conjunto de muestras de cáncer de pulmón amicrocítico NSCLC-Pool 2 (Fig. 1g), y FNI-001 de la muestra de carcinoma de páncreas PC330 (Fig. 1h), todos los cuales fueron presentados de un modo restringido en MHC de clase I.

La Fig. 2 muestra los espectros resultantes de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ESI que identifican a los siguientes péptidos asociados a tumor (TUMAP): CEA-009 del conjunto de muestras de carcinoma gástrico GC-Pool 2 (Fig. 2a), TGFBI-006 del conjunto de muestras de carcinoma gástrico GC-Pool 1 (Fig. 2b), TGFBI-007 de la muestra de glioblastoma GB6002 (Fig. 2c), TGFBI-008 de la muestra de glioblastoma GB1004 (Fig. 2d), TGFBI-009 del conjunto de muestras de cáncer de pulmón amicrocítico NSCLC-Pool 1 (Fig. 2e), y TGFBI-010 de la muestra de glioblastoma GB6002 (Fig. 2f), todos los cuales fueron presentados de un modo restringido a MHC de clase II.

La Fig. 3 expone los perfiles de expresión de dos genes que codifican los péptidos asociados a glioblastoma PTP-001 (Fig. 3a) y CHI-001 (Fig. 3b). La expresión de los genes es nula o muy baja en los tejidos normales pero se multiplica más de 250 veces en muestras de glioblastoma (GB1006T a GB1011T; NCH359T y NCH361T)

La Fig. 4 expone las afinidades de unión al HLA-A\*0201 de péptidos seleccionados medidas con Epi ELISA según Sylvester-Hvid, C, Kristensen, N, Blicher, T, Ferre, H, Lauemoller, SL, Wolf, XA, Lamberth, K, Nissen, MH, Pedersen, LO, and Buus, S; 2002, Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction, Tissue Antigens, 59,251-258. El análisis se limitó a los péptidos que son péptidos de unión a MHC de clase I. Este ensayo no puede medir las afinidades de los péptidos que se unen al HLA-DR.

La Figura 5 expone el análisis de tetrámeros de la proliferación estimulada con microesferas de linfocitos CD8+ específicos de ODC-001 y de NOX-001 obtenidos de sangre periférica.

Se depositaron por pocillo  $1 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas con CD8+ procedentes del donante sano HD100 que era HLA-A\*0201+ y se estimularon semanalmente con microesferas acopladas con anti-CD28 más antígeno tumoral A\*0201/ODC-001 en alta densidad (panel superior) o anti-CD28 más antígeno tumoral A\*0201/NOX-001 en alta densidad (panel inferior). Después de tres estimulaciones *in vitro*, todas las células se tiñeron con anticuerpo CD8 FITC y con tetrámeros A\*0201/NOX-001 PE y A\*0201/NLGN4X-001 APC. Las células se seleccionan entre la población de linfocitos o de linfocitos CD8+ (panel derecho) y las cifras representan el porcentaje de tetrámeros+ en los linfocitos CD8+.

La Figura 6 muestra la inmunogenicidad *in vitro* del TGFBI-004 detectada mediante ELISPOT de IFN- $\gamma$  después de cinco ciclos de estimulación.

Las células fueron estimuladas y reestimuladas repetidamente con el péptido TGFBI-004 y después incubadas con dicho péptido (Pocillos 1, 2, 3 y 4) y con otro péptido irrelevante (control negativo). El análisis de ELISPOT de IFN- $\gamma$  se llevó a cabo con un Lector ELISPOT (CTL, Cleveland, EE. UU.). Como control positivo se empleó PHA-Ionomicina. Las cifras indican el recuento de puntos positivos.

La Figura 7 muestra la inmunogenicidad *in vitro* del TGFBI-004 detectada mediante tinción intracelular de citocinas (ICS) tras cinco ciclos de estimulación.

Las células se estimularon con células dendríticas autólogas cargadas con TGFBI-004 y fueron reestimuladas repetidamente con PBMC autólogos más TGFBI-004. Para la lectura las células fueron incubadas con el péptido TGFBI-004 (Pocillos 1, 2, 3 y 4) y con otro péptido irrelevante (control negativo). Además de la tinción intracelular del IFN- $\gamma$ , las células también se tiñeron con anticuerpos frente a CD4-FITC y CD8-PerCP. El análisis se realizó con un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD Biosciences, Alemania).

La Figura 8 muestra el análisis ELISPOT de la producción de IFN- $\gamma$  por parte de estirpes de linfocitos T tras su reestimulación *in vitro* con el péptido NOX-001. A. Estirpe de linfocitos T 7+ procedente del donante HBC-154 (selección de CD8+ NOX-001 tetrámero+); B. Estirpe de linfocitos T 7- procedente del donante HBC-154 (selección de CD8+ NOX-001 tetrámero-).

Las células seleccionadas CD8+ NOX-001 tetrámero+ (A.) y CD8+ NOX-001 tetrámero- (B.) fueron analizadas con ELISPOT de IFN- $\gamma$  después de la reestimulación con un péptido irrelevante (MLA-001) (pocillos superiores) y con el péptido relevante (NOX-001) (pocillos inferiores) (10  $\mu$ g/ml). Las cifras indican el recuento de puntos positivos.

La Figura 9 expone las afinidades de los péptidos contenidos en la presente invención hacia el HLA-A\*0201. Las constantes de disociación ( $K_D$ ) de los péptidos HLA de clase I P116 y del péptido marcador viral HBV-001 se midieron con una prueba ELISA (véase el apartado Ejemplos).

### Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto la presente invención proporciona un péptido consistente en la secuencia ILAPVILYI conforme a la SEQ ID N. ° 2 que induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido.

En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. Las secuencias que se comparan en la presente memoria pueden tener una adición o delección (por ejemplo, un hueco o similar) en la alineación óptima de las dos secuencias. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo (Nucleic Acid Res., 22(22): 4673-4680 (1994). También se puede usar software para el análisis de secuencias habitualmente disponible, en concreto Vector NTI, GENETYX o herramientas de análisis facilitadas por bases de datos públicas, como las que se pueden hallar, por ejemplo, en <http://dragon.bio.purdue.edu/bioinformlinks/>.

Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante de un péptido específico serán capaces de reaccionar también con el propio péptido original (Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, and Engleman, EG; 2001, Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 98, 8809-8814); (Zaremba, S, Barzaga, E, Zhu, M, Soares, N, Tsang, KY, and Schlom, J; Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen, Cancer Res., 1997, 57, 4570-4577; Colombetti, S, Fagerberg, T, Baumgartner, P, Chapatte, L, Speiser, DE, Rufer, N, Michielin, O, and Levy, F.; Impact of orthologous melan-A peptide immunizations on the anti-self melan-A/HLA-A2 T cell cross-reactivity, J Immunol., 2006, 176, 6560-6567; Appay, V, Speiser, DE, Rufer, N, Reynard, S, Barbey, C, Cerottini, JC, Leyvraz, S, Pinilla, C, and Romero, P; Decreased specific CD8+ T cell cross-reactivity of antigen recognition following vaccination with Melan-A peptide, Eur. J Immunol., 2006, 36, 1805-1814).

La Tabla 1 expone los péptidos, sus respectivas SEQ ID N.º y la información sobre las proteínas originarias.

**Tabla 1: Péptidos**

SEQ ID N.º	Código del péptido	Secuencia	Alelos HLA	Gene(s)
1	C20-001	ALSNLEVTL	A*02	C20orf42
2	NOX-001	ILAPVILYI	A*02	NOX1
3	PCN-001	KLMDLDVEQL	A*02	PCNA
4	PCN-002	SMSADVPLV	A*02	PCNA
5	TOP-001	KIFDEILVNA	A*02	TOP2A, TOP2B
6	TOP-002	AAFVEELDKV	A*02	TOP2B
7	CEA-009	VLLLVHNLQPQLFG	Clase II	CEACAM5
8	TGFBI-001	ALFVRLLALA	A*02,A*02/B*13?	TGFBI
9	TGFBI-006	GDKLEVSLKNNVVS	Clase II	TGFBI
10	TGFBI-007	GKKLRVVFYRNSLCIENS	Clase II	TGFBI
11	TGFBI-008	LKNNWSVNKEPVAEPD	Clase II	TGFBI
		KNNWSVNKEPVAEPD	Clase II	TGFBI
		KNNWSVNKEPVA	Clase II	TGFBI
		LKNNWSVNKEPVA	Clase II	TGFBI
12	TGFBI-009	NGVIHYIDELLIPDS	Clase II	TGFBI
		GVIHYIDELLIPDSA	Clase II	TGFBI
13	TGFBI-010	LNRI LGDPEALRDL	Clase II	TGFBI
14	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH	Clase II	TGFBI
15	PTP-001	ALTTLMHQL	A*02	PTPRZ1
16	GAL-001	SLDPSSPQV	A*02	GAL3ST1
17	CHI-001	SLWAGWVL	A*02	CHI3L2
18	JAK-001	KLTDIQIEL	A*02	JAKMIP2
19	AKR-001	YLIHFPVSV	A*02	AKR1C1, AKR1C2
20	FN1-001	IVDDITYNV	A*02	FN1
21	EGFR-002	GAVRFSNNPALCNVES	Clase II	EGFR
		AVRFSNNPALCNVES	Clase II	EGFR
		AVRFSNNPALCNVE	Clase II	EGFR
22	EGFR-005	NPTTYQMDVNPEGKYS	Clase II	EGFR
23	EGFR-006	FKKIKVLGSGAFG	Clase II	EGFR
24	CHI3L1-001	TTLIKEMKAEFIKEAQPG	Clase II	CHI3L1
		TLIKEMKAEFIKEAQPG	Clase II	CHI3L1
		TTLIKEMKAEFIKEA	Clase II	CHI3L1

(continuación)

SEQ ID N.º	Código del péptido	Secuencia	Alelos HLA	Gene(s)
		TLIKEMKAEFIKEA	Clase II	CHI3L1
		IKEMKAEFIKEAQPG	Clase II	CHI3L1
		TTLIKEMKAEFIKE	Clase II	CHI3L1
25	CHI3L1-007	VKSKVQYLKDRQLAG	Clase II	CHI3L1
26	CHI3L1-008	SRRTFIKSVPPFLRT	Clase II	CHI3L1
27	DCA-001	KLGDGFLATW	A*02	DCAMKL2
28	KCN-001	SLFDQWKV	A*02	KCNJ10
29	GPM-001	ALLSEVIQL	A*02	GPM6B

#### Marco de lectura abierto 42 del cromosoma 20

La C20orf42 es una proteína de adhesión focal que interviene en la fijación del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática y en procesos celulares mediados por las integrinas. La deficiencia de C20orf42 como resultado de mutaciones que comportan la pérdida de función causa el síndrome de Kindler, una genodermatosis autosómica recesiva caracterizada por la aparición de ampollas cutáneas, atrofia progresiva de la piel, fotosensibilidad y, ocasionalmente, oncogénesis (Herz, C, Aumailley, M, Schulte, C, Schlotzer-Schrehardt, U, Bruckner-Tuderman, L, and Has, C; Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes, J Biol Chem., 2006, 281, 36082-36090). En fecha reciente se ha descrito una afectación grave del tracto gastrointestinal con colitis hemorrágica en un paciente portador de una mutación que ocasiona la pérdida de función (Sadler, E, Klausegger, A, Muss, W, Deinsberger, U, Pohla-Gubo, G, Laimer, M, Lanschuetzer, C, Bauer, JW, and Hintner, H; Novel KIND! gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement, Arch. Dermatol., 2006, 142, 1619-1624).

En el contexto del cáncer, el C20orf42 ha sido descrito en estudios que investigaban la expresión génica en entornos relevantes para el cáncer. Se ha hallado sobreexpresado en el 70% de los carcinomas de colon y en el 60% de los carcinomas de pulmón analizados (n = 10). La expresión en los tejidos normales, estudiada con electrotransferencia Northern, se limitó a tejidos neuromusculares (Weinstein, EJ, Boumer, M, Head, R, Zakeri, H, Bauer, C, and Mazzarella, R; URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas, Biochim. Biophys. Acta, 2003, 1637, 207-216). Asimismo, el C20orf42 ha sido identificado como un gen implicado en la migración celular y la invasión tumoral mediadas por el TGF-beta (Kloeker, S, Major, MB, Calderwood, DA, Ginsberg, MH, Jones, DA, and Beckerle, MC; The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion, J. Biol. Chem., 2004, 279, 6824-6833).

#### Homólogo 1 de NADPH-oxidasa (NOX1)

La NOX1 es una enzima que responde a factores de crecimiento y que cataliza la formación de las especies reactivas de oxígeno superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Su expresión se detectó inicialmente en el colon, la próstata y el útero, así como en los miocitos lisos vasculares en proliferación (Suh, Y. A. et al. 1999; Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature 401, 79-82). Su expresión está vinculada a cierto número de respuestas biológicas como la proliferación celular, la angiogénesis y la activación de vías de señalización celular (Harper, R. W., Xu, C, Soucek, K., Setiadi, H. & Eiserich, J. P. A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants. Arch. Biochem. Biophys. 2005, 435, 323-330).

La NOX1 presenta una elevada expresión en el colon, pero su función en la fisiología y la patología del colon se conoce muy poco. En los tejidos normales, la expresión de NOX1 parece ser baja en el íleon, intermedia en el colon derecho y elevada en el colon izquierdo. No hubo diferencias estadísticas en la expresión de NOX1 entre muestras procedentes de adenomas y adenocarcinomas de colon diferenciados o poco diferenciados. NOX1 se expresa mucho en las células epiteliales del colon, tanto en las del interior de las criptas como en las de la superficie luminal. En conclusión, NOX1 es una enzima que se expresa constitutivamente en el epitelio del colon y no está directamente relacionada con la oncogénesis (Szanto, I. et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. J Pathol. 2005, 207, 164-176).

El análisis inmunohistoquímico ha demostrado que la NOX1 se expresa de forma constitutiva en las células mucosas superficiales. Los adenomas y los adenocarcinomas bien diferenciados presentan la expresión de NOX1 regulada al alza.

El factor nuclear (NF)-kappaB se activó predominantemente en células de adenoma y adenocarcinoma que expresaban NOX1 en abundancia, lo cual indica que la NOX1 podría estimular las vías antiapoptóticas que dependen del NF-kappaB en los tumores de colon (Fukuyama, M. et al. Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. Cancer Lett. 2005, 221, 97-104).

Se ha descrito que la señalización de Wnt3a/beta-catenina induce la expresión de NOX1 (Petropoulos, H. & Skerjanc, I. S. Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. J Biol Chem. 2002, 277, 15393-15399).

Recientemente se ha planteado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen la apoptosis endotelial, fenómeno que a su vez induce la expresión de varias moléculas de adhesión para las células tumorales. Esto significaría que alterando la producción de ROS tal vez se podría impedir la recidiva del tumor en sitios distantes (Ten, KM, van der Wal, JB, Sluiter, W, Hofland, LJ, Jeekel, J, Sonneveld, P, and van Eijck, CH; The role of superoxide anions in the development of distant tumor recurrence, Br J Cancer, 2006, 95,1497-1503).

#### **Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)**

El PCNA se halla en el núcleo y es un cofactor de la ADN-polimerasa delta. La proteína codificada actúa como un homotrímero y ayuda a mejorar la procesividad de la síntesis de la hebra conductora durante la replicación del ADN. Así pues, se expresa en todas las células en proliferación, especialmente en las células tumorales, y se usa como marcador para detectar la proliferación.

#### **ADN-topoisomerasa II**

Los genes TOP2A y TOP2B codifican isoformas de una ADN-topoisomerasa, enzima que controla y altera los estados topológicos del ADN durante la transcripción. Esta enzima nuclear interviene en procesos como la condensación cromosómica, la separación de las cromátidas y el alivio de la tensión torsional que aparece durante la replicación y la transcripción del ADN. Las ADN-topoisomerasas catalizan la rotura transitoria y la religación de las dos hebras de la doble hélice de ADN, lo que les permite girar libremente una respecto a la otra, alterando de ese modo la topología del ADN. Las dos isoformas de la enzima son probablemente el producto de un fenómeno de duplicación génica. El gen que codifica la forma alfa está localizado en el cromosoma 17 y el gen beta en el cromosoma 3.

El gen TOP2A es la diana de varios fármacos antitumorales y diversas mutaciones del mismo han sido vinculadas con el desarrollo de resistencia farmacológica.

TOP2A es adyacente a HER-2, el oncogén amplificado con más frecuencia en el cáncer de mama, en el sitio cromosómico 17q12-q21 y aparece amplificado o eliminado, con igual frecuencia, en casi el 90% de los tumores primarios de mama HER-2 positivos (Jarvinen, TA and Liu, ET; Topoisomerase II alpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer-more common than anticipated, Cytopathology, 2003, 14, 309-313). También se han descrito amplificaciones de TOP2A en otros tipos de cáncer.

Sin TOP2A la replicación del ADN y la división celular son imposibles. Ello lo ha convertido en la diana principal de muchos regímenes de tratamiento antitumoral, aunque el mecanismo exacto con el que destruye las células aún escapa a nuestro conocimiento (Kellner, U, Sehested, M, Jensen, PB, Gieseler, F, and Rudolph, P; Culpit and victim - DNA topoisomerase II, Lancet Oncol., 2002, 3, 235-243). El éxito de esta estrategia se ve mermado por la aparición de resistencia espontánea, y los daños del ADN causados por los fármacos pueden potenciar la malignidad. Datos recientes apuntan a que la amplificación y la delección de TOP2A podrían estar detrás tanto de la sensibilidad como de la resistencia vinculadas a la quimioterapia con inhibidores de TOP2A, dependiendo del defecto genético específico en el *locus* de TOP2A.

No está claro si la implicación de TOP2B en el cáncer es similar a la de TOP2A o si existe una diferencia importante entre ambas isoformas. TOP2B puede al menos complementar parte de la actividad de TOP2A (Sakaguchi, A and Kikuchi, A; Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase, J Cell Sci., 2004, 117, 1047-1054).

#### **Molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario**

El antígeno carcinoembrionario (CEA = CEACAM5) es una proteína de membrana de 180 kDa fuertemente glucosilada compuesta por tres unidades repetidas similares a la región C2 de Ig flanqueadas por una región N-terminal similar a la región V de Ig, y una región C-terminal que alberga una región de enlace con glucofosfatidilinositol (Hegde, P, Qi, R, Gaspard, R, Abernathy, K, Dharap, S, Earle-Hughes, J, Gay, C, Nwokekeh, NU, Chen, T, Saeed, AI, Sharov, V, Lee, NH, Yeatman, TJ, and Quackenbush, J; Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, Cancer Res., 2001, 61, 7792-7797).



Como antígeno oncofetal, la CEA se expresa durante el desarrollo del feto, pero también en el epitelio gastrointestinal del adulto, aunque en niveles bajos. La CEA aparece sobreexpresada en un alto porcentaje de tumores humanos, entre ellos el 90% de los tumores de cáncer gastrointestinal, colorrectal y pancreático, en el 70% de las células del cáncer de pulmón amicrocítico y el 50% de los tumores de mama (Thompson, JA, Grunert, F, and Zimmermann, W; Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives, J Clin Lab Anal., 2005, 5, 344-366). Debido a su alta expresión en las células tumorales y su secreción en el suero, la CEA ha sido ampliamente usada como marcador tumoral (Sikorska, H, Shuster, J, and Gold, P; Clinical applications of carcinoembryonic antigen, Cancer Detect. Prev., 1988, 12, 321-355) y es el marcador sérico estándar para el seguimiento del cáncer colorrectal (Locker, GY, Hamilton, S, Harris, J, Jessup, JM, Kemeny, N, Macdonald, JS, Somerfield, MR, Hayes, DF, and Bast, RC, Jr.; ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer, J Clin Oncol, 2006, 24, 5313-5327).

A pesar de su sobreexpresión en las células tumorales, los pacientes oncológicos no suelen mostrar una respuesta inmunitaria contra este antígeno (Orefice, S, Fossati, G, Pietrojusti, E, and Bonfanti, G; Delayed cutaneous hypersensitivity reaction to carcinoembryonic antigen in cancer patients, Tumori, 1982, 68, 473-475). El sistema inmunitario suele desarrollar tolerancia a la CEA porque en el organismo se expresa de ordinario en niveles bajos. Con todo, una serie de ensayos clínicos con vacunas ha demostrado la inmunogenicidad de la CEA (Sarobe, P, Huarte, E, Lasarte, JJ, and Borrás-Cuesta, F; Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses, Curr. Cancer Drug Targets., 2004, 4, 443-454), especialmente en el carcinoma colorrectal (CCR) (Mosolits, S, Ullenhag, G, and Mellstedt, H; Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results, Ann. Oncol., 2005, 16, 847-862), siendo el antígeno asociado a tumor (TAA) con el mayor número de plataformas vacunales probadas en este tipo de tumor (von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, Semin. Oncol., 2005, 32, 76-84).

En el caso de CEA se han descrito varios epítomos para los linfocitos T cooperadores y citotóxicos (Crosti, M, Longhi, R, Consogno, G, Melloni, G, Zannini, P, and Protti, MP; Identification of novel subdominant epitopes on the carcinoembryonic antigen recognized by CD4+ T-cells of lung cancer patients, J Immunol., 2006, 176, 5093-5099; Novellino, L, Castelli, C, and Parmiani, G; A listing of human tumor antigens recognized by T-cells: March 2004 update, Cancer Immunol. Immunother., 2004, 54, 187-207; Ruiz, M, Kobayashi, H, Lasarte, JJ, Prieto, J, Borrás-Cuesta, F, Celis, E, and Sarobe, P; Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen, Clin Cancer Res., 2004, 10, 2860-2867), lo que ha dado pie a una serie de ensayos con vacunas peptídicas en el marco del CCR (Babatz, J, Rollic, C, Lobel, B, Folprecht, G, Haack, M, Gwither, H, Kohne, CH, Ehninger, G, Schmitz, M, and Bornhauser, M; Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells, Cancer Immunol. Immunother., 2006, 55, 268-276; Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, and Engleman, EG; Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 2001, 98, 8809-8814; Liu, KJ, Wang, CC, Chen, LT, Cheng, AL, Lin, DT, Wu, YC, Yu, WL, Hung, YM, Yang, HY, Juang, SH, and Whang-Peng, J; Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A\*0201 and HLA-A\*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides, Clin Cancer Res., 2004, 10, 2645-2651; Matsuda, K, Tsunoda, T, Tanaka, H, Umano, Y, Tanimura, H, Nukaya, I, Takesako, K, and Yamaue, H; Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells, Cancer Immunol. Immunother., 2004, 53, 609-616; Ueda, Y, Itoh, T, Nukaya, I, Kawashima, I, Okugawa, K, Yano, Y, Yamamoto, Y, Naitoh, K, Shimizu, K, Imura, K, Fuji, N, Fujiwara, H, Ochiai, T, Itoi, H, Sonoyama, T, Hagiwara, A, Takesako, K, and Yamagishi, H; Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas, Int. J Oncol., 2004, 24, 909-917; Weihrauch, MR, Ansen, S, Jurkiewicz, E, Geisen, C, Xia, Z, Anderson, KS, Gracien, E, Schmidt, M, Wittig, B, Diehl, V, Wolf, J, Bohlen, H, and Nadler, LM; Phase I/II combined chemioimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer, Clin Cancer Res., 2005, 11, 5993-6001). Estos y otros ensayos clínicos ejecutados hasta la fecha han demostrado la seguridad de las vacunaciones con CEA y han aportado pruebas de la inducción de una respuesta inmunitaria contra este antígeno (von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, Semin. Oncol., 2005, 32, 76-84).

#### **Gen inducido por el factor de crecimiento transformante, beta (TGFB1)**

El TGFB1 fue identificado por primera vez como un gen inducible por el TGF-beta en una estirpe celular de adenocarcinoma de pulmón humano. Codifica una proteína segregada en la matriz extracelular, que supuestamente participa en la fijación celular y en la composición de dicha matriz.

También se ha demostrado que el TGFB1 es uno de los genes cuya expresión es más elevada en el cáncer colorrectal, además de expresarse también mucho en el adenoma. Los resultados obtenidos con la PCR cuantitativa demuestran la fuerte elevación tanto en tumores sin purificar como en células epiteliales tumorales purificadas. En consonancia, los experimentos de hibridación *in situ* revelan que el TGFB1 se expresa en muchos tipos de células, tanto en el compartimento estromal como epitelial (Buckhaults, P, Rago, C, St, CB, Romans, KE, Sana, S, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, K. W; Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors, Cancer Res., 2001, 61, 6996-7001).

En un metanálisis de estudios que investigaron la expresión génica en el carcinoma colorrectal, el TGFBI fue identificado como uno de los nueve únicos genes que aparecían regulados al alza reiteradamente (4 estudios de TGFBI) (Shih, W, Chetty, R, and Tsao, MS; Expression profiling by microarrays in colorectal cancer, *Oncol. Rep.*, 2005, 13, 517-524).

- 5 En tejidos de páncreas humano se apreció un incremento de 32,4 veces en los niveles del ARNm del TGFBI en tumores pancreáticos en comparación con los tejidos de control normales. Los análisis de hibridación *in situ* revelaron que el ARNm del TGFBI se expresaba principalmente en células cancerosas del interior de la masa tumoral pancreática (Schneider, D, Kleeff, J, Berberat, PO, Zhu, Z, Korc, M, Friess, H, and Buchler, MW; Induction and expression of betaig-h3 in pancreatic cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1588, 1-6).
- 10 El TGFBI ha sido identificado como un gen promotor de la angiogénesis en un modelo *in vitro*. Además, en varios tumores se ha detectado un aumento drástico de su expresión. Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el TGFBI bloquearon tanto la expresión génica como la formación del tubo endotelial *in vitro*, lo cual parece indicar que el TGFBI puede desempeñar un papel esencial en las interacciones entre la matriz y la célula endotelial (Aitkenhead, M, Wang, SJ, Nakatsu, MN, Mestas, J, Heard, C, and Hughes, CC; Identification of endothelial cell genes expressed in an *in vitro* model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM, *Microvasc. Res.*, 2002, 63, 159-171).

#### **Proteína tirosina fosfatasa, de tipo receptor, Zeta 1 (PTPRZX)**

- 20 El PTPRZ1 es miembro de la familia de las proteínas tirosina fosfatasa de tipo receptor que codifica una proteína de membrana de un solo paso de tipo 1 dotada de dos dominios citoplasmáticos de tirosina fosfatasa, un dominio alfa-anhidrasa carbónica y un dominio de fibronectina de tipo III. La expresión de este gen es inducida en células de cáncer gástrico (Wu, CW, Li, AF, Chi, CW, and Lin, WC; Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues, *Cancer Lett.*, 2006, 242, 95-103), en los oligodendrocitos remielinizantes de las lesiones de la esclerosis múltiple (Harroch, S, Furtado, GC, Brueck, W, Rosenbluth, J, Lafaille, J, Chao, M, Buxbaum, JD, and Schlessinger, J; A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions, *Nat. Genet.*, 2002, 32,411-414), y en células de riñón embrionarias humanas en condiciones hipóxicas (Wang, V, Davis, DA, Haque, M, Huang, LE, and Yarchoan, R; Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in HEK293T-cells, *Cancer Res.*, 2005, 65, 3299-3306).

- 30 Tanto la proteína como el transcrito se sobreexpresan en las células de glioblastoma, promoviendo su migración haptotáctica (Lu, KV, Jong, KA, Kim, GY, Singh, J, Dia, EQ, Yoshimoto, K, Wang, MY, Cloughesy, TF, Nelson, SF, and Mischel, PS; Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin, *J Biol Chem.*, 2005, 280,26953-26964).

- 35 Además, el PTRPZ1 aparece amplificado con frecuencia a nivel del ADN genómico en el glioblastoma (Mulholland, PJ, Fiegler, H, Mazzanti, C, Gorman, P, Sasieni, P, Adams, J, Jones, TA, Babbage, JW, Vatcheva, R, Ichimura, K, East, P, Poulikas, C, Collins, VP, Carter, NP, Tomlinson, IP, and Sheer, D; Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme, *Cell Cycle*, 2006, 5, 783-791).

#### **Cinasa Janus y proteína interaccionante con los microtúbulos 2 (JAKMIP2)**

- 40 La JAKMIP2 ha sido identificada como una de las muchas dianas ulteriores confirmadas y presuntas de PAX3-FKHR que aparecen muy sobreexpresadas en el rhabdomyosarcoma pediátrico de subtipo alveolar o ARMS (Lae, M, Ahn, E, Mercado, G, Chuai, S, Edgar, M, Pawel, B, Olshen, A, Barr, F, and Ladanyi, M; Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas, *J Pathol.*, 2007, 212,143-151).

#### **Fibronectina 1 (FN1)**

- 45 La fibronectina es una glucoproteína de alto peso molecular que contiene alrededor de un 5% de glúcidos y que se une a proteínas receptoras que atraviesan la membrana celular, las integrinas. Además de a las integrinas, también se une a componentes de la matriz extracelular como el colágeno, la fibrina y la heparina. Existen varias isoformas de la fibronectina, todas producto del mismo gen. Las fibronectinas desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la morfología celular normal, la adhesión y la migración celular, la hemostasia, la trombosis, la cicatrización de heridas, la diferenciación y la proliferación (Hynes, RO; Fibronectins, *Sci. Am.*, 1987, 254, 42-51).

- 50 La fibronectina polimérica, sFN, se forma *in vitro* tratando la fibronectina soluble con un péptido de 76 aa, el III1-C (llamado anastelina), que deriva de la primera repetición de tipo III de la fibronectina. Los estudios *in vivo* con ratones portadores de tumores han demostrado que la aplicación sistémica de anastelina o de sFN suprimía el crecimiento, la angiogénesis y la metástasis tumorales (Yi, M and Ruoslahti, E; A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98, 620-624). Anginex es un péptido sintético de 33 aminoácidos que se modeló originalmente para reproducir la estructura en lámina beta de proteínas antiangiogénicas. Se ha demostrado que anginex inicia la polimerización de la fibronectina y es inactivo en ratones que carecen de fibronectina plasmática (Akerman, ME, Pilch, J, Peters, D, and Ruoslahti, E; Angiostatic peptides use plasma fibronectin to home to angiogenic vasculature, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102, 2040-2045). Un

estudio examinó los efectos de la fibronectina sobre la insuficiencia hepática fulminante provocada con D-galactosamina (GalN)/lipopolisacárido (LPS) en ratones. Los resultados sugieren que la fibronectina protegió contra la insuficiencia hepática provocada por GalN/LPS a través de un mecanismo que implica la inhibición de la activación del NF-kappaB, lo que causó la regulación a la baja del TNF-alfa y la regulación al alza de la IL-10, así como la elevación del Bcl-xL que indujo el bloqueo de las señales apoptóticas, procesos que culminaron en la supresión de la apoptosis de los hepatocitos causada por GalN/LPS (Qiu, Z, Kwon, AH, Tsuji, K, Kamiyama, Y, Okumura, T, and Hirao, Y; Fibronectin prevents D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced lethal hepatic failure in mice, Shock, 2006, 25, 8087). Otros resultados indican que la fibronectina estimula la proliferación de las células de carcinoma de pulmón humano y disminuye la apoptosis *in vitro* al inducir la expresión del gen COX-2 y la biosíntesis de PGE2 (Han, S, Sidell, N, Roser-Page, S, and Roman, J; Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell growth by inducing cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, Int. J Cancer, 2004, 111,322-331).

Se ha demostrado que la fibronectina sufre un corte y empalme alternativo únicamente durante la organogénesis y la oncogénesis. Una de esas variantes de corte y empalme, la fibronectina con dominio extra B (ED-B), normalmente no aparece en los tejidos adultos normales y ha sido propuesta como marcador de la angiogénesis tumoral (Khan, ZA, Caurtero, J, Barbin, YP, Chan, BM, Uniyal, S, and Chakrabarti, S; ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma, Exp. Lung Res., 2005, 31, 701-711). Mhawech et al. demostraron que los pacientes afectados por tumores de cabeza y cuello con tinción positiva para la EDB tienden a tener una supervivencia significativamente más corta (Mhawech, P, Dulguerov, P, Assaly, M, Ares, C, and Allal, AS; EB-D fibronectin expression in squamous cell carcinoma of the head and neck, Oral Oncol., 2005, 41, 82-88).

La expresión de la fibronectina regula la angiogénesis y la vasculogénesis y participa en las respuestas del tejido cerebral a la isquemia y las crisis epilépticas. La expresión génica de la fibronectina apareció significativamente elevada ( $p < 0,05$ ) en los fibroblastos del síndrome de Sturge y Weber en comparación con la de fibroblastos procedentes de piel normal de individuos afectados por el síndrome (Comi, AM, Hunt, P, Vawter, MP, Pardo, CA, Becker, KG, and Pevsner, J; Increased fibronectin expression in sturge-weber syndrome fibroblasts and brain tissue, Pediatr. Res., 2003, 53, 762-769). La concentración de fibronectina era notablemente superior en tumores malignos de ovario en comparación con tumores benignos de dicho órgano y los ovarios normales. La concentración de fibronectina aparece significativamente elevada en pacientes con cáncer de ovario recidivante frente al mismo tipo de pacientes sin recidiva. La expresión de enzimas matriolíticos y de fibronectina procedentes del tumor son importantes para el crecimiento de los tumores ováricos (Demeter, A, Szirmai, K, Olah, J, Papp, Z, and Jeney, A; Elevated expression of matrix metalloproteinase-9, and fibronectin concentration in recurrent epithelial ovarian cancer, Orv. Hetil., 2004, 145, 1617-1624). El hecho de que la fibronectina fuera uno de los dos únicos genes regulados significativamente a la baja entre 1176 genes analizados en un estudio refuerza la hipótesis de su actuación como un importante gen supresor de las metástasis en el cáncer mamario (Urtreger, AJ, Werbajh, SE, Verrecchia, F, Mauviel, A, Puricelli, LI, Kornblihtt, AR, and Bal de Kier Joffe ED; Fibronectin is distinctly downregulated in murine mammary adenocarcinoma cells with high metastatic potential, Oncol. Rep., 2006, 16, 1403-1410).

Un artículo publicado describe que tres péptidos solubles de la fibronectina (RGD, CS-1 y FN-C/H-V) inducen la apoptosis en los fibroblastos de pulmón. La apoptosis se produjo por disrupción de la adhesión (anoikis). El uso de péptidos pequeños de la fibronectina para promover la apoptosis de los fibroblastos merece ser estudiado en profundidad como posible tratamiento antifibrótico (Hadden, HL and Henke, CA; Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides, Am. J Respir. Crit Care Med, 2000, 162, 1553-1560). Otro estudio ha demostrado que la fibronectina estimula la proliferación de las células del carcinoma de pulmón amicrocítico humano (NSCLC). Han demostrado que la fibronectina aumenta la proteína MMP-9, la expresión de ARNm y la actividad gelatinolítica en las células de NSCLC (Han, S, Ritzenthaler, JD, Sitaraman, SV, and Roman, J; Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells, J Biol Chem., 2006, 281, 29614-29624). Un estudio investigó si los efectos supresores de tumores de compuestos de la vitamina D (VD) también podrían estar mediados por mecanismos que rigen la adhesividad celular. La introducción de ARN pequeños de interferencia contra la fibronectina redujo a la baja su expresión, así como la adhesividad de las células a una matriz de colágeno de tipo I. Sus hallazgos ponen de manifiesto la trascendencia de la fibronectina en la modulación de la adhesividad de las células de cáncer de tiroides y, al menos en parte, en la mediación de las acciones de la vitamina D en el crecimiento de las células neoplásicas (Liu, W, Asa, SL, and Ezzat, S;  $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 targets PTEN-dependent fibronectin expression to restore thyroid cancer cell adhesiveness, Mol. Endocrinol., 2005, 19, 2349-2357).

La generación de isoformas de la fibronectina asociadas a tumor permite el desarrollo de ligandos específicos (p. ej., anticuerpos), que pueden ser usados para la administración selectiva de agentes terapéuticos en el entorno tumoral. La fibronectina es una diana de la intervención biomolecular, tanto en el desarrollo de moléculas inhibitoras que bloqueen su interacción con las integrinas y con otros receptores de la superficie celular como en el diseño de estrategias de diagnóstico por la imagen y de tratamientos dirigidos a base de ligandos (Kaspar, M, Zardi, L, and Neri, D; Fibronectin as target for tumor therapy, Int. J Cancer, 2005, 118, 1331-1339). Un estudio demostró que el tratamiento mediante la expresión *in vivo* de un polipéptido CBD-HepII recombinante de la fibronectina, designado CH50, inhibe fuertemente el crecimiento, la invasión y la angiogénesis tumorales. La terapia génica con CH50 no solo prolongó la supervivencia de ratones portadores de hepatocarcinoma en el hígado, sino que también suprimió el

crecimiento y la capacidad invasiva del tumor en el bazo y sus metástasis en el hígado. En conjunto, tales hallazgos sugieren la posible utilidad del CH50 en la terapia génica contra el cáncer hepático (Liu, Y, Huang, B, Yuan, Y, Gong, W, Xiao, H, Li, D, Yu, ZR, Wu, FH, Zhang, GM, and Feng, ZH; Inhibition of hepatocarcinoma and tumor metastasis to liver by gene therapy with recombinant CBD-HepII polypeptide of fibronectin, *Int. J Cancer*, 2007 121 (1) 184-92). La fibronectina posee un sitio funcional oculto (secuencia YTIYVIAL dentro de la decimocuarta repetición de tipo III) que se opone a la adhesión de la célula a la matriz extracelular. Un péptido 22-ámico de la fibronectina que contiene este sitio, llamado FNIII14, inhibe la adhesión mediada por la integrina beta-1 sin unirse a las integrinas. El estudio demuestra que el FNIII14 podría impedir la metástasis de las células de linfoma (Kato, R, Ishikawa, T, Kamiya, S, Oguma, F, Ueki, M, Goto, S, Nakamura, H, Katayama, T, and Fukai, F; A new type of antimetastatic peptide derived from fibronectin, *Clin Cancer Res.*, 2002, 8, 2455-2462).

### Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El EGFR desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células normales. Por esa razón el estado del EGFR suele aparecer alterado en un abanico de tipos de tumores humanos y en general acarrea un pronóstico malo. Contribuye al crecimiento y supervivencia de las células neoplásicas a través de diversas vías (Maehama, T and Dixon, JE; The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J Biol Chem.*, 1998, 273, 13375-13378). Las anomalías del EGFR constituyen una de las aberraciones moleculares más habituales en el glioblastoma (Zawrocki, A and Biernat, W; Epidermal growth factor receptor in glioblastoma, *Folia Neuropathol.*, 2005, 43, 123-132).

La amplificación del EGFR y la sobreexpresión de su ARNm son frecuentes en los gliomas de alto grado de origen astrocítico, y siempre están estrechamente asociadas con un nivel elevado de la proteína EGFR (Wong, AJ, Bigner, SH, Bigner, DD, Kinzler, KW, Hamilton, SR, and Vogelstein, B; Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, 84, 6899-6903; Chaffanet, M, Chauvin, C, Laine, M, Berger, F, Chedin, M, Rost, N, Nissou, MF, and Benabid, AL; EGF receptor amplification and expression in human brain tumors, 1992, *Eur. J Cancer*, 28, 11-17). La sobreexpresión de la proteína sin amplificación génica ha sido descrita hasta en el 27% de los glioblastomas, pero también se ha descrito que los astrocitomas y los oligodendrogliomas, menos malignos, también la presentan sin la amplificación del gen en cuestión (Reifenberger, J, Reifenberger, G, Ichimura, K, Schmidt, EE, Wechsler, W, and Collins, VP; Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors, *Am. J Pathol.*, 1996, 149, 29-35).

Las implicaciones pronósticas de la amplificación/sobreexpresión del EGFR en los tumores cerebrales son controvertidas. Algunos autores no han hallado ninguna influencia de la amplificación/sobreexpresión del EGFR en la supervivencia de los pacientes (Olson, JJ, Barnett, D, Yang, J, Assietti, R, Cotsonis, G, and James, CD; Gene amplification as a prognostic factor in primary brain tumors, *Clin Cancer Res.*, 1998, 4, 215-222; Newcomb, EW, Cohen, H, Lee, SR, Bhalla, SK, Bloom, J, Hayes, RL, and Miller, DC; Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes, *Brain Pathol*, 1998, 8, 655-667; Waha, A, Baumann, A, Wolf, HK, Fimmers, R, Neumann, J, Kindermann, D, Astrahantseff, K, Blumcke, I, von, DA, and Schlegel, U; Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas, *J Neurosurg*, 1996, 85, 634-641) mientras que otros han llegado a la conclusión de que tales alteraciones influyeron negativamente en el pronóstico (Etienne, MC, Formento, JL, Lebrun-Frenay, C, Gioanni, J, Chatel, M, Paquis, P, Bernard, C, Courdi, A, Bensadoun, RJ, Pignol, JP, Francoual, M, Grellier, P, Frenay, M, and Milano, G; Epidermal growth factor receptor and labelling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome, *Clin Cancer Res.*, 1998, 4, 2383-2390; Jaros, E, Perry, RH, Adam, L, Kelly, PJ, Crawford, PJ, Kalbag, RM, Mendelow, AD, Sengupta, RP, and Pearson, AD; Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumors, *Br. J Cancer*, 1992, 66, 373-385; Schlegel, J, Merdes, A, Stürnm, G, Albert, FK, Forsting, M, Hynes, N, and Kiessling, M; Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma, *Int. J Cancer*, 1994, 56, 72-77; Zhu, A, Shaeffer, J, Leslie, S, Kolm, P, and El-Mahdi, AM; Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation, *Int. J Radiat. Oncol. Biol Phys.*, 1996, 34, 809-815).

Existen algunas estrategias terapéuticas relacionadas con la molécula del EGFR en las células cancerosas. Las más ampliamente estudiadas son: El tratamiento con anticuerpos específicos por medio de anticuerpos desnudos o conjugados con toxinas, liposomas o radionúclidos, y el uso de inhibidores de la tirosina-cinasa de receptor. Existen varios tipos de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el EGFRwt. Unos bloquean el acceso de los ligandos al receptor (cetuximab) y otros provocan la rápida internalización del receptor (ABX-EGF) (Sridhar, SS, Seymour, L, and Shepherd, FA; Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer, *Lancet Oncol.*, 2003, 4, 397-406). Pero como el EGFRwt también se halla presente en la superficie de las células normales, los efectos secundarios pueden limitar su uso.

El EGFR aparece sobreexpresado en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC) donde sus niveles de expresión se correlacionan con la reducción de la supervivencia. Los tratamientos que bloquean el EGFR han demostrado poca eficacia en los ensayos clínicos y básicamente en combinación con el tratamiento estándar. El EGFRvIII se expresa en el HNSCC, donde contribuye a reforzar el crecimiento y la resistencia frente a los

tratamientos dirigidos contra el EGFR natural. La eficacia antitumoral de las estrategias dirigidas contra el EGFR podría mejorar con la adición del bloqueo específico del EGFRvIII (Sok, JC, Coppelli, FM, Thomas, SM, Lango, MN, Xi, S, Hunt, JL, Freilino, ML, Graner, MW, Wikstrand, CJ, Bigner, DD, Gooding, WE, Furnari, FB, and Grandis, JR; Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting, Clin Cancer Res., 2006, 12, 5064-5073).

Otra estrategia consiste en provocar la muerte selectiva de las células del glioblastoma y de otros tipos de cáncer que sobreexpresen el receptor del EGF. Con un vector no viral que reconoce específicamente el receptor del EGF se ha conseguido introducir de forma selectiva en células cancerosas un ARNdc sintético antiproliferativo (poliinosina-citosina [poli-IC]). La poli-IC dirigida contra el EGFR indujo con rapidez la apoptosis en las células diana tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. La liberación en el tumor de la poli-IC dirigida contra el EGFR propició la regresión completa de tumores intracraneales preestablecidos en ratones atímicos, sin que se apreciaran efectos adversos tóxicos en el tejido cerebral normal. Un año después de la conclusión del tratamiento los ratones tratados seguían sanos y sin cáncer (Shir, A, Ogris, M, Wagner, E, and Levitzki, A; EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice, PLoS. Med, 2006 Jan; 3(1):e6. Epub 2005 Dec 6).

La aplicación de ARN pequeños de interferencia (ARNsi) se ha convertido en una herramienta eficaz y altamente específica para modular la expresión génica, y con ella se ha silenciado una amplia gama de oncogenes. La regulación a la baja del EGFR mediante ARNsi ha sido demostrada en dos estirpes celulares de glioma que presentaban diferentes niveles de expresión del citado receptor (U373 MG, LN18). La expresión del ARNm y de la proteína del EGFR se redujo de un 70% a un 90%. Con todo, el tratamiento con ARNsi no inhibe la proliferación y la migración celular ni el estado de activación de las cascadas de señalización acopladas al EGFR. En concordancia con estos resultados, los análisis de la expresión génica con micromatrices solo revelaron pequeños cambios, aunque específicos, en los patrones de expresión. En suma, estos datos indican que la regulación a la baja del EGFR podría no bastar como monoterapia contra el glioma maligno (Vollmann, A, Vornlocher, HP, Stempf, T, Brockhoff, G, Apfel, R, and Bogdahn, U; Effective silencing of EGFR with RNAi demonstrates non-EGFR dependent proliferation of glioma cells, Int. J Oncol., 2006, 28, 1531-1542).

Diversos estudios clínicos han ofrecido resultados prometedores. Por ejemplo: El h-R3 es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el dominio externo del EGFR con alta afinidad, inhibiendo así la activación de la tirosina-cinasa. Con el fin de evaluar la seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia preliminar del h-R3 en pacientes con glioma de alto grado recién diagnosticado se llevó a cabo un estudio de fase I/II (Ramos, TC, Figueredo, J, Catala, M, Gonzalez, S, Selva, JC, Cruz, TM, Toledo, C, Silva, S, Pestano, Y, Ramos, M, Leonard, I, Torres, O, Marinello, P, Perez, R, and Lage, A; Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial, Cancer Biol Ther., 2006, 5, 375-379).

El EKB-569 es un potente inhibidor de bajo peso molecular, selectivo e irreversible del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que está siendo desarrollado como antineoplásico. Se ha llevado a cabo un estudio de fase 1 de aumento de la dosis en pacientes japoneses. De acuerdo con los criterios RECIST, presentaron enfermedad estable pero regresión radiográfica del tumor (Yoshimura, N, Kudoh, S, Kimura, T, Mitsuoka, S, Matsuura, K, Hirata, K, Matsui, K, Negoro, S, Nakagawa, K, and Fukuoka, M; EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib, Lung Cancer, 2006, 51, 363-368).

Gefitinib, un inhibidor específico de la tirosina-cinasa acoplada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) ha demostrado su eficacia en un subgrupo de pacientes con carcinoma de pulmón amicrocítico (NSCLC) que fracasan con la quimioterapia convencional. También se le ha atribuido un efecto antitumoral en metástasis cerebrales del NSCLC. Además, las mutaciones del EGFR han demostrado una estrecha asociación con la sensibilidad del NSCLC al gefitinib. Asimismo se ha evaluado su eficacia en metástasis cerebrales de NSCLC, así como el vínculo entre dicha eficacia y mutaciones del EGFR. Gefitinib parece ser eficaz como tratamiento contra las metástasis cerebrales en un subgrupo de pacientes. Los datos apuntan a la posible relación entre la eficacia del gefitinib en el tratamiento de las metástasis cerebrales y las mutaciones del EGFR (Shimato, S, Mitsudomi, T, Kosaka, T, Yatabe, Y, Wakabayashi, T, Mizuno, M, Nakahara, N, Hatano, H, Natsume, A, Ishii, D, and Yoshida, J; 2006, EGFR mutations in patients with brain metastases from lung cancer: association with the efficacy of gefitinib, Neuro. Oncol., 8, 137-144).

### Quitinasa 3-Like 2 (CHI3L2)

La CHI3L2 se descubrió inicialmente en condrocitos. Ha sido descrita frecuentemente como un antígeno diana en la artritis reumatoide. No se ha descubierto ninguna relación relevante de la CHI3L2 con el cáncer. Las proteínas quitinasa 3-like han sido implicadas en la estimulación de la proliferación de las células del tejido conectivo humano, entre ellas los fibroblastos, a través de la activación de la vía de señalización mediada por la PKB y la vía de la cinasa regulada por señales extracelulares (Recklies AD, White C, Ling H; The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC-gp39) stimulates proliferation of human connective-tissue cells and activates both extracellular signal-regulated kinase- and protein kinase B-mediated signalling pathways; Biochem J. 2002; 365:119-126). En ratón las proteínas quitinasa 3-like se han hallado muy reguladas al alza en modelos de cáncer gástrico

inducido por *Helicobacter* (Takaishi S, Wang TC; Gene expression profiling in a mouse model of *Helicobacter*-induced gastric cancer; Cancer Sci. 2007 (3): 284-293).

### **Doblecortina y cinasa CaM-like 2 (DCAMKL2)**

La proteína asociada a los microtúbulos DCX desempeña un papel esencial en el desarrollo de la corteza cerebral en los mamíferos. Se ha publicado la identificación de una proteína-cinasa, la doblecortina cinasa-2 (DCAMKL2), dotada de un dominio (DC) altamente homólogo a la DCX. La DCAMKL2 muestra actividad de unión a los microtúbulos a través de su dominio DC y actividad de proteína-cinasa mediada por un dominio cinasa, organizadas en una estructura en la que ambos dominios son funcionalmente independientes.

La sobreexpresión de la DCAMKL2 estabiliza el citoesqueleto de microtúbulos contra la despolimerización inducida por el frío. La autofosforilación de la DCAMKL2 reduce de forma acusada su afinidad hacia los microtúbulos. Los ARNm de la DCAMKL2 y de la DCX son específicos del sistema nervioso y se expresan durante el período de laminación de la corteza cerebral. La DCX permanece regulada a la baja después del nacimiento, en tanto que la DCAMKL2 persiste en abundancia en la edad adulta, lo cual indica que la secuencia DC posee funciones desconocidas hasta el momento en el sistema nervioso maduro. En las neuronas simpáticas, la DCAMKL2 está localizada en el cuerpo celular y en los segmentos terminales de los axones y las dendritas.

Es posible que la DCAMKL2 actúe como un interruptor dependiente de la fosforilación en el control reversible de la dinámica de los microtúbulos en la cercanía de los conos de crecimiento neuronales. Los patrones de expresión, las actividades funcionales, la regulación y la localización de la DCAMKL2 sugieren que actúa en paralelo o en coordinación con otros miembros de la familia de genes DC (genes que codifican el dominio DC) en acontecimientos importantes para el desarrollo neural y, posiblemente, en aquellos que son propios del sistema nervioso maduro. La DCAMKL2 está compuesta de dos dominios funcionales e independientes, un dominio de unión y de estabilización de microtúbulos (la secuencia DC) y un dominio cinasa con actividad de proteína-fosfotransferasa.

Se ha planteado que la secuencia DC jugaría un papel esencial en la transducción de las señales extracelulares y de las señales intracelulares derivadas de ellas en cambios en la dinámica de los microtúbulos. En particular, dada su capacidad para interactuar con los microtúbulos regulada por la fosforilación y su localización en los segmentos terminales de los axones y de las dendritas, regiones en que los microtúbulos sufren inestabilidad dinámica, la DCAMKL2 debería ser considerada como un posible mediador de las reorganizaciones rápidas del citoesqueleto que suceden como respuesta a los procesos de transmisión de señales en las neuronas (Edelman, AM, Kim, WY, Higgins, D, Goldstein, EG, Oberdoerster, M, and Sigurdson, W; Doublecortin kinase-2, a novel doublecortin-related protein kinase associated with terminal segments of axons and dendrites, J Biol Chem., 2005, 280, 8531-8543).

### **Canal de potasio rectificador de entrada sensible al ATP 10 (KCNJ10)**

La función principal de los canales de potasio rectificadores de entrada (Kir) consiste en crear la elevada selectividad hacia el potasio (K<sup>+</sup>) de la membrana de los gliocitos y el potencial de membrana en reposo (RMP) intensamente negativo, ambas propiedades fisiológicas características de la glía. La propiedad clásica de los canales Kir consiste en que el K<sup>+</sup> fluye hacia el interior cuando el RMP es negativo respecto al potencial de equilibrio del K<sup>+</sup> (E(K)), pero con potenciales más positivos inhiben las corrientes de salida. Una característica de la glía del SNC es la expresión específica del subtipo KCNJ10, un actor importante en la conductancia del K<sup>+</sup> en las membranas de los gliocitos y clave en el ajuste del RMP glial. Así pues, los canales Kir, y en particular el KCNJ10, son reguladores esenciales de las funciones gliales, que a su vez determinan la excitabilidad neuronal y la conducción axonal (Butt, AM and Kalsi, A; Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4. 1 in glial functions, J Cell Mol. Med, 2006, 10, 33-44).

La disminución de la capacidad de amortiguación del potasio y del glutamato en los astrocitos provoca la hiperexcitabilidad de las neuronas y la alteración de la transmisión sináptica. Los canales KCNJ10 son básicamente responsables de la hiperpolarización de los astrocitos corticales y probablemente juegan un papel importante en el amortiguación del potasio. La supresión tangible de la depuración del glutamato en los astrocitos a través de la atenuación de la expresión génica del KCNJ10 pone de manifiesto el papel de la hiperpolarización de la membrana en este proceso (Kucheryavikh, YV, Kucheryavikh, LY, Nichols, CG, Maldonado, HM, Baksi, K, Reichenbach, A, Skatchkov, SN, and Eaton, MJ.; Downregulation of Kir4. 1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes, Glia 2006, 55 (3), 274 - 281).

La amortiguación espacial por parte del KCNJ10 del K<sup>+</sup> extracelular en el sistema nervioso central solo es posible debido a la distribución desigual del canal en la superficie del gliocito. Se ha observado la localización anómala del KCNJ10 en diversos tumores cerebrales humanos (astrocitomas y oligodendrogliomas de alto y bajo grado), lo cual indica que la capacidad de amortiguación de los gliocitos podría estar alterada y provocaría la entrada de agua (edema citotóxico) (Warth, A, Mittelbronn, M, and Wolburg, H; Redistribution of the water channel protein aquaporin-4 and the K<sup>+</sup> channel protein Kir4. 1 differs in low- and high-grade human brain tumors, Acta Neuropathol. (Berl), 2005, 109, 418-426). El KCNJ10 también apareció regulado al alza en los astrocitos de cerebros dañados. Se ha propuesto la hipótesis siguiente: en condiciones normales en los astrocitos la AQP4 acopla el transporte de agua con el bombeo del K<sup>+</sup> mediado por el KCNJ10, pero en estados patológicos, la AQP4 facilita el flujo del líquido

edematoso cerebral y el KCNJ10 amortigua el K<sup>+</sup> extracelular elevado (Saadoun, S, Papadopoulos, MC, and Krishna, S; Water transport becomes uncoupled from K<sup>+</sup> siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumors: immunohistochemical case review, *J Clin Pathol.*, 2003, 56, 972-975).

Es sabido que los péptidos que son presentados por MHC de clase II están compuestos por una «secuencia central» dotada de un secuencia de aminoácidos que se ajusta a cierto motivo específico del alelo de HLA y, opcionalmente, de extensiones N y/o C-terminales que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, que se consideran irrelevantes para la interacción del péptido y todos o una parte de los clones de linfocitos T que reconocen la contrapartida natural). Las extensiones N y/o C-terminales pueden, por ejemplo, tener entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, respectivamente. Estos péptidos se pueden utilizar directamente para cargar las moléculas MHC de clase II o bien la secuencia se puede clonar en vectores de acuerdo con la descripción ofrecida abajo en la presente memoria. Dado que estos péptidos constituyen el producto final del procesamiento de péptidos más grandes en el interior de la célula, también pueden utilizarse péptidos más largos. Los péptidos descritos pueden tener cualquier tamaño, pero normalmente suelen tener un peso molecular inferior a 100. 000, preferiblemente inferior a 50. 000, más preferiblemente inferior a 10. 000 y normalmente unos 5. 000. En cuanto al número de residuos de aminoácidos, los péptidos descritos pueden tener menos de 1. 000 residuos, preferiblemente menos de 500 residuos y más preferiblemente menos de 100.

En consecuencia, las variantes naturales o artificiales que estimulan la reacción cruzada de los linfocitos T con un péptido como el descrito son a menudo variantes de longitud. La Tabla 1 ofrece ejemplos de tales variantes de longitud naturales en las SEQ ID N. ° 11 y 12, y 21 y 24, respectivamente.

Si un péptido más largo de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos se utiliza directamente para unirse a una molécula MHC de clase II, es preferible que los residuos que flanquean la región de unión a HLA central sean residuos que no afecten sustancialmente a la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula MHC de clase II o presentar el péptido al CTL. No obstante, como se ha indicado arriba, se apreciará que es posible usar péptidos más grandes, p. ej. los codificados por un polipéptido, ya que estos péptidos más grandes pueden ser fragmentados por células presentadoras de antígeno adecuadas.

También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 10 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítomo real. A semejanza de los epítomos de MHC de clase II, es preferible que los residuos que flanquean la región de unión no alteren sustancialmente la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula MHC de clase I o para presentar el péptido al CTL ni enmascarar los sitios de escisión proteolítica necesarios para exponer el auténtico epítomo durante el procesamiento.

Por supuesto, el péptido conforme a la presente invención tendrá la capacidad para unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I. La unión de un péptido a un complejo MHC puede ser analizada con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos en el ejemplo 4 de la presente invención o los descritos en la bibliografía para diferentes alelos de MHC de clase II (p. ej. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R; Ligand motifs of HLA-DRB5\*0T01 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides; *J Immunol.* 1994; 153(4): 1665-1673; Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A; Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands; *J Immunol.* 1994; 153(3):1141-1149; Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP; Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11; *J Exp Med.* 1999; 189(5): 871876; Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F; Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association; *J Exp Med.* 1995 181(5):1847-1855; Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE; A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins; *J Immunol Methods.* 1993; 163(2): 209-216; Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Haider T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM; Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice; *Int Immunol.* 1998 (12):1765-1776).

No obstante, dichos segmentos pueden ser importantes para facilitar la introducción eficaz del péptido conforme a la presente invención en las células. En una forma de realización de la presente invención, el péptido es una proteína de fusión que comprende los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") como la derivada del NCBI, número de acceso de GenBank X00497 (Strubin, M., Mach, B. and Long, E. O. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity *EMBO J.* 1984 3 (4), 869-872).

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere et al. *J. Immunol.* 1997, 159, 3230-3237. Esta estrategia implica la síntesis de seudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al. (1997) demuestran que estos seudopéptidos resultan útiles para las respuestas de MHC y de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-

CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>SO-. La patente de Estados Unidos 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH<sub>2</sub>-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH<sub>3</sub>.

Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, el grupo hidrofóbico t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxilo de los péptidos.

Adicionalmente, el péptido de la invención puede ser sintetizado para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el D-isómero de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido en lugar del L-isómero habitual.

En resumen, la modificación de p. ej. los residuos arginilos de las proteínas se basa a menudo en la reacción de compuestos dicarbonilo adyacentes como fenilgloxal, 2,3-butanodiona y 1,2-ciclohexanodiona para formar un aducto. Otro ejemplo es la reacción del metilgloxal con residuos de arginina. La cisteína se puede modificar sin la modificación simultánea de otros sitios nucleofílicos como sucede con la lisina y la histidina. Así pues, para la modificación de la cisteína hay disponible un gran número de reactivos. Las páginas web de empresas como Pierce Chemical Company, Sigma-Aldrich y otras ofrecen información sobre reactivos concretos.

La reducción selectiva de los puentes disulfuro de las proteínas también es habitual. El tratamiento térmico al cual se someten los productos biofarmacéuticos a veces genera y oxida puentes disulfuro. El reactivo K de Woodward se puede utilizar para modificar residuos de ácido glutámico concretos. Se puede emplear N-(3-(dimetilamino)propil)-N'-etilcarbodiimida para formar enlaces cruzados intramoleculares entre un residuo de lisina y un residuo de ácido glutámico. Por ejemplo, el dietilpirocarbonato es un reactivo empleado para la modificación de residuos histidilo en proteínas. La histidina también puede ser modificada con 4-hidroxi-2-nonenal. La reacción de los residuos de lisina y otros grupos α-amino es útil, por ejemplo, para la unión de péptidos a superficies o para la formación de enlaces cruzados entre proteínas/péptidos. La lisina es el sitio de fijación del poli(etilen)glicol y el principal sitio de modificación en la glucosilación de proteínas. Los residuos de metionina de las proteínas se pueden modificar por ejemplo con yodoacetamida, bromoetilamina y cloramina T. Los residuos tirosilo se pueden modificar con tetranitrometano y N-acetilimidazol. La formación de enlaces cruzados por medio de la formación de ditirosina se puede consumir con peróxido de hidrógeno/iones de cobre.

En estudios recientes sobre la modificación del triptófano se han empleado N-bromosuccinimida, 2-hidroxi-5-nitrobenzilbromuro o 3-bromo-3-metil-2-(2-nitrofenilmercapto)-3H-indol (BPNS-escatol).

La modificación de proteínas terapéuticas y péptidos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamilación con cianato potásico.

En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestra Lu et al J. Org. Chem. 1981, 46, 3433 y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en la lisina y la histidina), derivados tritilados (en la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenosulfonílicos (en la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etandiol, fenol, anisol y



agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. Además es posible optar por una combinación de métodos en fase sólida y fase en solución para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, Bruckdorfer T, Marder O, Albericio F. From production of peptides in milligram amounts for research to multi-ton quantities for drugs of the future Curr Pharm Biotechnol. 2004 Feb; 5(1):29-43 and the references as cited therein).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (UK) Ltd, Nottingham NG7 2QJ, Reino Unido.

La purificación puede efectuarse mediante una sola técnica o una combinación de varias como son la recristalización, la cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej. la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (p. ej. un polinucleótido) que codifica un péptido de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, de ADN, ADNc, ARN, ARNm y ARNsi o combinaciones de los mismos, mono y/o bicatenarios. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la invención.

Se han desarrollado diversos métodos para unir OPERABLY polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros complementarios para insertarlo en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Otro método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores son los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen ligadores sintéticos comerciales que contienen diversas dianas para las endonucleasas de restricción que facilitan varios proveedores como International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE. UU.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki et al (1988) Science 239, 487-491. Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica.

Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las reveladas en las patentes de EE. UU. N.º 4. 440. 859 expedida el 3 de abril de 1984 a Rutter et al., 4. 530. 901 expedida el 23 de julio de 1985 a Weissman, 4. 582. 800 expedida el 15 de abril de 1986 a Crowl, 4. 677. 063 expedida el 30 de junio de 1987 a Mark et al., 4. 678. 751 expedida el 7 de julio de 1987 a Goeddel, 4. 704. 362 expedida el 3 de noviembre de 1987 a Itakura et al., 4. 710. 463 expedida el 1 de diciembre de 1987 a Murray, 4. 757. 006 expedida el 12 de julio de 1988 a Toole, Jr. et al., 4. 766. 075 expedida el 23 de agosto de 1988 a Goeddel et al. y 4. 810. 648 expedida el 7 de marzo de 1989 a Stalker, todas las cuales se incorporan a la presente memoria como referencia.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención se puede unir con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A

continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como por ejemplo de resistencia a antibióticos.

Otra alternativa consiste en incorporar el gen de ese rasgo seleccionable en otro vector con el que se cotransforma la célula hospedadora.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la invención se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas reveladas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

Son muchos los sistemas de expresión conocidos, como bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), hongos filamentosos (género *Aspergillus*, etc.), células vegetales, animales o de insectos. Preferiblemente el sistema consistirá en células de mamífero, como las células de cáncer colorrectal o de glioblastoma disponibles en la ATCC Cell Biology Collection.

Un típico plásmido que sirve como vector para células de mamífero es el pSVL disponible en Pharmacia, Piscataway, NJ, EE. UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procariotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE. UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE. UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE. UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consume con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procariotas, véanse por ejemplo Cohen et al. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110, y Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. La transformación de células de levadura aparece descrita en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU. El método de Beggs, Nature 1978, 275, 104-109 también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE. UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan un constructo de ADN de la presente invención, se pueden identificar con técnicas bien conocidas como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la invención son útiles para la preparación de péptidos de la invención, por ejemplo las células bacterianas, de levadura e insecto. Con todo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar células presentadoras de antígeno como las células dendríticas para expresar los péptidos de la invención de tal forma que puedan ser cargados en las moléculas MHC oportunas. Así pues, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la invención.

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Células presentadoras de antígeno cargadas con una

proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) están siendo investigadas en este momento como tratamiento para el cáncer de próstata (Sipuleucel-T) (Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, Verjee SS, Jones LA, Hershberg RM.; Placebo-controlled phase 3 trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer; J Clin Oncol. 2006; 24(19):3089-3094; Rini BI, Weinberg V, Fong L, Conry S, Hershberg RM, Small EJ; Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (Provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy; Cancer. 2006; 107(1):67-74).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un péptido. El método comprende el cultivo de la célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido puede ser preparado para la inyección por vía intravenosa (i. v.), subcutánea (s. c.), intradérmica (i. d.), intraperitoneal (i. p.) o intramuscular (i. m.). Las vías preferidas para la inyección del péptido son s. c., i. d., i. p., i. m. e i. v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN son i. d., i. m., s. c., i. p. e i. v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis de este rango se han utilizado con éxito en varios ensayos (Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G; Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12):1553-1564; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Resumen N.º 3017).

Un aspecto importante de la presente invención es un método *in vitro* para producir CTL activados. El método comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I o II humanas cargadas con antígeno y expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno. El antígeno es un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Cuando se utilice como antígeno un epítipo de MHC de clase II, los CTL serán linfocitos cooperadores CD4-positivos, preferiblemente del tipo T<sub>H1</sub>. Las moléculas MHC de clase II pueden expresarse en la superficie de cualquier célula adecuada pero es preferible que la célula no exprese de forma natural moléculas MHC de clase II (en cuyo caso la célula será transfectada para expresar dicha molécula). Si, en cambio, la célula expresa de forma natural moléculas MHC de clase II es preferible que sea defectuosa en los mecanismos de procesamiento o de presentación de los antígenos. De ese modo será posible que la célula que expresa la molécula MHC de clase II quede completamente sensibilizada con el antígeno peptídico escogido antes de activar al CTL.

La célula presentadora de antígeno (o célula estimuladora) normalmente posee moléculas MHC de clase II en su superficie y es preferible que sea básicamente incapaz de cargar dicha molécula de MHC de clase II con el antígeno seleccionado. La molécula MHC de clase II puede cargarse fácilmente *in vitro* con el antígeno seleccionado.

Preferiblemente, la célula de mamífero carecerá del transportador de péptidos TAP o bien este estará presente en un nivel reducido o escasamente funcional. Las células adecuadas que carecen del transportador de péptidos TAP incluyen las células T2, RMA-S y de *Drosophila*. TAP es el transportador relacionado con el procesamiento de los antígenos.

La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE. UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Karre and Ljunggren (1985) J. Exp. Med. 162,1745.

Es preferible que la célula hospedadora no exprese las moléculas MHC de clase I antes de la transfección. Preferiblemente la célula estimuladora expresará una molécula importante para la coestimulación de los linfocitos T, como cualquiera de las siguientes: B7. 1, B7. 2, ICAM-1 o LFA3.

Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase II y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

De forma similar, en el caso del epítipo de MHC de clase I usado como antígeno, las CTL son linfocitos cooperadores CD8-positivos. Las moléculas MHC de clase I pueden expresarse en la superficie de cualquier célula adecuada y es preferible que la célula no exprese de forma natural moléculas MHC de clase I (en cuyo caso la célula será transfectada para expresar dicha molécula). Si, en cambio, la célula expresa de forma natural moléculas MHC de clase I ha de ser defectuosa en los mecanismos de procesamiento o de presentación de los antígenos.

De ese modo será posible que la célula que expresa la molécula MHC de clase I quede completamente sensibilizada con el antígeno peptídico escogido antes de activar el CTL.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión capaz de expresar un péptido que contenga la SEQ ID N. ° 2.

- 5 Existen otros métodos para generar CTL *in vitro*. Por ejemplo, los métodos descritos en Peoples et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 432-436 y Kawakami et al (1992) J. Immunol. 148, 638-643 emplean linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al (1995) Eur. J. Immunol. 25, 1783-1787 recurren a linfocitos autólogos de sangre periférica (PLB) para la preparación de los CTL. Jochmus et al (1997) J. Gen. Virol. 78, 1689-1695 describen la producción de CTL autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. Hill et al (1995) J. Exp. Med. 181, 2221-2228 y Jerome et al (1993) J. Immunol. 151, 1654-1662 emplean linfocitos B para la producción de CTL autólogos. Asimismo, para la preparación de CTL autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter et al. (Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Burning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T-cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. J Immunol. 2003 Nov 15; 171 (10):4974-8) describen la sensibilización *in vitro* de linfocitos T mediante células presentadoras de antígeno artificiales, que es otro modo adecuado para generar linfocitos T contra el péptido de elección.

- 20 Para la preparación de los CTL también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método a modo de ejemplo. Además de células de *Drosophila* y células T2, para presentar antígenos se pueden usar, por ejemplo, otros tipos tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras o células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden utilizar virus vegetales (véase por ejemplo Porta et al., Virology, 1994, 202, 449-955, que describen el desarrollo del virus del mosaico del chícharo como sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos extraños).

- 25 Los CTL activados que están dirigidos contra el péptido de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona CTL activados obtenibles con los susodichos métodos de la invención.

Los CTL activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que exprese de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 2.

- 30 Preferiblemente el CTL reconoce la célula interaccionando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los CTL son útiles en un método destinado a destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención. Al paciente se le administrará un número eficaz de CTL activados. Los CTL que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser CTL autólogos. Otra alternativa consiste en que los CTL no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que el donante sea un individuo sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, que no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse fácilmente mediante análisis.

- 40 Las células diana *in vivo* para los CTL CD4-positivos acordes con la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales que envuelven el tumor (células tumorales) (que a veces también expresan MHC de clase II; (Dengjel, J, Nastke, MD, Gouttefangeas, C, Gitsioudis, G, Schoor, O, Altenberend, F, Mulier, M, Kramer, B, Missiou, A, Sauter, M, Hennenlotter, J, Wernet, D, Stenzl, A, Rammensee, HG, Klingel, K, and Stevanovic, S; Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas, Clin Cancer Res., 2006, 12, 4163-4170)).

- 45 Los CTL de la invención se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Así pues, la invención también describe un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención. El método comprende la administración al paciente de un número eficaz de CTL tal y como se ha definido antes.

- 50 Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen está reprimido en el tejido del que deriva el tumor pero en cambio se expresa en éste. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel presente en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

Los CTL se pueden obtener por métodos conocidos en la materia, como, por ejemplo, los antes descritos.

- 55 Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos y se pueden encontrar por ejemplo en: (Rosenberg, SA, Lotze, MT, Muul, LM, Chang, AE, Avis, FP, Leitman, S, Linehan, WM, Robertson, CN, Lee, RE, Rubin, JT, et al., A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone, N. Engl. J. Med., 1987, 316, 889-897; Rosenberg, SA, Packard, BS, Aebbersold, PM, Solomon, D, Topalian, SL, Toy, ST, Simon, P, Lotze, MT,

Yang, JC, Seipp, CA, et al.; Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report, N. Engl. J Med, 1988, 319, 1676-1680; Dudley, ME, Wunderlich, JR, Robbins, PF, Yang, JC, Hwu, P, Schwartzentruber, DJ, Topalian, SL, Sherry, R, Restifo, NP, Hubicki, AM, Robinson, MR, Raffeld, M, Duray, P, Seipp, CA, Rogers-Freezer, L, Morton, KE, Mavroukakis, SA, White, DE, and Rosenberg, SA; Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes, Science, 2002, 298, 850-854; Yee, C, Thompson, JA, Byrd, D, Riddell, SR, Roche, P, Celis, E, and Greenberg, PD; Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 2002, 99, 16168-16173; Dudley, ME, Wunderlich, JR, Yang, JC, Sherry, RM, Topalian, SL, Restifo, NP, Royal, RE, Kammula, U, White, DE, Mavroukakis, SA, Rogers, LJ, Gracia, GJ, Jones, SA, Mangiameli, DP, Pelletier, MM, Gea-Banacloche, J, Robinson, MR, Berman, DM, Filie, AC, Abati, A, and Rosenberg, SA; Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma, J. Clin. Oncol., 2005, 23, 2346-2357); y aparecen revisados en (Gattinoni, L, Powell, DJ, Jr., Rosenberg, SA, and Restifo, NP; Adoptive immunotherapy for cancer: building on success, Nat. Rev. Immunol., 2006, 6, 383-393) y (Morgan, RA, Dudley, ME, Wunderlich, JR, Hughes, MS, Yang, JC, Sherry, RM, Royal, RE, Topalian, SL, Kammula, US, Restifo, NP, Zheng, Z, Nahvi, A, de Vries, CR, Rogers-Freezer, LJ, Mavroukakis, SA, and Rosenberg, SA; Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, Science, 2006, 314 (5796): 126-129).

Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, vector de expresión, célula o CTL activado es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención puede ser utilizada como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede ser utilizada sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o con cualquier o cualesquier moléculas conocidas.

Preferiblemente, el medicamento es una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica, o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una estirpe celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y Longenecker et al. (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690, 276-291). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos de la presente invención estimulen a los CTL CD4 o CD8. No obstante, la estimulación es más eficiente si se cuenta con la ayuda de los linfocitos T positivos para el CD opuesto. Así pues, en el caso de los epítopos de MHC de clase II que estimulan a los CTL CD4, el compañero de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD8-positivos. Y viceversa, en los epítopos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8, la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto de la invención, la vacuna comprende al menos un péptido, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 15 y más preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece péptidos como los dados a conocer o péptidos adicionales. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I y/o II.

Preferiblemente, cuando el péptido de la invención se usa en una vacuna o medicamento de la invención, está presente en forma de sal, como por ejemplo, una sal de acetato o una sal de cloruro. El ejemplo 7 presenta estudios con la vacuna IMA-910, que contiene algunos de los péptidos de la presente invención y describe la preparación de la misma con péptidos en forma de sal y su tamaño de partícula.

El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Se puede obtener una visión general por ejemplo en S. Pascolo: Vaccination with messenger RNA Methods Mol Med 2006, 127; 23-40; R. Stan, JD Wolchok and AD Cohen DNA vaccines against cancer Hematol Oncol Clin North Am 2006, 3; 613-636 or A Mahdavi and BJ Monk Recent advances in human papillomavirus vaccines Curr Oncol Rep 2006, 6, 465-472. Las vacunas polinucleótídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítipo que estimule los linfocitos T para el

respectivo CDR opuesto, tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej. respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T cooperadores ( $T_H$ ) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870. 893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas pseudovíricas, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Varios adyuvantes inmunitarios (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas y su preparación han sido descritos con anterioridad (Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM; Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison AC; The mode of action of immunological adjuvants; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF- $\alpha$ ), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N.º 5. 849. 589) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12) (Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humores y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos  $T_{H1}$  y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta  $T_{H1}$  provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta  $T_{H2}$ . Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, Nature Reviews, Drug Discovery, 5, June 2006, 471-484). La patente de EE. UU. N.º 6. 406. 705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes que no son ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 comercial conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen, entre otros, CpG químicamente modificados (p. ej. CpR, Idera), Poli(I:C), como AmpliGen, ADN o ARN bacteriano sin CpG, así como pequeñas moléculas inmunoactivas y anticuerpos como ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafinib, XL-999, CP-547632, pazopanib, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4 y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son dSLIM, BCG, OK432, ALDARA, PeviTér y JuvImmune.

Preferiblemente los medicamentos de la presente invención son activos contra el cáncer. El cáncer puede ser no metastásico o metastásico, en concreto cáncer de la cavidad bucal o la faringe, cáncer del tubo digestivo, cáncer de colon, recto o ano, cáncer de las vías respiratorias, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, vagina o vulva, cáncer del cuerpo uterino y de ovario, cáncer de las vías genitales masculinas, cáncer de las vías urinarias, cáncer de hueso y tejidos blandos, sarcoma de Kaposi, melanoma cutáneo, melanoma ocular, y cáncer ocular no melanómico, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de tiroides y de otras glándulas endocrinas, linfoma de hodgkin, linfoma no hodgkiniano y mieloma. Más preferiblemente el trastorno neoplásico tratado con el método de la presente invención es cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de estómago, GIST o glioblastoma.

Como el péptido de la invención se aisló del glioblastoma y del cáncer colorrectal, pancreático, pulmonar, renal y gástrico, el medicamento de la invención será especialmente útil si el cáncer a tratar es un glioblastoma o un cáncer colorrectal, pancreático, pulmonar, renal o gástrico.

5 La presencia de péptidos como los descritos en biopsias de tejido puede ayudar al histopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de algunos de los péptidos descritos mediante anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica pueden advertir al histopatólogo de que el tejido es maligno o está inflamado o enfermo. La presencia de grupos de péptidos como los descritos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

10 La detección de los péptidos del modo descrito en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se espera que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de péptidos como los descritos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

15 Los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las respuestas de los linfocitos T o las respuestas de anticuerpos contra los péptidos como los descritos o los péptidos como los descritos unidos a moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden ser utilizadas como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, como por ejemplo la vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia de linfocitos de donantes. En el ámbito de la terapia  
20 génica, las respuestas de los linfocitos contra péptidos como los descritos pueden tenerse en cuenta para la evaluación de efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

25 Los péptidos como los descritos pueden usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen, como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos. Además, los péptidos se pueden utilizar para  
30 verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

Además se describe un equipo que comprende (a) un envase que contiene una composición farmacéutica como la descrita arriba, en forma de solución o liofilizada; (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o una solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y (c) opcionalmente, instrucciones para (I) el uso de la solución o (II) reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada. Dicho equipo puede comprender además uno o  
35 más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (VII) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

Los equipos comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej. viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase  
40 puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el equipo y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.  
45

El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej. de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El equipo puede comprender, además, un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.  
50

Los equipos descritos pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención acompañado o no de otros componentes (p. ej. otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.  
55

Preferiblemente, los equipos descritos incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej. GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénesis, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo

- 5 pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.
- 10 El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes de la invención que
- 15 son componentes del presente equipo.

La formulación farmacéutica de la presente invención es toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferiblemente la administración será por vía subcutánea, y más preferiblemente intradérmica. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

## 20 Ejemplos

### 1. Síntesis y estructura

Los péptidos se sintetizaron con métodos convencionales y conocidos de síntesis en fase sólida basados en la química del Fmoc. Después de la purificación con HPLC preparativa, se aplicó un procedimiento de intercambio iónico para incorporar contraiones fisiológicamente compatibles (acetato o cloruro). Por último, se los sometió a liofilización y se obtuvo una sustancia sólida blanca o casi blanca. Todos los TUMAP son administrados en forma de sales de acetato excepto el IMA-CCN-001 que se suministra en forma de sal de cloruro por razones técnicas durante el proceso de fabricación.

- 25

### 2. Identificación de péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentados en la superficie celular

#### *Muestras de tejido*

- 30 Los tejidos tumorales y sanos procedentes de pacientes fueron facilitados por varios centros clínicos (véase la Tabla más adelante). Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

#### *Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido*

- 35 Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos según un protocolo ligeramente modificado (Falk, K. Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature 351, 290-296 (1991); Seeger, F. H. et al. The HLA-A\*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. Immunogenetics 49, 571-576 (1999)) con el anticuerpo específico de HLA-A\*02 BB7.
- 40 2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarsa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

#### *Detección de los TUMAP mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas ESI (ESI-LCMS)*

- Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 5 µm (Dionex). El solvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El solvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80%/agua. El pH de los
- 45 dos solventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15% al 60% de B en 90 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema de fraccionamiento. Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. A continuación se reveló la identidad de las secuencias peptídicas mediante espectrometría de masas (ESI-LCMS/MS)
- 50 con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia
- 55



sintético de secuencia idéntica.

Las Figuras 1 y 2 muestran a modo de ejemplo espectros obtenidos de tejido tumoral de varios TUMAP asociados a MHC de clase I (Fig. 1a-1h) y a MHC de clase II (Fig. 2a-2f).

### **3. Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos**

- 5 Los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas MHC probablemente son capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual derivan. A fin de minimizar el riesgo de que la vacuna con tales péptidos genere autoinmunidad los inventores se centraron en los péptidos derivados de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.
- 10 El péptido ideal sería el derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que derivaban de genes dotados con un perfil de expresión similar al *ideal* los péptidos identificados se asignaron a las proteínas y después a los genes originarios y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

#### *Fuentes de ARN y preparación*

- 15 Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por diversos centros clínicos (véase Tabla 2); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito.

Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por canales comerciales (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Amsterdam, Holanda; BioChain, Hayward, CA, EE. UU.). El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. Cuatro voluntarios sanos donaron sangre de la que se extrajeron los leucocitos.

25 La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

#### *Experimentos con micromatrices*

30 El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix ([http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression\\_manual.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx)).

35 En resumen, a partir de 5–8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, NY, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes programados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*Housekeeping*) suministrados por Affymetrix ([http://www.affymetrix.com/support/technical/mask\\_files.affx](http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx)). Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal se ajustó de forma arbitraria en 1,0.

45 Los perfiles de expresión de todos los péptidos como los descritos muestran una elevada expresión del correspondiente gen en el tejido tumoral, mientras que el gen no se expresa o lo hace muy poco en los tejidos normales.

La Fig. 3 muestra los perfiles correspondientes a los genes de los péptidos específicos del glioblastoma PTP-001 (gen: PTPRZ1, Fig. 3a), y CHI-001 (gen: CH3L2, Fig. 3b).

### **50 4. Redetección de los TUMAP identificados mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas ESI (CL-EM-ESI) en muestras de tumor adicionales**

Se emprendió una búsqueda sistemática de los TUMAP identificados con el método del Ejemplo 1 en muestras de tumores colorrectales mediante espectrometría de masas.

Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de 5 µm (Dionex). El solvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El solvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80%/agua. El pH de los dos solventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15% al 60% de B en 90 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema fraccionamiento. Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. Para la detección de los péptidos definidos se efectuó un cribado de alta sensibilidad con este tipo de experimentos con CL-EM-ESI en función de las masas moleculares y los tiempos de retención conocidos de los péptidos en el sistema cromatográfico. Así pues, para la selección del precursor se aplicó una lista que contenía los valores m/z de los péptidos identificados previamente (carga sencilla y/o doble). A continuación se reveló la identidad de la secuencia mediante espectrometría de masas (CL-EM-ESI/EM) con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica. La evaluación del rendimiento de la purificación del péptido HLA y de la reproducibilidad del sistema analítico, incluida la estabilidad del tiempo de retención se llevó a cabo usando la intensidad y el tiempo de retención de un péptido HLA-A\*02 endógeno abundante (YLLPAIVHI derivado de DDX5) como patrón interno. Por consiguiente, el criterio de admisión de la muestra de cáncer colorrectal (CCR) para la detección de los TUMAP previamente identificados en dichos experimentos consistió en una intensidad mínima de 650 cuentas por barrido de la señal del patrón interno con carga doble (YLLPAIVHI) en el experimento de CL-EM/EM para asegurar el éxito en el aislamiento del péptido HLA y el rendimiento correcto del sistema analítico.

La Tabla 2 expone los resultados de un análisis de muestras de cáncer de colon y recto en diversos estadios así como de metástasis originadas a partir del tumor primario. En la mayoría de las muestras se hallaron todos los TUMAP HLA-A\*02. Las frecuencias de redetección de los TUMAP HLA-DR son por lo general menores. Esto era previsible porque en el caso de los péptidos HLA de clase II pueden existir diversas variantes de longitud de la secuencia principal. Como control positivo se empleó el ODC-001, un TUMAP identificado anteriormente (M. Diehl, tesis doctoral 1998, Universidad de Tubinga) y presente en un gran número de tumores de colon.

Tabla 2 Redetección de los TUMAP en muestras de cáncer colorrectal

TUMAP redetectados (+) o no detectados (-)											
N.º	Muestra CCR	Localización de tumor	Estadio tumoral	Clase I						Clase II	
				C20-001	TGFBI-001	TOP-001	NOX-001	PCN-001	ODC-001	TGFBI-004	
1	CCA062	Colon	I	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
2	CCA740	Colon	II	+	+		+	+	+	+	n. a.
3	CCA165	Colon	II	+	+	+	+	+	+		-
4	CCA712	Colon	III	+		+	-		+	+	n. a.
5	CCA707	Colon	III	+	+	+					n. a.
6	CCA718	Colon	III	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
7	CCA739	Colon	III	+		+	+	+	+	+	n. a.
8	CCA166	Colon	III	+		+	+	+	+	+	-
9	CCA734	Colon	III		+	+	+	+	+	+	n. a.
10	CCA719	Colon	IV	+	+	+	+	+	+	+	n. a.
11	CCA725	Colon	IV		+	+	-	+	+	+	n. a.
12	CCA164	Colon	IV	+	+	-	-	+	+	+	-
13	CCA167	Colon	IV	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
14	CCA056	Colon	?	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
15	CCA305	Colon	?	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
20	CCA708	Metástasis de colon	IV	+	+	+	+	+	+	+	+
16	CCA160	Recto	II	+	+	+	+	+	+	+	+
17	CCA754	Recto	II	+	+		-	+	+	+	n. a.
18	CCA170	Recto	III	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	+
19	CCA171	Recto	IV	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	-
21	CCA724	Metástasis de recto	IV	+	+	-	-	-	-	+	+
Porcentaje de detección en las muestras analizadas				100%	100%	87%	67%	80%	100%	100%	33%
n. a.: no analizado											

## 5. Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I a HLA-A\*0201

El ensayo de unión a HLA se realizó con el Kit ELISA Epl (proporcionado por Sceren Buus, Instituto de Inmunología y Microbiología Médicas de la Universidad de Copenhague, Dinamarca) siguiendo las indicaciones de Sylvester-Hvid (Sylvester-Hvid, C, Kristensen, N, Blicher, T, Ferre, H, Lauemoller, SL, Wolf, XA, Lamberth, K, Nissen, MH, Pedersen, LO, and Buus, S; Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide - MHC class I interaction, Tissue Antigens, 2002, 59, 251-258) y del manual del fabricante del Kit ELISA Epl.

### *Preparación de las soluciones de péptidos*

Los péptidos se disolvieron en DMSO + TFA al 0,5% (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta una concentración de 10 mg/ml. La solución de trabajo más alta usada en este ensayo fue de 200 µM, resultado de diluir la solución madre a 1:50 con tampón de dilución para péptidos (PBS con Lutrol-F68 al 0,1% yrojo de fenol 10 mg/l) hasta un volumen final de 100 µl. Se hizo una dilución seriada 5x con tampón de dilución para péptidos.

### *Replegamiento de los complejos de HLA-A\*0201/péptido*

Conforme a las indicaciones del manual de instrucciones, se preparó una solución de HLA-A\*0201 concentrada 2x mezclando tampón pH 3x (pH 6,6), Lutrol-F68, β2m humana y HLA-A\*0201 recombinante (todos incluidos en el Kit ELISA Epl) con PBS.

Para el proceso de replegamiento se mezclaron 15 µl de las diluciones seriadas del péptido con 15 µl de la mezcla de MHC concentrada 2x en placas de 96 pocillos (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.) que se incubaron a 18 °C durante 48 horas.

### *Cuantificación de los complejos mediante ELISA*

Se recubrieron placas Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.) con anticuerpo w6/32 5 µg/ml diluido en tampón de recubrimiento (pH 9,6), se incubaron durante 24 h a 4 °C y se bloquearon con PBS al que se había añadido leche en polvo desnatada al 5% (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta el día siguiente a 4 °C.

El patrón del complejo MHC (Kit ELISA Epl) se diluyó con PBS al que se había añadido leche en polvo desnatada al 2% (PBS/leche desnatada) hasta una concentración de 10 nM. Se preparó una dilución seriada 3,16 x y se transfirió a una placa Maxisorp recubierta y bloqueada. Los complejos de péptido-MHC se diluyeron 10x con PBS/leche desnatada al 2%, se transfirieron a la misma placa Maxisorp y se incubaron durante 2 horas a 4 °C. Se añadió anticuerpo de conejo anti-hfl2m (Kit ELISA Epl) diluido 1:2500 en una solución de PBS/leche desnatada al 2% y se incubó 1 hora a 4 °C. El tampón de amplificación (polímero de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP) y suero de ratón (ambos suministrados con el Kit ELISA Epl) se diluyeron con PBS/leche desnatada al 2%, se añadieron a las placas y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió el tampón de desarrollo (tetrametilbencidina, TMB; Kit ELISA Epl) y las placas se incubaron a oscuras durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 0,2 M (VWR, Darmstadt, Alemania). Las placas se leyeron a una D.O. de 450 nm con un lector de ELISA VERSAmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.).

Los datos se interpretaron con Excel y Prism®, Graphpad 3.0.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Cuanto más bajo es el valor de  $K_D$  mayor es la afinidad hacia el HLA-A\*0201. Las afinidades de unión abarcaron un amplio abanico de aproximadamente cuatro décadas, pero la mayoría de los péptidos presentaron afinidades similares dentro de una década (C20-001, ODC-001, PCN-001, TOP-001). La afinidad de MUC-001 se sitúa alrededor de una década por debajo de la mayoría de los ligandos incluidos, pero pese a ello dicho péptido fue capaz de inducir la respuesta de los linfocitos T en una vacuna empleada contra el carcinoma renal (Wierecky, J, Muller, MR, Wirths, S, Haider-Oehler, E, Dorfel, D, Schmidt, SM, Hantschel, M, Brugger, W, Schroder, S, Horger, MS, Kanz, L, and Brossart, P; Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients, Cancer Res., 2006, 66, 5910-5918). Por otra parte, NOX-001 presenta una afinidad de unión ligeramente mayor y TGFBI-001 presenta la afinidad más potente, con un valor  $K_D$  unas 100 veces menor que la mayoría de los demás péptidos.

En términos absolutos, los valores  $K_D$  comprendidos entre 0,01 y 0,1 nM como los que se observan en la mayoría de estos péptidos ya representan una unión potente. Afinidades similares se han observado en péptidos de la vacuna contra el carcinoma de células renales IMA901, que ha sido probada con éxito (H. Singh-Jasuja, S. Walter, T. Weinschenk, A. Mayer, P. Y. Dietrich, M. Staehler, A. Stenzl, S. Stevanovic, H. Rammensee, J. Frisch; Correlation of T-cell response, clinical activity and regulatory T-cell levels in renal cell carcinoma patients treated with IMA901, a novel multi-peptide vaccine; Reunión de ASCO 2007 Póster n.º 3017; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Póster n.º 3017). En definitiva, las propiedades de unión de los péptidos descritos en la presente invención son bastante similares a las de los péptidos que han demostrado generar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vivo*.

## 6. Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I

### Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con un complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, en primer lugar se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocíticas HLA-A\*02+ recién obtenidas con un medio de separación en gradiente de densidad convencional (PAA, Cölbe, Alemania). Las capas leucocíticas procedían del banco de sangre de Tübinga y del Katharinenhospital de Stuttgart. Las PBMC aisladas se incubaron hasta el día siguiente con medio para linfocitos T (TCM) para la sensibilización humana *in vitro*. El medio consistía en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAA, Cölbe, Alemania), penicilina 300 U/ml/estreptomicina 100 µg/ml (Cambrex, Verviers, Bélgica), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Neustadt, Alemania) y gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Los linfocitos CD8+ se aislaron con un kit de selección positiva MACS para CD8+ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8+ obtenidos se incubaron hasta su uso en TCM suplementado con IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Chiron, Munich, Alemania). La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros con pequeñas modificaciones (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Werner, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; Cutting edge; predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 2003, 171, 4974-4978). En suma, se sintetizaron moléculas recombinantes y biotiniladas de HLA-A\*0201 desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada según el método descrito por Altman et al. (Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Wilkams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 1996, 274, 94-96). El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humana (Jung G, et al. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84, 4611-4615) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,60 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los complejos pMHC usados como controles positivo y negativo fueron A\*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) y A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5) o A\*0201/HBV-001 (FLPSDFFPSV), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800.000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng del pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad) o de 2 ng del relevante más 200 ng de MHC irrelevante (biblioteca de pMHC) (microperlas de baja densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente  $1 \times 10^5$  linfocitos T CD8+ con  $2 \times 10^5$  microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, se llevaron a cabo análisis tetraméricos de los tetrameros MHC fluorescentes (producidos del modo descrito por Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Williams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 1996, 274, 94-96) más anticuerpo CD8-FITC del clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) en un citómetro LSR II FACSCalibur (BD). Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis tetramérico se hizo con el programa FCS Express (De Novo Software). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ tetramero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetramero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetramero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Péptidos como los descritos se analizaron junto con péptidos cuya inmunogenicidad *in vivo* es conocida a efectos comparativos. En la Figura 5 se expone una tinción representativa que muestra la generación de estirpes de linfocitos T específicas para NOX-001 y ODC-001. Los resultados se resumen en la tabla 3.

**Tabla 3: Comparación de la inmunogenicidad *in vitro* de péptidos como los descritos y de péptidos vacunales**

Antígeno	Inmunogenicidad detectada
TGFBI-001	sí
NOX-001	sí
PCN-001	sí

(continuación)

Antígeno	Inmunogenicidad detectada
TOP-001	sí
C20-001	sí
ODC-001	sí
CCN-001	sí
PTP-001	sí
CHI-001	sí
JAK-001	sí

**Tabla 3a: Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos descritos**

Antígeno	Donantes positivos / donantes analizados	Pocillos positivos / pocillos analizados
IMA-HBV-001	7/16(44%)	10/107(9%)
IMA-TGFBI-001	3/4 (75%)	4/22 (18%)
IMA-NOX-001	3/5 (60%)	9/60 (15%)
IMA-PCN-001	3/4 (75%)	4/42 (10%)
IMA-TOP-001	2/5 (40%)	7/72 (10%)
IMA-C20-001	1/5 (20%)	1/60 (2%)
IMA-ODC-001	1/5 (20%)	1/60 (2%)
IMA-HBV-001	2/5 (40%)	10/54 (19%)
IMA-CEA-004	4/4 (100%)	50/60 (83%)
IMA-CCN-001	5/5 (100%)	42/54 (78%)
IMA-MET-001	4/6 ( 67% )	30/72 (42%)

- 5 Aquí se resumen los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por los inventores. Los resultados han sido obtenidos con la estimulación de linfocitos CD8+ con microperlas de alta densidad. La variabilidad de los lotes de suero humano puede influir, y mucho, en los resultados de las pruebas de inmunogenicidad, por lo que solo se evaluaron los ensayos en que se usó un único lote de suero.

#### 7. Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase II

- 10 Los linfocitos T cooperadores prestan una importante función de apoyo a los CTL para activar y mantener la respuesta inmunitaria contra las células tumorales. Por tanto, en la vacuna IMA910 se incluyeron péptidos MHC de clase II. El TGFBI-004, uno de los tres péptidos de clase II presentes en IMA910, fue analizado para determinar su potencial inmunogénico *in vitro* y demostró ser un inductor de linfocitos T específicos tanto CD4+ como CD8+. La  
15 generación de linfocitos T CD4+ y CD8+ funcionales ha sido demostrada en experimentos con estimulaciones en un sistema autólogo.

##### *Principio de la prueba*

- 20 En condiciones *in vitro* se analizó la sensibilización y la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos específicos mediante la sensibilización de PBMC carentes de monocitos con células dendríticas autólogas y la reestimulación con PBMC autólogos. En resumen, para generar los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno se estimularon PBMC desprovistas de monocitos procedentes de un donante sano (genotipo HLA de clase I: A1/A25/B8/B18 y clase II: DQB1\*02/DQB1\*06/DRB1\*03/DRB1\*15/DRB3/DRB5) con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido y se reestimularon con PBMC autólogos más péptido. Como sistema de lectura se evaluó la producción de IFN-γ con ELISPOT y citometría de flujo tras la reestimulación de corta duración. Tras ocho estimulaciones los linfocitos T fueron analizados con ELISPOT y tinción intracelular del IFN-γ más CD4-FITC y CD8-PerCP para determinar el

porcentaje de células productoras de dicho interferón en las diversas subpoblaciones de linfocitos T. Como control negativo del experimento se usaron células estimuladas con el péptido TGFBI-004 recolectadas de pocillos distintos, agrupadas e incubadas con el péptido irrelevante.

#### *Generación de células dendríticas (CD)*

- 5 Las células dendríticas (CD) humanas se obtuvieron de monocitos cultivados en medio para CD consistente en RPMI 1640-Glutamax/25mM Hepes (Invitrogen, Alemania) complementado con plasma autólogo al 10%/penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml. En primer lugar, de la sangre de un donante sano (Banco de sangre de Tubinga) se extrajeron la capa leucotítica y el plasma por centrifugación. A continuación se aislaron las PBMC de la capa leucocítica mediante separación en gradiente de densidad convencional (Lymphocyte Separation Medium, PAA, Austria) y se resuspendió con medio de CD para contabilizar el número total de células. Se lavaron entre 100 y 120 millones de PBMC y después se resuspendieron con 15 ml de medio X-Vivo 20 (BioWhittaker, Bélgica) y se transfirieron a un frasco de cultivo celular. Dos horas después de permanecer a 37 °C, se extrajeron los medios con los leucocitos de sangre periférica (PBL), los monocitos adherentes se separaron lavando dos veces con 10 ml de PBS y se cultivaron durante 6 días en 10 ml de medio para CD con GM-CSF 100 ng/ml e IL-4 30 ng/ml (ImmunoTools, Alemania) o 20 ng/ml (R&D systems, Alemania). El tercer y quinto día se añadieron GM-CSF 100 ng/ml e IL-4 30 ng/ml (Immunotools) o IL-4 20 ng/ml (R&D Systems, Alemania). El día séptimo se activaron las CD inmaduras con TNF-alfa 10 ng/ml (R&D Systems, Alemania) y poli(IC) 20 µg/ml (Sigma Aldrich, Alemania) o LPS 100 ng/ml durante 24 horas. Las PBMC restantes y los PBL obtenidos se fraccionaron en alícuotas y se congelaron.

#### *Sensibilización in vitro de linfocitos T específicos*

- 20 Para generar linfocitos T CD4+ se procedió a estimular 3 millones de PBMC/PBL con  $2 \times 10^5$  células dendríticas (CD) autólogas. Las células dendríticas se recolectaron el día 8 (véase el apartado 3. 1, Generación de las células dendríticas). Con el fin de recolectar la mayor cantidad posible de células, incluidas las adherentes, se empleó PBS con EDTA 5 mM. Después de lavarlas con medio para CD se procedió al recuento. Para la carga con el péptido, las células dendríticas se resuspendieron en 1 ml de medio para CD y se incubaron con péptido 25 µg/ml durante 2 horas a 37 °C. Los péptidos usados para la sensibilización reiterada de las CD fueron: TGFBI-004, Posmix (mezcla de péptidos del EBV y de CMV), Padre y CMV. Las PBMC/PBL autólogas se descongelaron, se lavaron con medio para CD (al menos dos veces) y se sembraron en una placa de 24 pocillos con una densidad de 3 millones de céls. /ml en 1 ml. Acto seguido las células dendríticas cargadas con el péptido (en forma de 1 ml de suspensión portadora del péptido) se añadieron a las PBMC/PBL sembradas y se incubaron durante 7 días a 37 °C. Tras la sensibilización, los CTL obtenidos volvieron a ser estimulados con PBMC autólogas cargadas con el péptido que habían permanecido crioconservadas y habían sido irradiadas (30 Gy; Gammacell 1000 Elite, Nordion International, Canadá). Con tal fin, en cada pocillo se depositaron  $5 \times 10^5$  CTL y  $2,5 \times 10^6$  PBMC. La sensibilización repetida de las PBMC con el péptido se efectuó del mismo modo que con las células dendríticas. El día posterior a la primera reestimulación, se añadió IL-2 (R&D Systems, Alemania) a una concentración final de 2 ng/ml, así como IL-7 a razón de 5 ng/ml. En adelante, se siguió añadiendo al medio de cultivo IL-2 cada dos días e IL-7 cada siete. La segunda reestimulación se efectuó 7 días después, pero esta vez a los CTL cultivados se les añadió el péptido solo, sin PBMC. Las sucesivas reestimulaciones se efectuaron en ciclos de 7 días, añadiendo alternativamente las PBMC cargadas con el péptido y el péptido solo. Los análisis se llevaron a cabo tras la octava estimulación mediante tinción intracelular del IFN-γ y ELISPOT de IFN-γ.

#### *Resultados*

- Se pudieronsensibilizar estirpes de linfocitos T CD4+ para que reaccionaran de forma específica ante el péptido de interés (Figura 6 y Figura 3). Con ELISPOT se detectó respuesta de los linfocitos T en dos de las cuatro estirpes analizadas, mientras que con la tinción intracelular de citocinas se detectaron linfocitos CD4+ y/o CD8+ que producían IFN-γ específicamente ante el TGFBI-004 en tres de las cuatro estirpes. Por tanto, el TGFBI-004 fue capaz de desencadenar respuestas por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en un donante analizado con el citado sistema experimental. De acuerdo con este resultado alentador, es probable que dicho péptido sea inmunogénico y capaz de inducir respuestas por parte de los linfocitos T.

#### **8. Validación funcional ejemplificada por NOX-001 y TGFBI-001**

- 50 La inmunogenicidad de los péptidos incluidos en la vacuna IMA910 quedó demostrada en condiciones *in vitro* con la plataforma de validación de TUMAP de Immatics (immatics biotechnologies GmbH, Tubinga, Alemania). La inducción de los linfocitos T específicos constituye un indicador de la capacidad de los péptidos para activar el sistema inmunitario. Puesto que la respuesta inmunitaria antitumoral solo es eficiente si los linfocitos T activados hacen gala de una elevada afinidad y plena funcionalidad, se investigó la capacidad de los TUMAP para sensibilizarlos con esa afinidad y funcionalidad analizando su capacidad para producir IFN-γ o destruir células de diversas estirpes tumorales. Para la validación en profundidad se escogieron dos péptidos, NOX-001 y TGFBI-001, en virtud de sus capacidad para inducir CTL dotados de gran afinidad en condiciones *in vitro*. Los resultados demuestran que existen linfocitos T precursores con gran afinidad contra ambos péptidos en los seres humanos, y que NOX-001 permite generar estirpes de linfocitos T CD8+ funcionales.

### Principio de la prueba

Para ahondar en la inmunogenicidad de los péptidos de IMA910 y en las propiedades de los linfocitos T específicos, se seleccionaron dos péptidos para proseguir la evaluación: NOX-001 y TGFBI-001. Los experimentos en cuestión se efectuaron en immatics biotechnologies GmbH, Tubinga, Alemania (la selección de las células se llevó a cabo en la Universidad de Tubinga, en el laboratorio del Dr. Bühring).

Según su capacidad para ser activadas por antígenos de alta o baja densidad, las estirpes de linfocitos T se pueden dividir en linfocitos de alta y baja afinidad. Como se ha demostrado antes (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Bühring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 2003, 171, 4974-4978), se pueden generar CTL humanos de gran afinidad usando menos péptido para la activación que en el caso de los linfocitos T CD8+ de baja afinidad. También se ha demostrado que las células expandidas de esa forma son más eficaces a la hora de reconocer las estirpes de células tumorales que expresan el antígeno, por lo que podrían constituir una herramienta importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

A fin de determinar la capacidad de los péptidos para generar estirpes de CTL de alta afinidad, los linfocitos CD8+ humanos aislados se sensibilizaron y expandieron mediante repetidas estimulaciones *in vitro* con perlas recubiertas de pMHC en baja densidad (complejo péptido-MHC) y anticuerpo anti-CD28 en presencia de IL-12 e IL-2. Al cabo de tres estimulaciones, una parte de los linfocitos T sensibilizados *in vitro* se sometió a tinción con tetrámeros de pMHC y a análisis por citometría. Las células tetrámero-positivas de cada donante se agruparon después según la especificidad hacia el antígeno, se tiñeron con tetrámeros de pMHCy con el anticuerpo anti-CD8-FITC humano y, por último, se sometieron a cribado por FACS en un citómetro FACSAria. Las células seleccionadas se cultivaron y expandieron en presencia de células nodriza irradiadas, citocinas y mitógeno. Para averiguar si se generaban linfocitos específicos de antígeno con alta afinidad sensibilizados, se procedió a la tinción con tetrámeros de pMHC. Y para determinar su funcionalidad se analizó la producción de IFN- $\gamma$  con ELISPOT y se examinó la destrucción de estirpes de células tumorales con un ensayo de citotoxicidad con tinción vital después de reestimar a las células con el péptido correspondiente y las pertinentes estirpes tumorales.

### Generación de estirpes de linfocitos T CD8+ específicos

Las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28 se hicieron del modo antes descrito. La única diferencia respecto al método anterior es que se realizaron con perlas cargadas con 2 ng de una peptidoteca (pMHC)MHC relevante más 200 ng de una irrelevante (perlas de baja densidad) en lugar de con 200 ng de MHC relevante (perlas de alta densidad). De ese modo se generaron mayoritariamente linfocitos T con alta afinidad para la validación en profundidad de los péptidos. Al cabo de tres estimulaciones, una parte de los linfocitos T sensibilizados *in vitro* se sometió a la tinción con tetrámeros de pMHC y a análisis por citometría. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si por lo menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una estirpe de linfocitos T CD8+ específica después tras la estimulación (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetrámero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetrámero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo). Las células tetrámero-positivas de cada donante se agruparon después según la especificidad hacia el antígeno, se tiñeron con el correspondiente tetrámero de pMHCy anticuerpo anti-CD8-FITC humano clon SK1 y, por último, se sometieron a cribado por FACS en un citómetro FACSAria (BD Biosciences, Alemania). Las células seleccionadas se cultivaron en medio para linfocitos T (RPMI-Glutamax complementado con suero AB humano termoinactivado al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, piruvato sódico 1 mM y gentamicina 20  $\mu$ g/ml) en presencia de  $5 \times 10^5$  céls./ml de PBMC alogénicas recién extraídas e irradiadas,  $5 \times 10^4$  céls./ml de células LG2-EBV irradiadas, IL-2 150 U/ml (Chiron, Munich, Alemania) y PHA-L 0,5  $\mu$ g/ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La expansión de dichas células tuvo lugar en medio para linfocitos T con IL-2 150 U/ml. Para averiguar si se generaban linfocitos específicos de antígeno con alta afinidad sensibilizados se efectuó la tinción con tetrámeros de pMHC del modo indicado antes y se analizaron en un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD Biosciences, Alemania).

### Pruebas de funcionalidad

A fin de determinar su funcionalidad se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  con ELISPOT (IFN $\gamma$  ELISPOT Set, BD, Alemania) tras la reestimulación de las células con el péptido correspondiente. Además, se investigó la citotoxicidad celular de los CTL específicos en la destrucción de estirpes tumorales con el Kit de citotoxicidad celular LIVE/DEAD ((L7010, Invitrogen, Alemania). Ambos ensayos se llevaron a cabo conforme a las instrucciones del fabricante, si no se indica otra cosa.

### Resultados

Ambos péptidos, NOX-001 y TGFBI-001, fueron inmunogénicos *in vitro* tal y como demuestra la sensibilización lograda mediante las células aAPC con baja densidad de pMHC. Tanto con NOX-001 como con TGFBI-001 se detectaron estirpes de linfocitos T específicos en la citometría FACS, lo que demuestra la existencia de linfocitos T CD8+ precursores de alta afinidad en los donantes sanos.



Además, en el caso de NOX-001, se descubrió una estirpe de linfocitos T que demostró su funcionalidad en ELISPOT, puesto que expresó de forma específica el IFN- $\gamma$  tras la reestimulación con este péptido (Fig. 8).

### 9. Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I dados a conocer al HLA-A\*0201

- 5 El objetivo del análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos de HLA de clase I CHI-001, DCA-001, JAK-001 y PTP-001 hacia la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A\*0201. Las afinidades de todos los péptidos hacia el HLA-A\*0201 resultaron comparables con las del consabido péptido control HBV-001, situándose las constantes de disociación ( $K_D$ ) en el intervalo de 0,05 a 1,6 nM.

#### Principio de la prueba

- 10 Los complejos estables de HLA/péptido constan de tres moléculas: cadena pesada de HLA, beta-2 microglobulina (b2m) y el ligando peptídico. La actividad de las moléculas de cadena pesada recombinantes y desnaturalizadas del HLA-A\*0201 solas se puede conservar convirtiéndolas en equivalentes funcionales de «moléculas HLA-A\*0201 vacías». Cuando se diluyen en un tampón acuoso que contiene b2m y un péptido adecuado, estas moléculas se pliegan con rapidez y eficacia de un modo que depende totalmente del péptido. La disponibilidad de estas moléculas se emplea en un ensayo ELISA para medir la afinidad de la interacción entre el péptido y la molécula HLA de clase I
- 15 (Sylvester-Hvid C, Kristensen N, Blicher T, Ferre H, Lauemoller SL, Wolf XA, Lamberth K, Nissen MH, Pedersen LO, Buus S. Establishment of a quantitative ELISA capable of determining peptide -MHC class I interaction. Tissue Antigens 2002, 59, 251-258).

- 20 Moléculas recombinantes y purificadas de HLA-A\*0201 se incubaron con b2m y dosis escalonadas del péptido de interés. La cantidad de complejos de HLA plegados *de novo*/péptido se determinó con un ELISA cuantitativo. Las constantes de disociación (valores  $K_D$ ) se calcularon con una curva patrón trazada con disoluciones de un complejo HLA/péptido de calibración.

#### Resultados

- 25 Los resultados se muestran en la Figura 9. Cuanto más bajo es el valor de  $K_D$  mayor es la afinidad hacia el HLA-A\*0201. Las afinidades de todos los péptidos hacia HLA-A\*0201 resultaron comparables con las del consabido péptido control HBV-001, situándose las constantes de disociación ( $K_D$ ) en el intervalo de 0,05 a 1,6 nM.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Nuevo epítipo inmunogénico para inmunoterapia

<130> FB22517/A

- 30 <160> 29

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

- 35 <213> homo sapiens

<400> 1

Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Thr Leu  
1 5

<210> 2

<211> 9

- 40 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile  
1 5

<210> 3

- 45 <211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu  
1 5 10

<210> 4

5 <211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Ser Met Ser Ala Asp Val Pro Leu Val  
1 5

10 <210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala  
1 5 10

15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

20 <400> 6

Ala Ala Phe Val Glu Glu Leu Asp Lys Val  
1 5 10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

25 <213> homo sapiens

<400> 7

Val Leu Leu Leu Val His Asn Leu Pro Gln His Leu Phe Gly  
1 5 10

<210> 8

<211> 10

30 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala  
1 5 10

<210> 9

35 <211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 9

# ES 2 553 207 T3

Gly Asp Lys Leu Glu Val Ser Leu Lys Asn Asn Val Val Ser  
1 5 10

<210> 10  
<211> 18  
<212> PRT  
5 <213> homo sapiens  
<400> 10

Gly Lys Lys Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Asn Ser Leu Cys Ile Glu  
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 11  
<211> 17  
10 <212> PRT  
<213> homo sapiens  
<400> 11

Leu Lys Asn Asn Val Val Ser Val Asn Lys Glu Pro Val Ala Glu Pro  
1 5 10 15

Asp

<210> 12  
15 <211> 15  
<212> PRT  
<213> homo sapiens  
<400> 12

Asn Gly Val Ile His Tyr Ile Asp Glu Leu Leu Ile Pro Asp Ser  
1 5 10 15

<210> 13  
<211> 14  
<212> PRT  
20 <213> homo sapiens  
<400> 13

Leu Asn Arg Ile Leu Gly Asp Pro Glu Ala Leu Arg Asp Leu  
1 5 10

<210> 14  
<211> 15  
25 <212> PRT  
<213> homo sapiens

<400> 14  
30

Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His  
1 5 10 15

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 5 <400> 15  
  
 Ala Leu Thr Thr Leu Met His Gln Leu  
 1 5  
  
 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 10 <213> homo sapiens 4  
 <400> 16  
  
 Ser Leu Asp Pro Ser Ser Pro Gln Val  
 1 5  
  
 <210> 17  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 17  
  
 Ser Leu Trp Ala Gly Val Val Val Leu  
 1 5  
  
 <210> 18  
 20 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 18  
  
 Lys Leu Thr Asp Ile Gln Ile Glu Leu  
 1 5  
  
 25 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 19  
  
 Tyr Leu Ile His Phe Pro Val Ser Val  
 30 1 5  
  
 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 35 <400> 20  
  
 Ile Val Asp Asp Ile Thr Tyr Asn Val  
 1 5  
  
 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 40 <213> homo sapiens

# ES 2 553 207 T3

<400> 21

Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu Ser  
1 5 10 15

<210> 22

<211> 16

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 22

Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser  
1 5 10 15

<210> 23

10 <211> 13

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 23

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

15 <210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

Thr Thr Leu Ile Lys Glu Met Lys Ala Glu Phe Ile Lys Glu Ala Gln  
1 5 10 15

20 Pro Gly

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> homo sapiens

25 <400> 25

Val Lys Ser Lys Val Gln Tyr Leu Lys Asp Arg Gln Leu Ala Gly  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

30 <213> homo sapiens

<400> 26

Ser Arg Arg Thr Phe Ile Lys Ser Val Pro Pro Phe Leu Arg Thr  
1 5 10 15

<210> 27

<211> 11

35 <212> PRT

<213> homo sapiens 6

<400> 27

Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Val  
1 5 10

<210> 28

<211> 9

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 28

Ser Leu Phe Asp Gln Val Val Lys Val  
1 5

<210> 29

10 <211> 9

<212> PRT

<213> homo sapiens

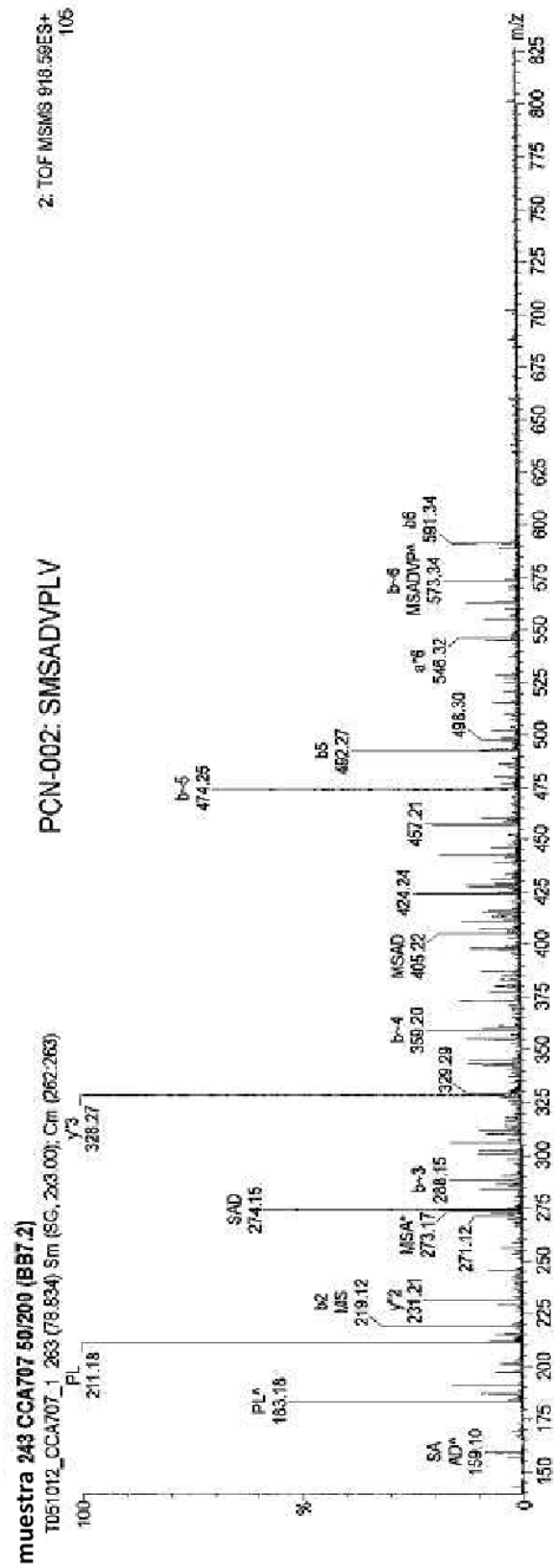
<400> 29

Ala Leu Leu Ser Glu Val Ile Gln Leu  
1 5

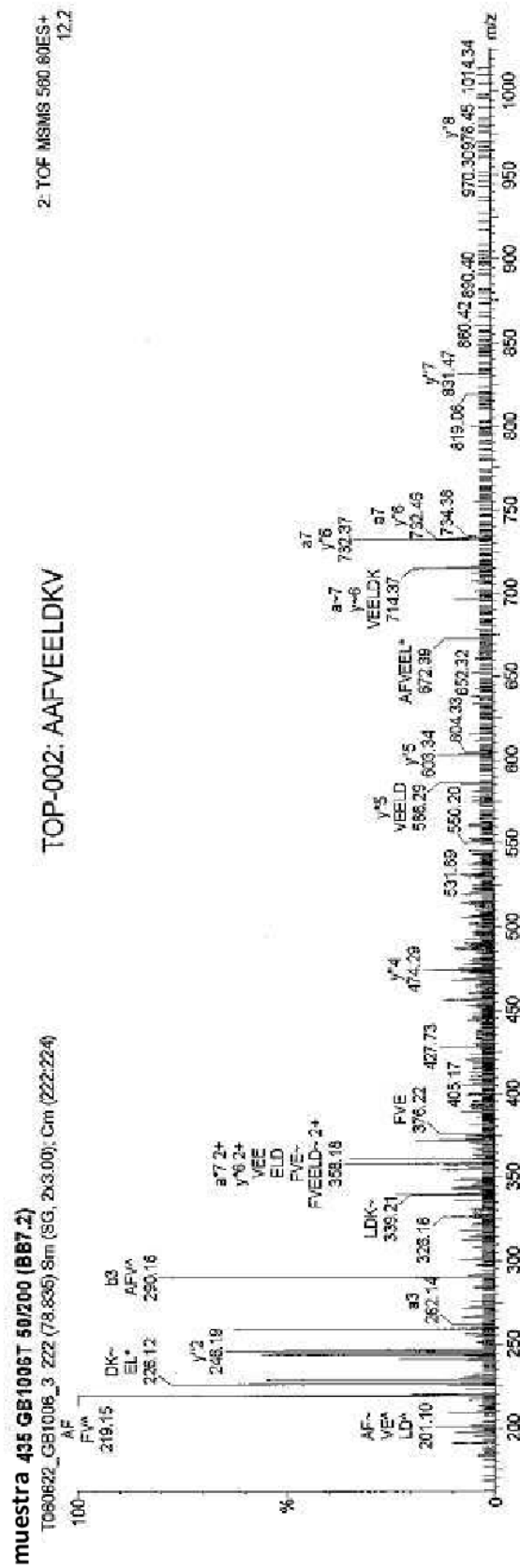
15

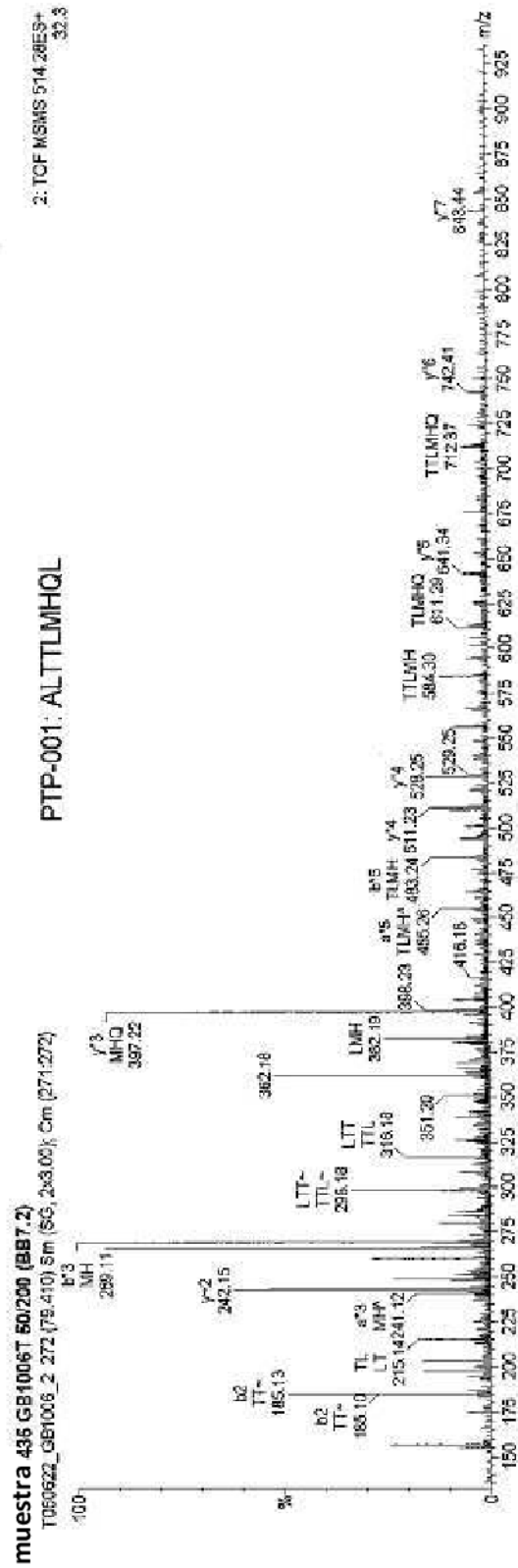
# REIVINDICACIONES

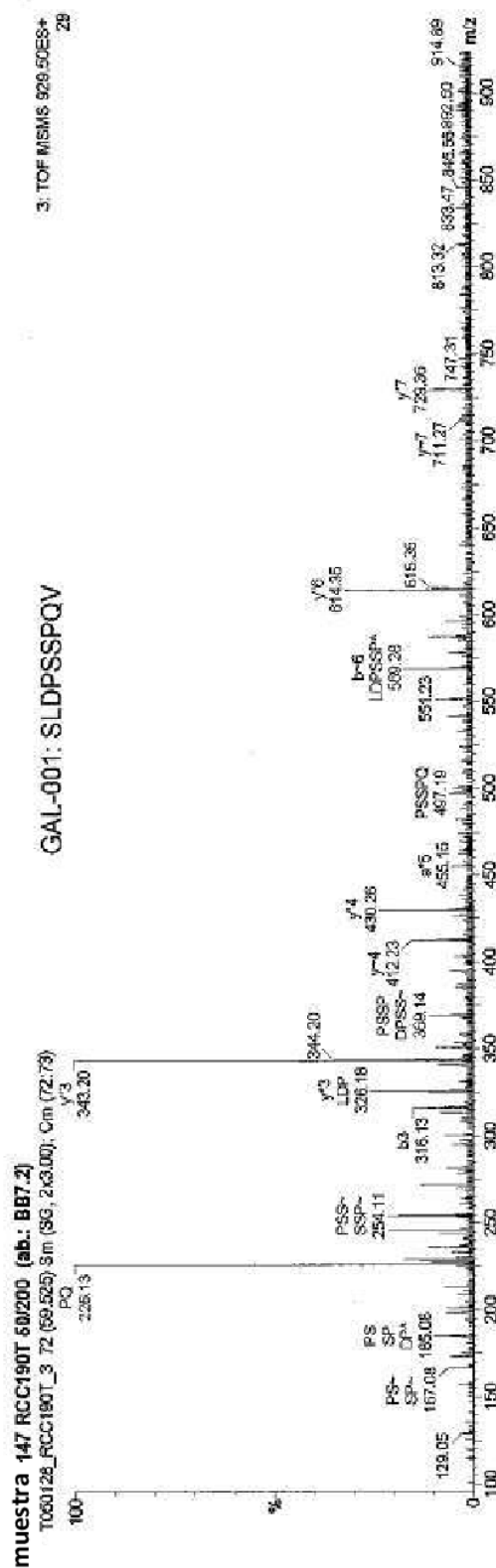
1. Péptido consistente en la secuencia ILAPVILYT conforme a la SEQ ID N. ° 2 que induce la reacción cruzada de los linfocitos T con dicho péptido.
- 5 2. Péptido acorde con la reivindicación 1, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión que comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (Ii) asociada al antígeno HLA-DR.
3. Ácido nucleico, que codifica un péptido acorde con la reivindicación 1 o 2, que es ADN, ADNc, ARN o combinaciones de los mismos, o un vector de expresión, en que el vector está ligado funcionalmente a dicho ácido nucleico.
- 10 4. Péptido conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o un ácido nucleico o un vector de expresión acorde con la reivindicación 3 para el uso en medicina.
- 5 5. Célula hospedadora que comprende el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 3, en que dicha célula hospedadora es preferiblemente una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica.
- 15 6. Método para producir un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, comprendiendo el método el cultivo de la célula hospedadora conforme con la reivindicación 5, y el aislamiento del péptido a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
- 20 7. Método *in vitro* para producir linfocitos T citotóxicos (CTL) activados, comprendiendo el método la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de CTL con moléculas MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar dichos CTL de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno un péptido acorde a la reivindicación 1, y en que dicha célula presentadora de antígeno comprende preferiblemente un vector de expresión conforme a la reivindicación 3.
8. Linfocito T citotóxico (CTL) activado, producido con el método acorde con la reivindicación 7, que reconoce selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada a conocer en la reivindicación 1.
- 25 9. Un número efectivo de linfocitos T citotóxicos (CTL) como los definidos en la reivindicación 8 para el uso en la producción de un medicamento destinado a destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada a conocer en la reivindicación 1.
- 30 10. Péptido acorde con la reivindicación 1, un ácido nucleico o un vector de expresión acorde con la reivindicación 3, una célula hospedadora acorde con la reivindicación 5, o un linfocito T citotóxico acorde con la reivindicación 8 para el uso como medicamento contra el cáncer, como por ejemplo, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer renal o cáncer gástrico.
- 35 11. El péptido acorde con la reivindicación 1, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 3, la célula hospedadora acorde con la reivindicación 5, o el linfocito T citotóxico activado acorde con la reivindicación 8 para el uso acorde con la reivindicación 10, en que dicho medicamento es una vacuna.

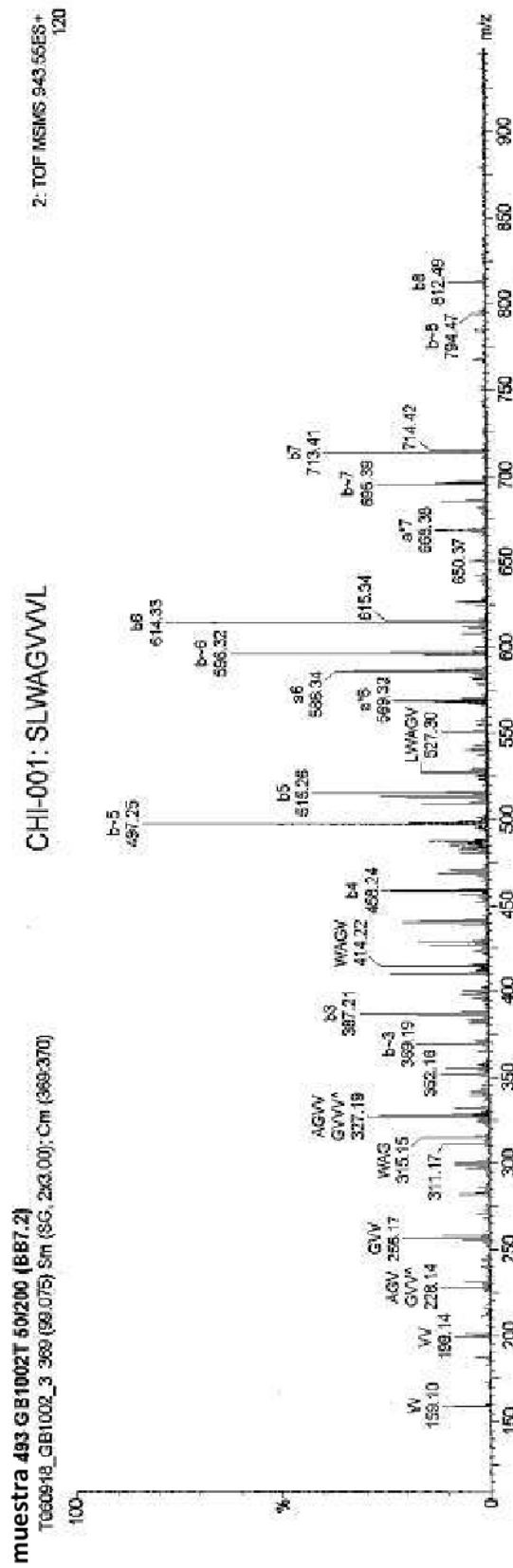


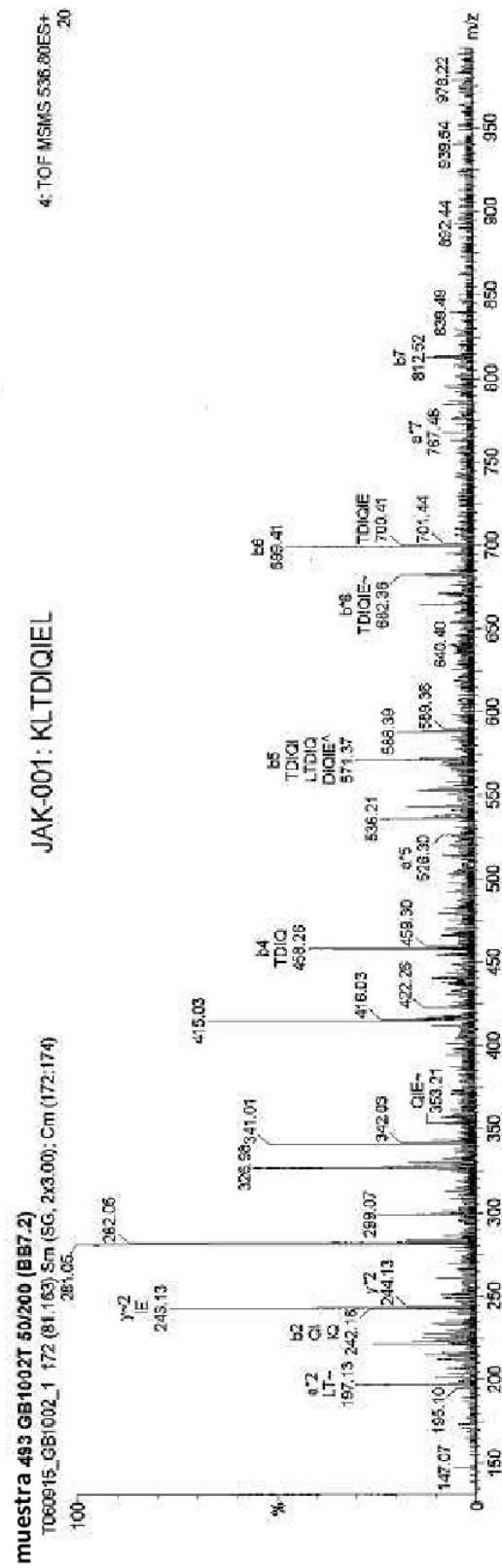


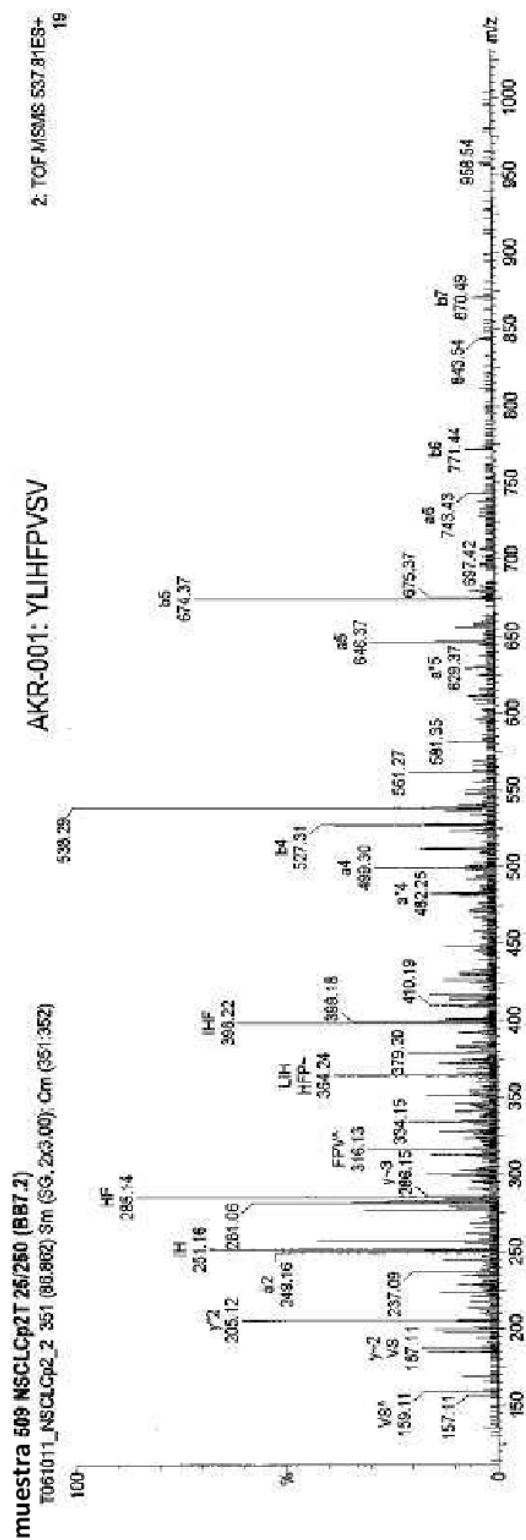


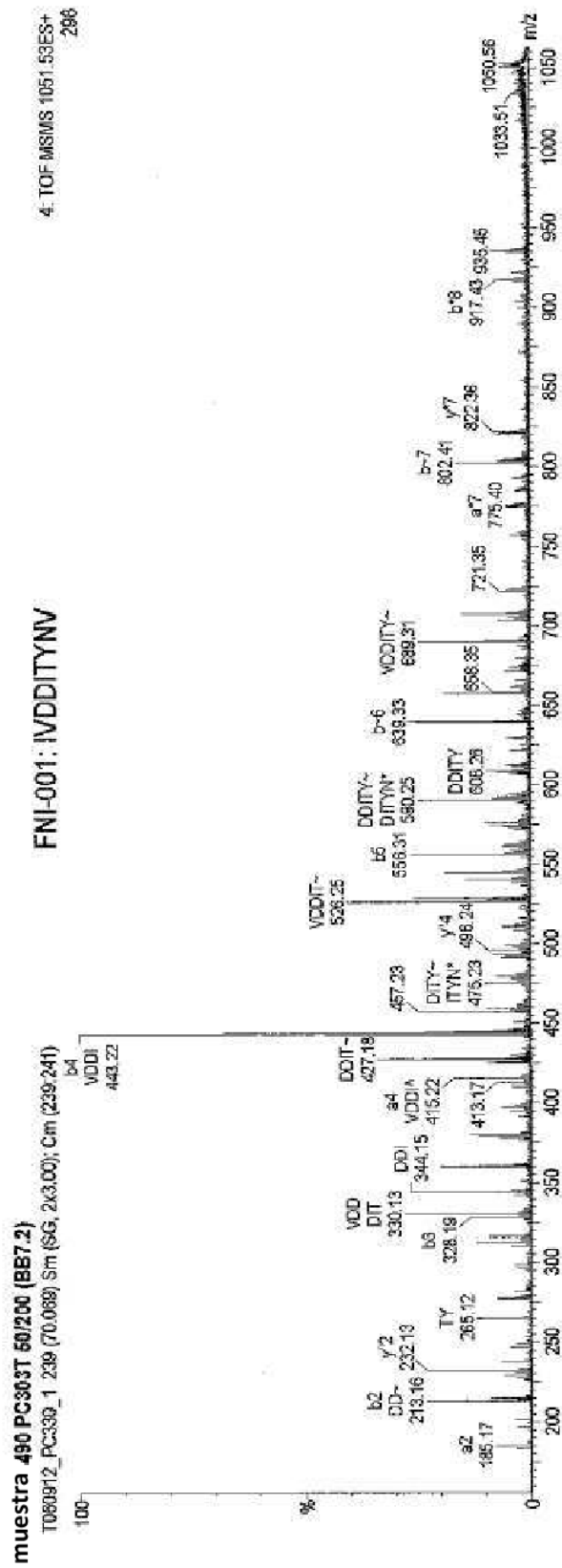


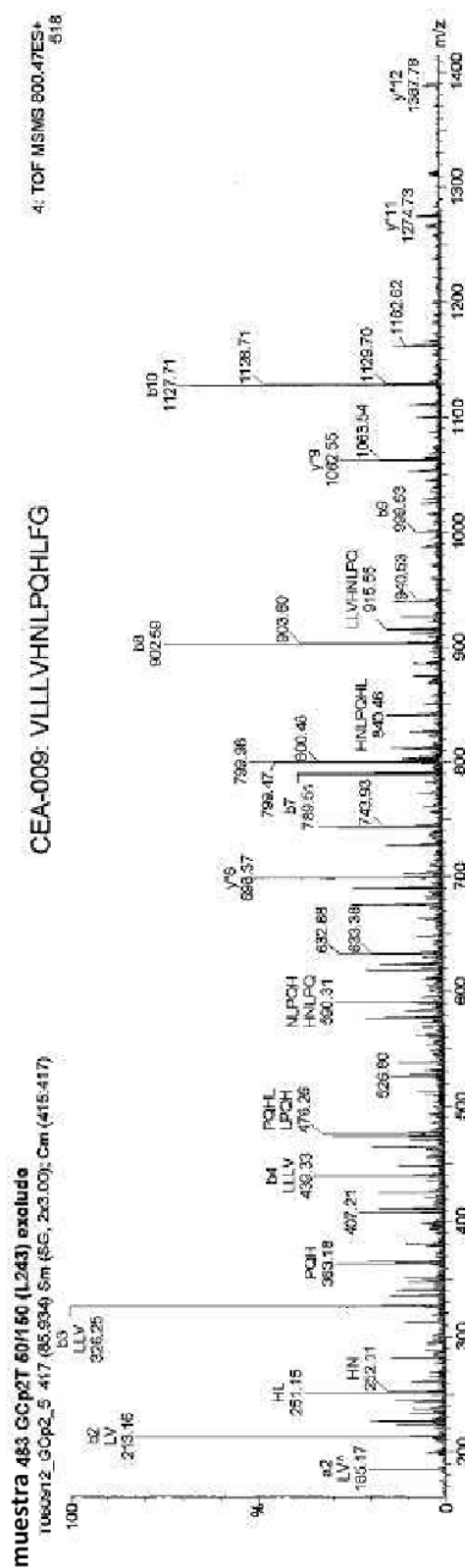




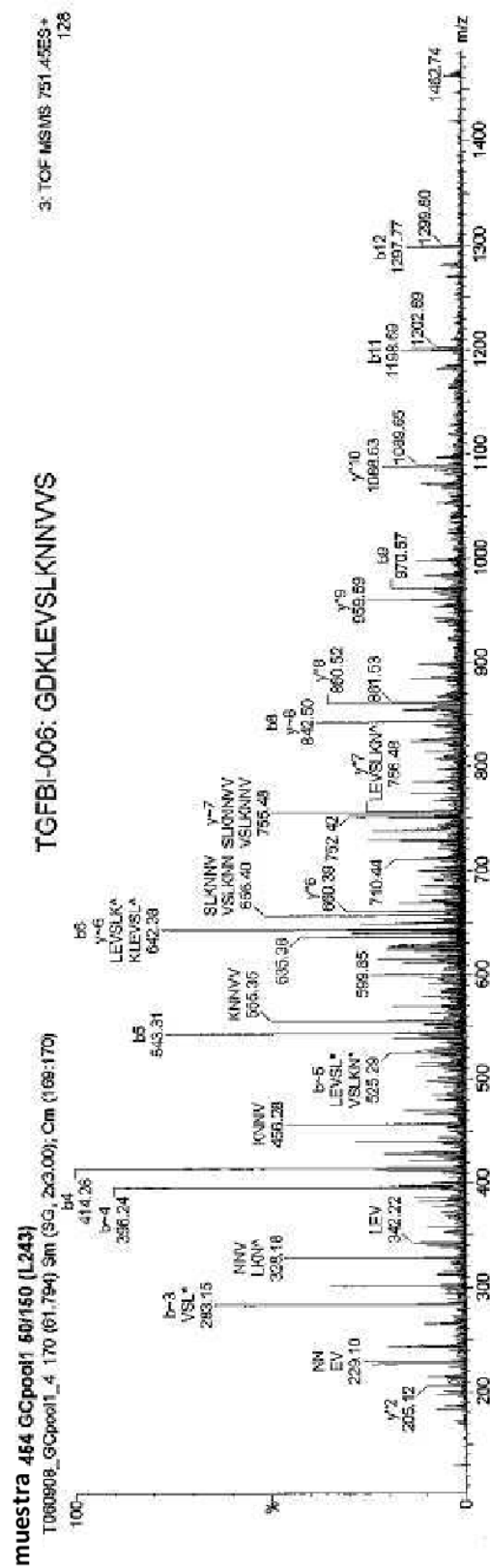


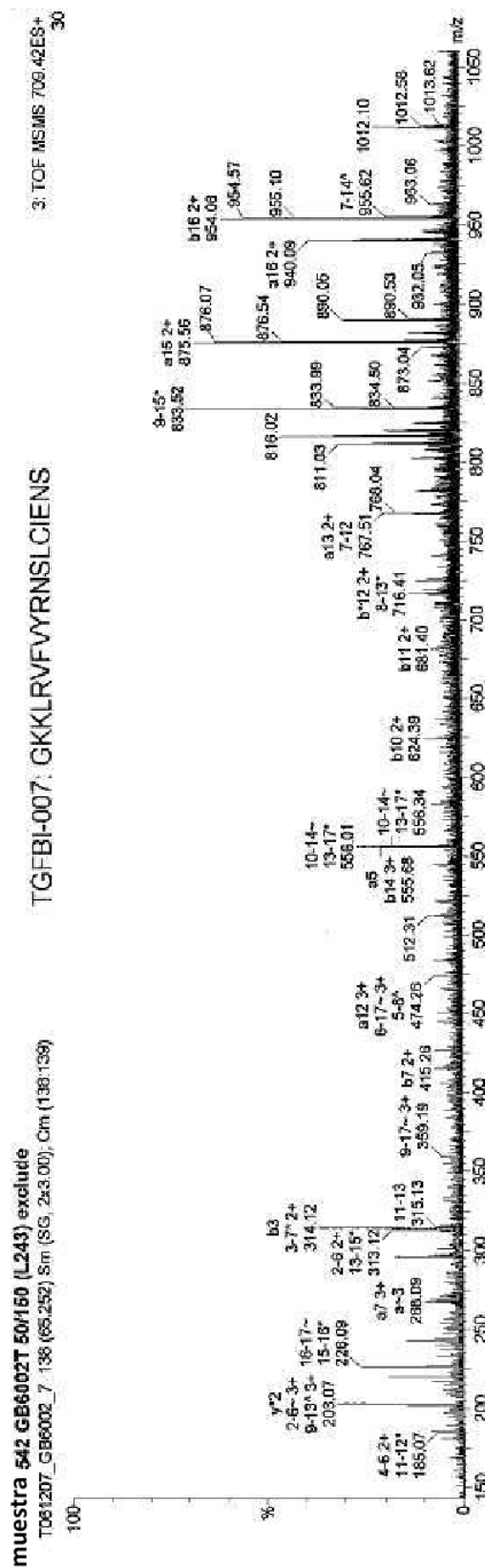


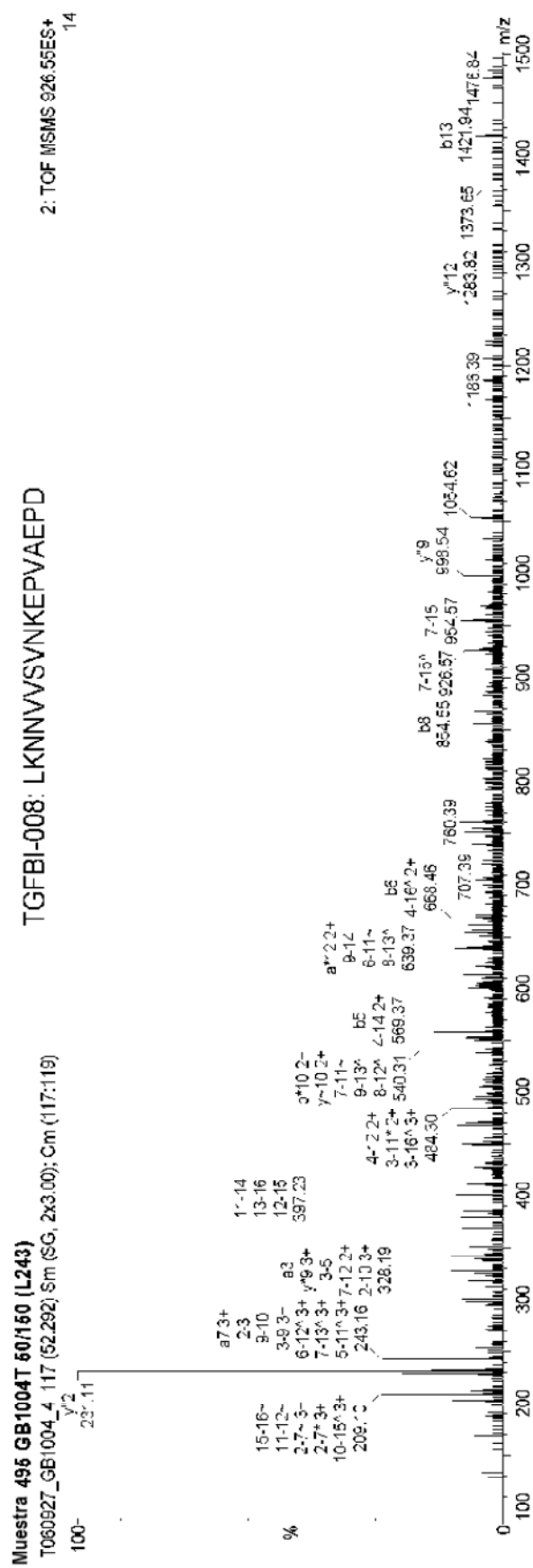


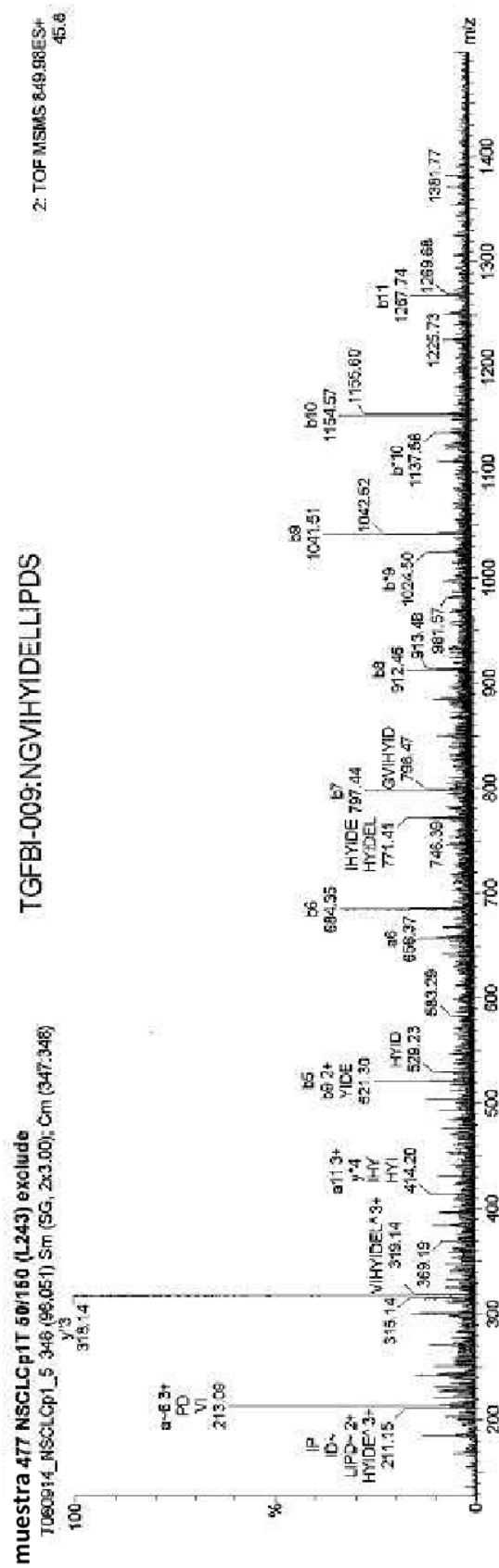












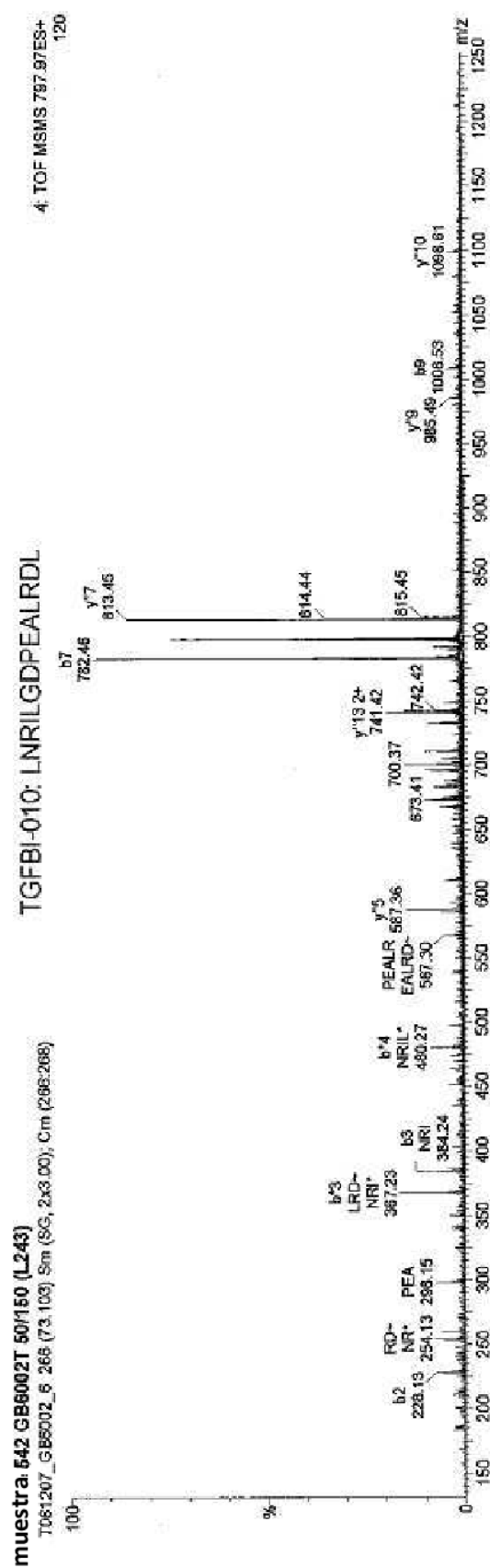


Figura 3a: Perfil de expresión de PTP

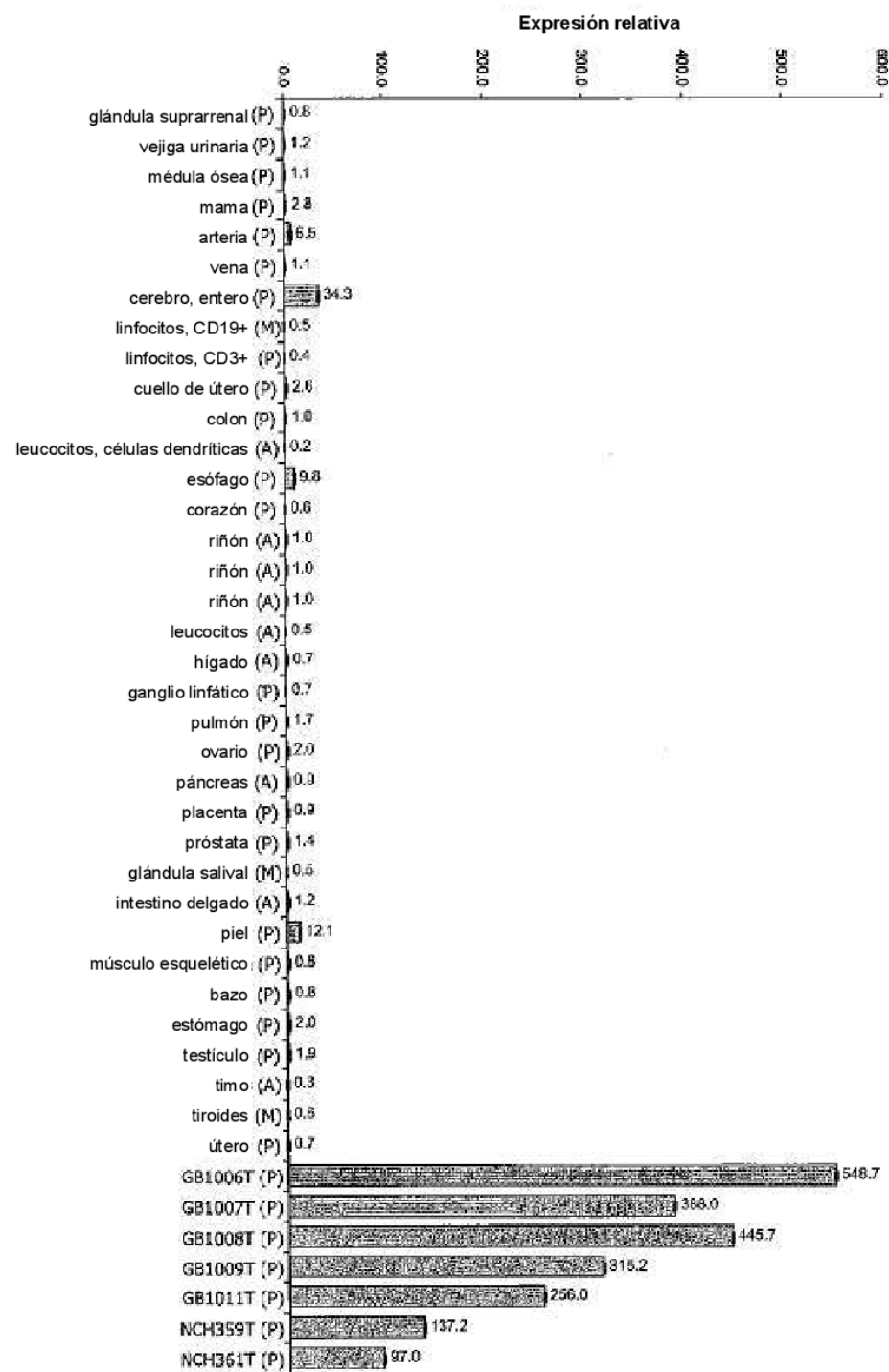


Figura 3b: Perfil de expresión de CHI

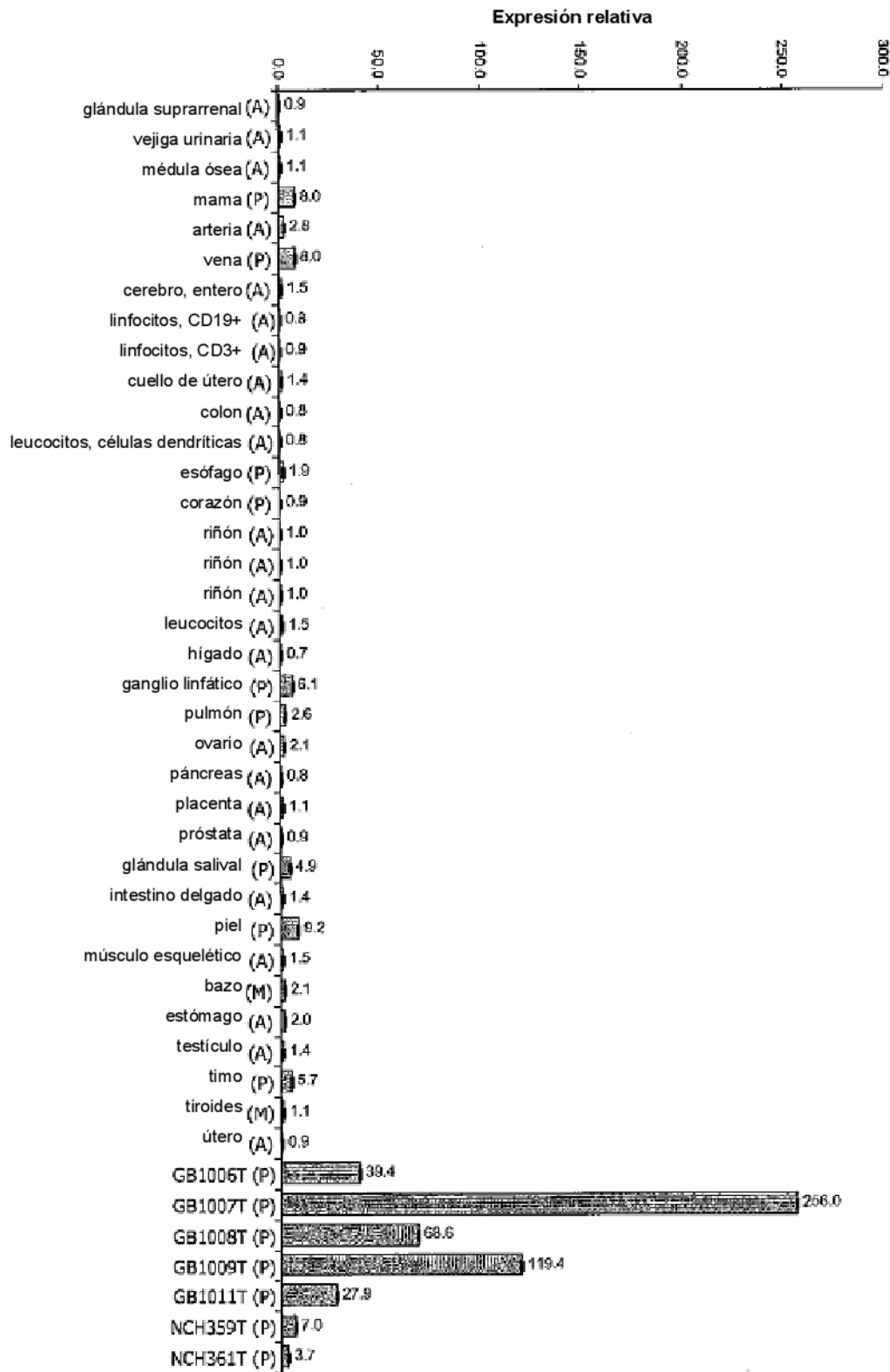


Figura 4: Afinidades de unión de la molécula de MHC de clase I

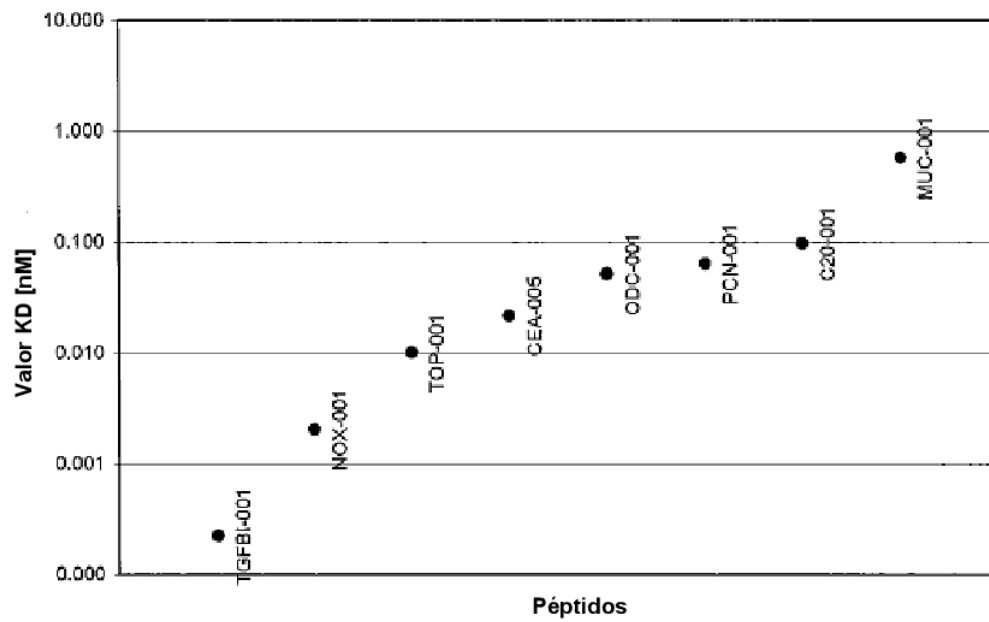


Figura 5

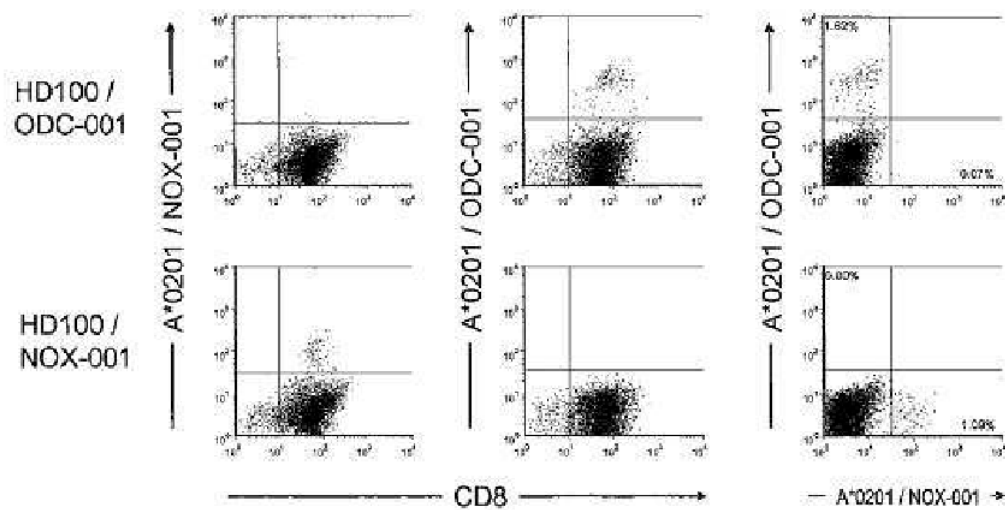




Figura 6

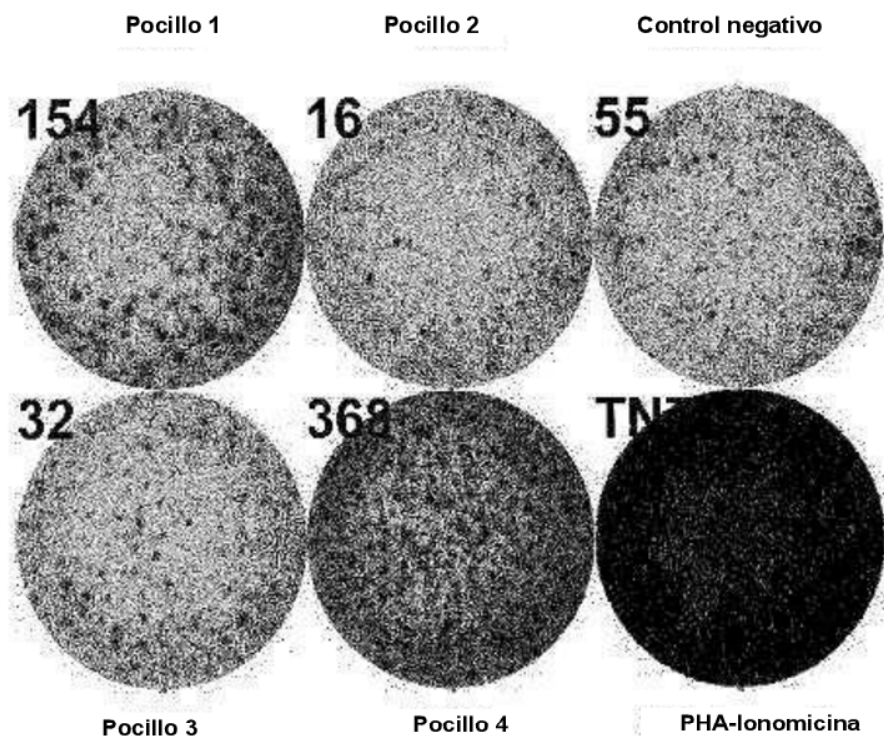


Figura 7

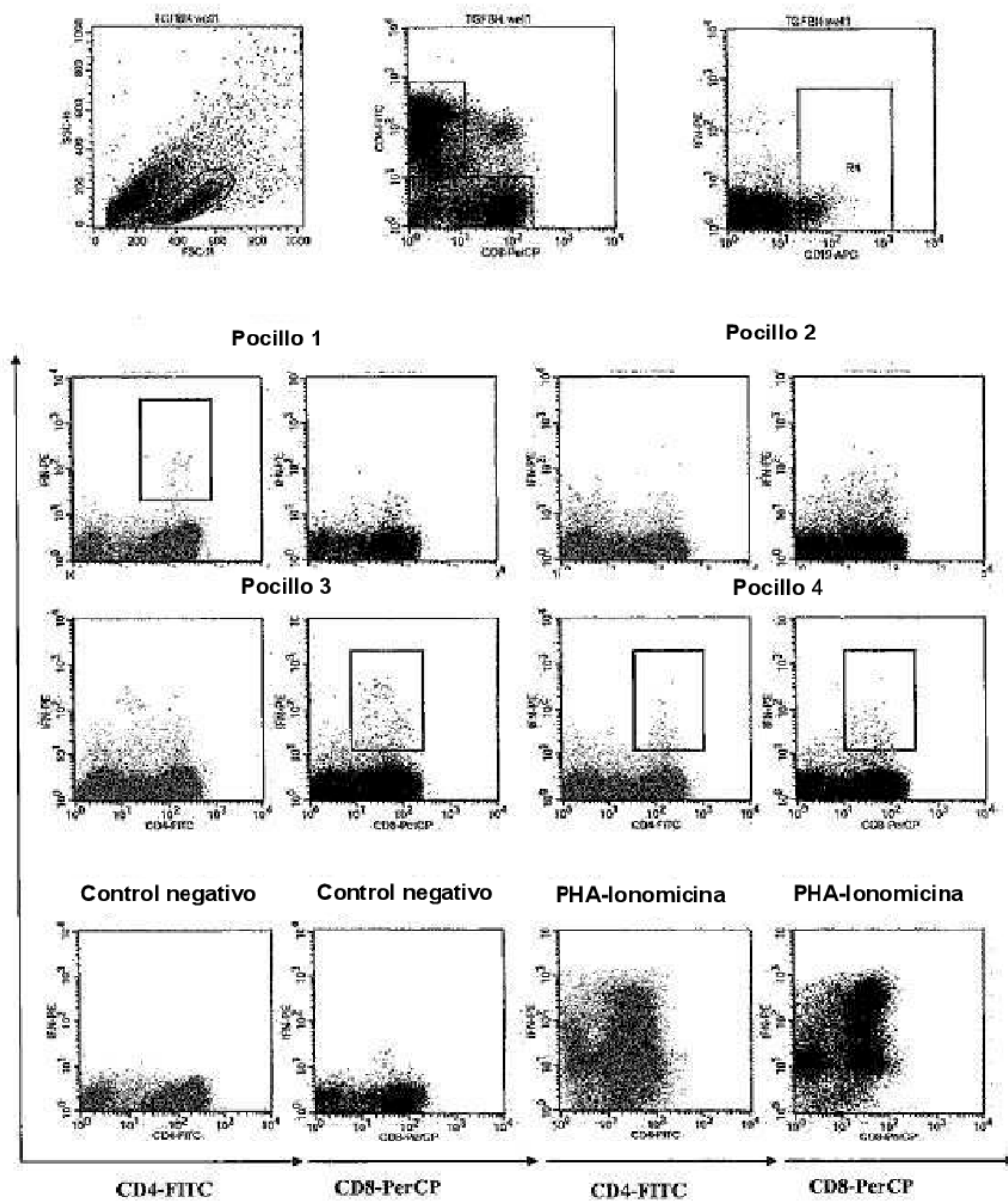


Figura 8

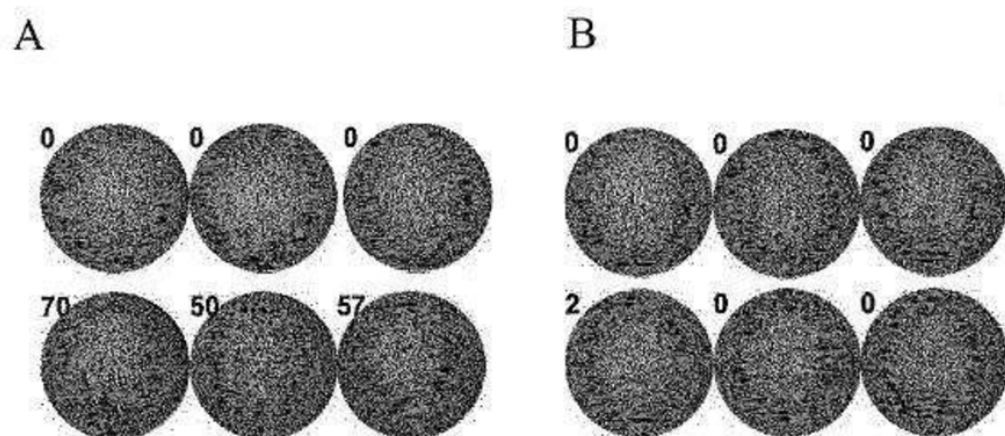


Figura 9

