

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 379 209**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/585** (2006.01)

**A61K 38/04** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **08807210 .3**

(96) Fecha de presentación: **19.06.2008**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2170941**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

(54) Título: **Epítopos T de antígenos de preprocalcitonina**

(30) Prioridad:

**22.06.2007 EP 07290777**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2012**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2012**

(73) Titular/es:

**INSTITUT GUSTAVE ROUSSY  
39, RUE CAMILLE DESMOULINS  
94800 VILLEJUIF, FR y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)**

(72) Inventor/es:

**EL HAGE, Faten;  
STROOBANT, Vincent;  
COULIE, Pierre G. y  
MAMI-CHOUAIB, Fathia**

(74) Agente/Representante:

**Pons Ariño, Ángel**

**ES 2 379 209 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

## Epítopos T de antígenos de preprocalcitonina

5 La presente invención se refiere a epítopos T de preprocalcitonina y sus usos en la inmunoterapia de cáncer.

El análisis de los CTL reactivos con el tumor obtenidos de pacientes con diversos tumores sólidos había conducido a promover nuevos tratamientos para enfermedades malignas, expandiendo los linfocitos T *in vitro* antes de transferirlos con IL-2 a los pacientes (GATTINONI y col., Nat Rev Immunol, 6, 383-93, 2006), o identificando su Ag diana que después puedan usarse en vacunas terapéuticas. Se han identificado un gran número de Ag asociados a tumores reconocidos por los CTL, obtenidos de PBL o linfocitos infiltrantes de tumor (TIL). La mayor parte de este trabajo se realizó con tumores de melanoma maligno. Desafortunadamente, los estudios clínicos indican que a pesar de un aumento en la frecuencia de los linfocitos T CD8 dirigidos contra tumor, la eficacia de las vacunas terapéuticas actuales es aún limitada en pacientes de melanoma metastásico (ROSENBERG y col., Nat Med, 10, 909-15, 2004).

10 Los estudios actuales se centran en una mejor comprensión de los mecanismos de las regresiones de tumores raros observados (GERMEAU y col., J Exp Med, 201, 241-8, 2005; LURQUIN y col., J Exp Med, 201, 249-57, 2005), el estado de activación de los linfocitos T CD8 dirigidos contra la vacuna y su capacidad para migrar al sitio de tumor y en la determinación de los mecanismos locales que gobiernan la coexistencia pacífica de linfocitos T específicos de tumor y células tumorales.

15

20 Mucho menos se conoce acerca de la antigenicidad y susceptibilidad al ataque de CTL de tumores pulmonares humanos. La mayor parte de estos tumores son carcinomas pulmonares de células no pequeñas (CPCNP), un gran grupo que incluye carcinomas de células escamosas (CCE), adenocarcinomas (ADC) y carcinomas de células grandes (CCG) carcinomas. El CPCNP puede infiltrarse por linfocitos TCR $\alpha$  /  $\beta$  (ECHCHAKIR y col., Int Immunol, 12, 537-46, 2000). Los Ag diana de linfocitos T identificados incluyen péptidos codificados por el proto-oncogen HER2 / neu (YOSHINO y col., Cancer Res, 54, 3387-90, 1994), que se expresa en exceso en muchos tumores pulmonares, y por varios genes que se descubrió que contenían una mutación puntual en células tumorales en comparación con las células autólogas normales. Estos genes mutados incluyen el factor de elongación 2 (HOGAN y col., Cancer Res, 58, 5144-50, 1998), enzima málica (KARANIKAS y col., Cancer Res, 61, 3718-24, 2001),  $\alpha$ -actinina-4 mutada (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001) y NFYC (TAKENOYAMA y col., Int J Cancer, 118, 1992-7, 2006). Además, se expresan varios genes cancerosos / de línea germinal en el CPCNP (WEYNANTS y col., Int J Cancer, 56, 826-9, 1994; SHICHIJO y col., Int J Cancer, 64, 158-65, 1995; YOSHIMATSU y col., J Surg Oncol, 67, 126-9, 1998; JANG y col., Cancer Res, 61, 7959-63, 2001; GRUNWALD y col., Int J Cancer, 118, 2522-8, 2006), que deben conducir a la presencia de Ag específicos de tumor en la superficie de las células cancerosas. Sin embargo, 25 las respuestas espontáneas a linfocitos T contra Ag de tipo MAGE hasta el momento no se han observado en pacientes de cáncer de pulmón. Por lo tanto, la identificación de nuevos Ag de cáncer de pulmón, en particular los compartidos por tumores de varios pacientes, ayudará en el diseño y control inmunológico de nuevas estrategias de vacunación en el cáncer de pulmón.

30

35 40 La mayor parte de los péptidos antigenicos reconocidos por los linfocitos T CD8 se originan de la degradación en los proteasomas de proteínas intracelulares maduras y su transporte, por el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP), del citosol en el ER (para revisión, véase ROCK & GOLDBERG, Annu Rev Immunol, 17, 739-79, 1999). Los péptidos resultantes de 9 a 10 aa unen moléculas de CMH de clase I (CMH-I) y después se transmiten a la superficie celular. Se ha indicado un número creciente de los epítopos reconocidos por 45 los linfocitos T reactivos con el tumor como resultado de los mecanismos no clásicos que actúan a nivel de transcripción, empalme o translacional (para revisión, véase MAYRAND & GREEN, Immunol Today, 19, 551-6, 1998). Cabe destacar que varios epítopos tumorales se procesan escasamente por las CD, que son únicas en su capacidad de procesar Ag y de cebar linfocitos T CD8, pero que expresan de forma constitutiva inmunoproteasomas (MOREL y col., Immunity, 12, 107-17, 2000; CHAPATTE y col., Cancer Res, 66, 5461-8, 2006).

50

55 Los inventores han identificado un epítopo peptídico reconocido en un carcinoma pulmonar de células no pequeñas humano por un clon de linfocitos T citotóxicos obtenido de linfocitos infiltrantes de tumor autólogos. Descubrieron que este péptido, que está presente por HLA-A2, se obtiene a partir de la región carboxi-terminal del péptido señal de la preprocalcitonina, y se procesa independientemente de los proteasomas y el transportador asociado con el procesamiento de antígenos.

La preprocalcitonina se codifica por el gen CALCA, que también codifica el péptido relacionado con el gen de la  $\alpha$ -calcitonina ( $\alpha$ -CGRP). El gen CALCA incluye 5 intrones y 6 exones y su transcripto de ARN primario muestra un empalme alternativo específico de tumor (JONAS y col., Proc Natl Acad Sci USA, 82, 1994-8, 1985; ROSENFIELD y

col., Nature, 304, 129-35, 1983). Los exones 1, 2, 3 y 4 están unidos para producir el ARNm de la calcitonina en linfocitos C tiroideos, mientras que los exones 1, 2, 3, 5 y 6 forman el ARNm de  $\alpha$ -CGRP en las células neuronales (MORRIS y col., Nature, 308, 746-8, 1984). El  $\alpha$ -CGRP maduro es un péptido endógeno vasodilatador de 37 aa distribuido ampliamente en el cuerpo (ZAIIDI y col., Crit Rev Clin Lab Sci, 28, 109-74, 1990). El ARNm de la calcitonina codifica una proteína precursora de 141 aminoácidos, la preprocalcitonina, que incluye una secuencia señal N-terminal de 25 residuos. La escisión de la secuencia señal da como resultado la procalcitonina, que contiene 116 aa, que comprende una región N-terminal (57 aa), la propia calcitonina (32 aa), y un péptido C-terminal, la catacalcina (21 aa) (ROSENFIELD y col., Nature, 304, 129-35, 1983). La secuencia señal de la preprocalcitonina también está presente en la prohormona del  $\alpha$ -CGRP.

10 La calcitonina es una hormona que participa principalmente en la protección del esqueleto durante períodos de "estrés cárneo", tales como el crecimiento, el embarazo y la lactancia (STEVENSON y col., Lancet, 2, 769-70, 1979; AUSTIN & HEATH, N Engl J Med, 304, 269-78, 1981). También se sabe que la calcitonina se produce a altos niveles por el carcinoma medular tiroideo (CMT) y por algunos carcinomas pulmonares (COOMBES y col., Lancet, 1, 1080-15 3, 1974; MILHAUD y col., Lancet, 1, 462-3, 1974). Los niveles en plasma elevados de calcitonina son marcadores de diagnóstico y pronóstico en estos tumores (COOMBES y col., Lancet, 1, 1080-3, 1974). No se comprende bien la expresión aberrante del gen CALCA en células de cáncer de pulmón, pero se produce en parte de la desmetilación del promotor (BAYLIN y col., Cancer Res, 46, 2917-22, 1986) y la pérdida de represión transcripcional (SYMES y col., FEBS Lett, 306, 229-33, 1992).

20 25 Se ha propuesto el uso de células dendríticas (DC) pulsadas con el polipéptido maduro de calcitonina para la inmunoterapia de CMT (SCHOTT y col., Cancer Immunol Immunother, 51, 663-8, 2002). Sin embargo, hasta ahora no se había sugerido que otras regiones del precursor de la calcitonina pudieran formar parte en la inducción de una respuesta inmune dirigida contra el tumor.

25 En consecuencia, en este documento se describe un péptido inmunogénico aislado que constituye un epítopo T presentado por CMH-I, caracterizado porque consiste en un fragmento de 8 a 11 aminoácidos consecutivos de preprocalcitonina, y más específicamente del péptido señal de los mismos.

30 35 De acuerdo con la invención, dicho péptido consiste en la secuencia (código de una letra) VLLQAGSLHA (SEQ ID NO: 1). Preferiblemente, dicho péptido se selecciona entre un péptido que tiene la secuencia VLLQAGSLHA (SEQ ID NO: 1), y un péptido que tiene la secuencia LVLLQAGSLHA (SEQ ID NO: 2).

Opcionalmente, este péptido puede modificarse adicionalmente con el fin de aumentar su inmunogenicidad, mediante la sustitución de uno o más de los aminoácidos de la secuencia nativa con uno o más aminoácidos favorables a la afinidad para HLA-A2 y / o para la estabilidad del complejo péptido / molécula HLA-A2.

Las sustituciones que hacen posible aumentar la inmunogenicidad de un péptido de la invención son:

40 - la sustitución del aminoácido N-terminal de dicho péptido con una tirosina, como se describe en la solicitud PCT WO 02 / 08716, o (en el caso del péptido SEQ ID NO: 1), con una leucina; y / o  
- la sustitución de la alanina C-terminal del péptido SEQ ID NO: 1 con una valina o una leucina.

Los péptidos modificados particularmente preferidos obtenidos a partir de la SEQ ID NO: 1 son los seleccionados entre el grupo que consiste en YLLQAGSLHV (SEQ ID NO: 10) VLLQAGSLHV (SEQ ID NO: 11), VLLQAGSLHL (SEQ ID NO: 12) y LLLQAGSLHV (SEQ ID NO: 13).

Un objeto de la presente invención son también composiciones que comprenden al menos un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención.

50 Pueden ser composiciones multiepítopos capaces de generar una respuesta CTL poliespecífica, y que, con la misma, también comprenden uno o más epitopos inmunogénicos.

Estos otros epítopos inmunogénicos pueden ser péptidos presentados por CMH, por ejemplo, péptidos inmunogénicos aislados de calcitonina o  $\alpha$ -CGRP o de uno o más antígenos diferentes, a modo de ejemplo, HER2 / neu.

Las composiciones multiepítopo de acuerdo con la invención pueden comprender, de tal forma que puedan usarse ampliamente sobre una población cuyos individuos porten alelos HLA diferentes, epítopos presentados por diversas

moléculas de CMH I. Además, también pueden comprender al menos un epítopo presentado por una molécula de CMH II y capaz de inducir una respuesta T auxiliar.

De acuerdo con una realización preferida de una composición de acuerdo con la invención, comprende al menos un 5 polipéptido quimérico que consiste en una o más copias de un péptido inmunogénico de acuerdo con la invención condensado a un polipéptido heterólogo (es decir, un polipéptido que no es parte del péptido señal de calcitonina).

Por ejemplo, en el caso de una composición multiepítopos, dicha secuencia heteróloga también comprende una o más copias de al menos un epítopo peptídico inmunogénico diferente. Además, puede insertarse un péptido 10 inmunogénico de acuerdo con la invención en adenilato ciclase de Bordetella pertussis(CyA). Ya que el receptor de CyA es el receptor CD 11b y ya que las células dendríticas expresan el receptor CD11b, una construcción de este tipo permite que el péptido inmunogénico se dirija directamente a las células dendríticas. (DADAGLIO y col., Int. Immunol, 15, 1423-1430, 2003)

15 El polipéptido quimérico puede obtenerse fácilmente mediante procedimientos conocidos *per se*, y en particular mediante técnicas de ADN recombinante convencionales.

La presente invención también incluye polinucleótidos que codifican un péptido inmunogénico o un polipéptido quimérico de acuerdo con la invención.

20 Estos polinucleótidos pueden insertarse en un vector de expresión apropiado, con el control transcripcional de un promotor adecuado, con el fin de permitir la expresión del péptido inmunogénico o el polipéptido quimérico en una célula huésped o el organismo. La elección del vector de expresión depende de la célula huésped o el organismo en los que se deseé la expresión. Por ejemplo, para la producción de un polipéptido en bacterias o en vectores 25 eucarióticos se usará respectivamente un promotor bacteriano o un promotor eucariótico. Si se pretende administrar el polinucleótido a un paciente que se va a tratar, uno será preferiblemente plásmidos de ADN desnudo, o vectores que provoquen expresión transitoria, tales como vectores derivados de adenovirus, lentivirus o virus vaccinia.

Las composiciones de la invención también pueden comprender células dendríticas, pulsadas con un péptido, o una 30 composición multiepítopos de la invención, o transformadas con un polinucleótido de la invención, insertadas en un vector de expresión apropiado.

Un objeto de la presente invención es también el uso de un epítopo de péptido inmunogénico, de una composición o de un polinucleótido de acuerdo con la invención, para la obtención de un producto medicinal, y en particular un 35 producto medicinal diseñado para la inmunoterapia dirigida contra tumor, y en particular para el tratamiento de tumores que expresan calcitonina y / o  $\alpha$ -CGRP. Esto incluye en particular carcinomas pulmonares, incluyendo carcinomas pulmonares de células pequeñas, así como carcinomas pulmonares de células no pequeñas y carcinoma medular tiroideo.

40 Los péptidos de la invención pueden usarse en particular para obtener productos medicinales diseñados para el tratamiento de pacientes HLA-A\*0201. La presente invención también incluye los productos medicinales que comprenden, como ingrediente activo, al menos un péptido inmunogénico, una composición o un polinucleótido de acuerdo con la invención. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dichos productos medicinales son vacunas para la terapia dirigida contra tumor. Los productos medicinales de acuerdo con la 45 invención también pueden comprender los excipientes habituales, y también adyuvantes usados convencionalmente en inmunoterapia y que hacen posible, por ejemplo, promover la administración del ingrediente activo, estabilizarla, aumentar su inmunogenicidad, etc. Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen oligodesoxinucleótidos CpG, factor inductor de la apoptosis (AIF), proteína de choque térmico (HSP), receptores similares a Toll (TLR) para activar las células dendríticas inmaduras, y citocinas y quimiocinas, tales como IL-7, IL-12, IL-15 y factor estimulante 50 de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

Con el fin de mejorar adicionalmente la respuesta dirigida contra tumor activada por los péptidos inmunogénicos de la invención, pueden usarse adicionalmente en combinación con otros agentes dirigidos contra tumor.

55 A modo de ejemplos no limitativos, pueden combinarse con:

- quimiocinas, tales como MIP3 $\alpha$  (CCL20) y / o RANTES (CCL5), pueden inyectarse en el sitio del tumor que se va a tratar, con el fin de promover la migración de CTL hacia el tumor;
- agentes citotóxicos que hacen a las células tumorales más sensibles a la inducción apoptótica, y más

particularmente inhibidores de la ruta de señalización iniciada por EGF-R (receptor del factor del crecimiento epidérmico), por ejemplo, proteína de tipo natural p53, quimiocina SDF-1, 1-metiltriptófano (un inhibidor de indoleamina 2-3 dioxygenasa), inhibidores de tirosina cinasas, tales como erlotinib, o anticuerpos contra EGF-R, tales como cetuximab.

5

La presente invención se entenderá más profundamente a partir de la descripción adicional que se indica a continuación, la cual se refiere a los ejemplos no limitantes que ilustran la identificación de un epítopo de preprocalcitonina reconocido por CTL en células de pulmón o de CMT.

#### 10 Leyendas de los dibujos

**Figura 1:** A. Actividad citotóxica del clon Heu161 de CTL hacia células tumorales IGR-Heu, linfocitos B autólogos transformados por el VEB (Heu-EBV) y K562. La actividad citolítica se midió en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  de 4 h convencional realizado por triplicado. Se indican las relaciones E / T.

15 B. Identificación de un clon de ADNc que codifica el Ag reconocido por el clon de CTL. Heu161 se estimuló por células 293-EBNA cotransfectadas con vectores pCEP4 que contenían el clon de ADNc 150 y pcDNA3.1 que contenía una secuencia HLA-A\*0201. Las células estimuladoras de control incluían IGR-Heu, y 293-EBNA transfectadas con ADNc 150 o HLA-A2 en solitario. La concentración del FNT $\beta$  liberada en el medio se midió usando células WEHI-164c113 sensibles al FNT.

20

**Figura 2:** A. Representación de ADNc 150 en comparación con el gen y los transcriptos de la calcitonina y  $\alpha$ -CGRP. Las cajas numeradas representan exones. Las flechas indican los cebadores directos (O) e inversos (R) usados en el análisis por RT-PCR. B. Minigenes usados para identificar la región que codifica el péptido antigénico. Se prepararon una serie de construcciones truncadas y se cotransfectaron en células 293-EBNA con ADNc HLA-A2. Se muestran las secuencias codificadas correspondientes: el fragmento peptídico 1-47 corresponde a la SEQ ID NO: 14, el fragmento peptídico 1-41 corresponde a la SEQ ID NO: 15, el fragmento peptídico 1-35 corresponde a la SEQ ID NO: 16, el fragmento peptídico 1-29 corresponde a la SEQ ID NO: 17, el fragmento peptídico 7-47 corresponde a la SEQ ID NO: 18, el fragmento peptídico 9-47 corresponde a la SEQ ID NO: 19, el fragmento peptídico 12-47 corresponde a la SEQ ID NO: 20, el fragmento peptídico 17-47 corresponde a la SEQ ID NO: 21, el fragmento peptídico 9-38 corresponde a la SEQ ID NO: 22, el fragmento peptídico 9-37 corresponde a la SEQ ID NO: 23. El reconocimiento por el clon Heu161 de CTL se evaluó mediante el ensayo de secreción del FNT $\beta$ .

**Figura 3:** Identificación del péptido antigénico reconocido por el clon Heu161 de CTL. A. Estimulación de CTL con péptidos sintéticos purificados. Los péptidos se cargaron sobre células de melanoma alogénico HLA-A2 $^+$  MZ2-35 MEL.3.1 durante 60 min a temperatura ambiente antes de la adición del clon Heu161 de CTL. La liberación del FNT se midió 16 h más tarde. Los círculos vacíos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 1, los círculos llenos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 2, los cuadrados vacíos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 24, los cuadrados llenos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 25 y los rombos vacíos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 26. B. Actividad lítica del clon de CTL en células pulsadas con péptidos. Se incubaron linfocitos T Heu-EBV marcados con  $^{51}\text{Cr}$  durante 60 min con las concentraciones indicadas de péptidos antes de la adición del clon Heu161 de CTL en una relación E / linfocito T de 10:1. La liberación del cromo se midió después de 4 h. Los círculos vacíos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 1, los círculos llenos representan los resultados obtenidos con el péptido de la SEQ ID NO: 2.

45

**Figura 4:** El procesamiento de la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> peptídica es independiente de los proteasomas y TAP. A. Se incubaron células diana IGR-Heu durante 2 h a 37 °C en presencia o ausencia del inhibidor específico de proteasomas, la epoxomicina, y después se añadieron células Heu161. El clon autólogo Heu127, que reconoció en IGR-Heu un péptido mutado de  $\alpha$ -actinina-4 dependiente de proteasomas, se incluyó como un control positivo. El 50 FNT $\beta$  liberado en el medio después de 24 h de cultivo se midió como se ha indicado anteriormente. B. Las células 293-EBNA se cotransfectaron con pCEP4 que contenía ADNc 150 (panel superior) o ADNc mutado de  $\alpha$ -actinina-4 (panel inferior), con pcDNA3.1 que contenía una construcción HLA-A\*0201, y con diversas cantidades del vector pBj-neo que contenía ADNc de IPC47. Después, se añadieron los clones Heu161 (panel superior) o Heu127 (panel inferior) de CTL. Los controles incluían células 293-EBNA transfectadas con HLA-A2 o pBj-neo-IPC47 en solitario, y 55 la incubación de transfectantes con péptidos de preprocalcitonina o  $\alpha$ -actinina-4. Los datos mostrados son representativos de cuatro experimentos independientes.

**Figura 5:** El procesamiento del péptido antigénico de la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> incluye SP y SPP.

A. Se incubaron células tumorales IGR-Heu durante 2 h a 37 °C con el inhibidor de serina proteasa,

dicloroisocoumarina (DCI) a 250  $\mu$ M, antes de la adición de clones dirigidos contra preprocalcitonina (panel izquierdo) o dirigidos contra  $\alpha$ -actinina-4 (panel derecho) de CTL. **B.** Análisis de expresión de ARNm de SPP mediante análisis por RT-PCR en tiempo real. El ARN total extraído de las células tumorales IGR-Heu, electroporado, o no, con ARNsi dirigido a SPP (ARNsi-S1, ARNsi-S2), se sometió a transcripción inversa y se 5 cuantificó mediante TaqMan como se describe en Materiales y Procedimientos. C. Efecto de la extinción de SPP sobre el reconocimiento de células tumorales. Actividad lítica de clones Heu161 y Heu127 de CTL contra células diana IGR-Heu, electroporado, o no, con ARNsi-S1, ARNsi-S2 o ARNsi de control, determinada por un ensayo de liberación de  $^{51}$ Cr de 4 h convencional en las relaciones E / T indicadas. Se muestran dos experimentos representativos de seis para el clon Heu161 de CTL. **D.** Producción de IFNy por los clones Heu161 y Heu127 de CTL 10 estimulados con células tumorales electroporadas o no con ARNsi-S o ARNsi de control. **E.** El péptido antigenético de la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> se sitúa en el extremo C de la secuencia señal del precursor de la hormona calcitonina. El péptido óptimo reconocido por el clon Heu161 de CTL está en una caja. Las flechas indican los sitios de escisión de la peptidasa señal (SP) y la peptidasa señal del péptido aproximada (SPP). Las regiones n, h y c en el péptido señal de la preprocalcitonina se predijeron usando el software SignalP 3.0.

15 **Figura 6:** **A.** Actividad citotóxica de Heu161 de CTL contra líneas celulares alogénicas de CMT (TT) y CPCP (DMS53). Se incluyeron las células tumorales autólogas IGR-Heu como control positivo. **B.** Reconocimiento de las células DMS53 transfectadas con HLA-A2 por el clon Heu161 de CTL. Las células DMS53 se transfectaron con el vector pcDNA3.1 que contenía HLA-A\*0201 antes de la adición del clon Heu161 de CTL. **c.** Reconocimiento de CD 20 dendríticas que expresan calcitonina. Los monocitos se aislaron de la sangre de un donante sano de HLA-A2 usando lechos magnéticos y se cultivaron durante 6 días en presencia de IL-4 recombinante (100 ng / ml) y GM-CSF (250 ng / ml). Después de la maduración añadiendo 1NF $\alpha$  (20 ng / ml) durante 3 días más, las CD se transfectaron con el clón de ADNc 150 en el vector pCEP4, y la cantidad de FNT $\beta$  liberado por Heu161 se midió 24 h más tarde.

## 25 EJEMPLO 1: MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

### Derivación de la línea celular tumoral de CPCNP y el clón autólogo de CTL

La línea celular de IGR-Heu de CPCNP se obtuvo a partir de una muestra de CCG de Heu de un paciente (HLA-A2, 30 A68, B7, B35, C4, C7) y se mantuvo en el cultivo como se ha indicado previamente (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001). El clón Heu161 se obtuvo a partir de TIL autólogos y se simplificó en placas de microtitulación con forma de V de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) como se describen (ECHCHAKIR y col., Int Immunol, 12, 537-46, 2000).

### 35 Ensayos de citotoxicidad y liberación del FNT $\beta$

La actividad citotóxica se midió mediante un ensayo de liberación de  $^{51}$ Cr de 4 h convencional usando cultivos triplicados en placas de fondo redondo de 96 pocillos. El porcentaje de citotoxicidad específica se calculó de forma convencional; la DT fue de < 5 %. Se usaron líneas celulares de IGR-Heu, Heu-EBV, K562 (obtenidas a partir de un 40 paciente con leucemia mielógena crónica), TT (HLA-A2,1 $^+$  de CMT; ECACC, Salisbury, Reino Unido) y DMS53 (HLA-A2 $^-$  de CPCP; ECACC) como dianas en los ensayos de citotoxicidad.

El FNT $\beta$  se detectó midiendo la citotoxicidad del medio de cultivo en células WEHI-164c13 sensibles al FNT con un ensayo colorimétrico con MTT (ESPEVIK & NISSEN-MEYER, J Immunol Methods, 95, 99-105, 1986).

### 45 Construcción y detección de la biblioteca de ADNc

La biblioteca de ADNc de células tumorales de IGR-Heu se construyó como se ha indicado previamente (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001). En resumen, se extrajo poli(A) $^+$  de ARN de IGR-Heu usando 50 el kit Fastrack (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se convirtió en ADNc con el Superscript Choice System (Gibco BRL) usando un cebador oligo(dT). Después, el ADNc se ligó al plásmido pCEP4 (Invitrogen) como se describe (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001). Los plásmidos recombinantes se electroporaron en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y se seleccionaron con ampicilina. La biblioteca se dividió en agrupaciones de aproximadamente 100 clones de ADNc. Cada agrupación se amplificó y se extrajo el ADN plasmídico usando el kit 55 de plásmido QIAprep8 (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Se cotransfectaron células 293-EBNA (Invitrogen) con ADN plasmídico de cada agrupación de la biblioteca de ADNc y el vector de expresión pcDNA1 / Amp (Invitrogen) que contiene un clón de ADNc HLA-A\*0201 usando el reactivo LipofectAMINE (Life Technologies). Después de 24 h, se añadió el clón Heu161 de CTL (3.000 células / pocillo). Después de 24 h más, la mitad del cultivo se recogió y su

contenido de FNT $\beta$  se midió con las células WEHI-164c13 usando un ensayo colorimétrico con MTT.

#### Análisis de secuencia y localización del exón codificante

- 5 El clon de ADNc 150 se secuenció usando el procedimiento de cadena didesoxi en un secuenciador de ADN automático modelo ABI 310 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Warrington, Gran Bretaña). La búsqueda informática de la homología de secuencia se realizó usando programas disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Los alineamientos de secuencia se realizaron con el software Geneworks® (Intelligenetics, Mountain View, CA). Para identificar la región codificante del péptido antigénico, un panel de fragmentos de ADNc se amplificaron  
 10 10 del clon de ADNc 150 por PCR usando una serie de pares de cebadores. Las condiciones del análisis por PCR fueron 3 min a 94 °C seguido de 30 ciclos que consistían en 1 min a 94 °C, 2 min a 60 °C y 3 min a 72 °C, y una etapa de elongación final de 10 min a 72 °C. Estos productos de PCR se clonaron en el plásmido de expresión pcDNA3.1 usando el kit de clonación Eukaryotic TOPO TA (Invitrogen). Después, las construcciones se subclonaron en el vector de expresión pCEP4 para permitir la expresión en exceso y se construyeron en células 293-EBNA  
 15 15 con el clon de ADNc de HLA-A2.

#### Reactivos químicos e interferencia de ARN

- Para la inhibición de proteasomas y SP, se resuspendieron  $10^6$  de células tumorales en 300  $\mu$ l de medio en  
 20 presencia o ausencia de inhibidores específicos. En resumen, las células se incubaron durante 2 h a 37 °C con epoxomicina o DCI (Sigma, Saint Louis, MI), se lavaron en solución salina tamponada con fosfato y se resuspendieron en 175  $\mu$ l de "tampón de ácido" (una mezcla 1:1 de ácido cítrico 0,263 M y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,132 M a pH 2,5) durante 50 s. Después, las células se neutralizaron mediante la adición de RPMI 1640, se centrifugaron y se incubaron durante 3 h más a 37 °C en presencia o ausencia de inhibidores. Ninguno de los inhibidores era tóxico en  
 25 las concentraciones dadas, como se verificó por tinción azul tripán.

- Para la inhibición de SPP, en primer lugar se probó el inhibidor de cisteína proteasas Z-LL<sub>2</sub> cetona (Calbiochem, Darmstadt, Alemania), que se indicó para bloquear específicamente la actividad de SPP (WEIHOFEN y col., J Biol Chem, 275, 30951-6, 2000). No se obtuvieron resultados concluyentes en los ensayos funcionales. Por lo tanto, se  
 30 usó ARNsi dirigido a SPP humano, ARNsi-S1 (5'-GACAUGCCU-GAAACAAUCAtt-3; SEQ ID NO: 3) y ARNsi-S2 (5'-UGAUUGUUUCAGGCAUGUCtg-3; SEQ ID NO: 4), adquiridos en Ambion (Austin, TX, Estados Unidos). Se usaron ARNsi no dirigidos (Ambion) como control negativo (ARNsi de control). En resumen, se transfecionaron células IGR-Heu por electroporación con ARNsi 50 nM en un Sistema de Electroporación Gene Pulser Xcell (Bio-Rad; 300 V, 500 F) como se ha descrito previamente (LE FLOC'H y col., J Exp Med, 2007) y después se dejaron madurar durante 72  
 35 h.

#### Análisis por RT-PCR

- La extracción del ARN total y la RT se realizaron como se describe (LAZAR y col., J Clin Endocrinol Metab, 84, 40 3228-34, 1999). La amplificación por PCR se realizó con ADN polimerasa TaKaRa Taq (Takara Biomedicals, Shiga, Japón) usando el cebador directo O (5'-gg tgc atg ggc ttc caa aag t; SEQ ID NO: 5) situado en el extremo 5' del marco de lectura abierto (ORF) y el cebador inverso R (5'-atc agc aca ttc aga agc agg a; SEQ ID NO: 6) situado en el extremo 3' del ORF (figura 2A). Las condiciones del análisis por PCR fueron 5 min a 94 °C seguido de 30 ciclos que consistían en 1 min a 94 °C, 2 min a 63 °C y 2 min a 72 °C, y una etapa de elongación final de 10 min a 72 °C. Se  
 45 verificó que en estas condiciones, había un intervalo lineal de amplificación de ADN. La cantidad de ADN amplificado se visualizó con gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

- El análisis por PCR cuantitativa (Taq-man) se realizó usando el cebador directo 5' - atc ttg gtc ctg ttg cag gc (SEQ ID NO: 7) situado en el extremo 5' del exón 2, y el cebador inverso 5'-tgg agc cct ctc tct ctt gct (SEQ ID NO: 8) situado  
 50 en el extremo 3' del exón 3 del gen CALCA. El cebador de la sonda Taq-man fue Fam 5' - cct cct get ggc tgc act ggt g (SEQ ID NO: 9) - 3' Tamra. Los cebadores y las sondas se diseñaron usando el software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) y Oligo 4 (National Biosciences, Plymouth, MN). La cantidad de la muestra de ARN se normalizó mediante la amplificación de un control endógeno (18S). La cuantificación relativa de transcritos se produjo usando el procedimiento de la curva típica (Applied Biosystems User Bulletin 2, Sistema de detección de  
 55 secuencias modelo ABI PRISM 7700). Los cebadores y las sondas de ARN 18S se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones de PCR se realizaron usando la mezcla maestra Taq-man Universal en condiciones convencionales de acuerdo con las instrucciones del fabricante (LAZAR y col., J Clin Endocrinol Metab, 84, 3228-34, 1999).

Para la expresión de ARNm de SPP, se extrajo el ARN total de las células IGR-Heu, transfectado o no con ARNsi-S1 y ARNsi-S2 dirigido a SPP, se transcribió de forma inversa y se cuantificó mediante un análisis de RT-PCR en tiempo real (TaqMan). Los cebadores y las sondas de PCR se diseñaron por Applied Biosystems y se usaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La cantidad de muestra de ARN se normalizó por amplificación de 5 un control endógeno (18S).

#### **EJEMPLO 2: UN CLON DE CTL QUE RECONOCE CÉLULAS AUTÓLOGAS DE CARCINOMA PULMONAR**

El paciente Heu (HLA-A2<sup>+</sup>) es un paciente de cáncer de pulmón actualmente sin enfermedad 11 años después de la 10 resección del tumor primario. La línea celular de CCG de IGR-Heu se obtuvo a partir de un tumor resecado del paciente en 1996. Las células mononucleares que infiltran el tumor primario se aislaron y se estimularon con células tumorales irradiadas de IGR-Heu, linfocitos B autólogos irradiados del VEB y transformados por el VEB e IL-2. Los linfocitos con capacidad de responder se clonaron por dilución limitante y se estimularon con la misma mezcla de tumor y linfocitos B del VEB. Se obtuvieron varios clones de CTL específicos de tumor y se clasificaron en tres 15 grupos en base a su secuencia de TCRV $\beta$  (ECHCHAKIR y col., Int Immunol, 12, 537-46, 2000). Se ha indicado previamente que el primero de los dos grupos de clones (representado por Heu127 y Heu171) reconoció un péptido antígenico codificado por una secuencia mutada en el gen de  $\alpha$ -actinina-4 (ACTN4) (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001; ECHCHAKIR y col., Proc Natl Acad Sci USA, 99, 9358-63, 2002). Aquí se analiza el tercer grupo de clones, incluyendo el clon Heu161, que expresa un reordenamiento de TCR VP3-JP1.2. El clon Heu161 de 20 CTL lisó la línea celular tumoral autóloga, pero no los linfocitos B autólogos del VEB ni las K562 dirigidas a NK (figura 1A). El reconocimiento de IGR-Heu por el clon de CTL se inhibió por mAb MA2.1 dirigido contra HLA-A2 (datos no mostrados).

#### **EJEMPLO 3: IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA EL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL CLON HEU161**

Un biblioteca de ADNc preparada con poli(A)<sup>+</sup> de ARN de células IGR-Heu se clonó en el plásmido de expresión pCEP4 (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001). La biblioteca se dividió en 264 agrupaciones de aproximadamente 100 clones recombinantes, y el ADN se preparó a partir de cada agrupación. Las células 293-30 EBNA se cotransfectaron con ADN de cada agrupación y con una construcción HLA-A\*0201. El clon Heu161 de CTL se añadió a los transfectantes después de 24 h; después de 24 h más, los sobrenadantes se recogieron y su contenido de FNT $\beta$  se midió con células WEHI-164c13 sensibles al FNT (ESPEVIK & NISSEN-MEYER, J Immunol Methods, 95, 99-105, 1986). Una gran proporción (85 / 264) de agrupaciones de ADNc resultó positiva, sugiriendo que una frecuencia sorprendentemente alta de aproximadamente el 0,4 % de clones de ADNc codificó Ag. Una 35 agrupación de ADNc se subclonó y se aisló un clon de ADNc, denominado 150 (figura 1B).

El ADNc 150 tenía 956 pb de longitud y contenía una señal de poliadenilación y una cola de poli(A). Su secuencia correspondía a la del gen CALCA, que codifica tanto la hormona reductora del calcio, la calcitonina, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina  $\alpha$  ( $\alpha$ -CGRP). Un transcripto primario se empalma en calcitonina o ARNm de 40  $\alpha$ -CGRP a través del procesamiento de ARN alternativo específico de tejido (AMARA y col., Nature, 298, 240-4, 1982). El ADNc 150 contiene la secuencia codificante completa de la calcitonina, exones de amplificación 2, 3 y 4 del gen CALCA (figura 2A). Sin embargo, su extremo 5' difiere del extremo de las secuencias de ADNc de calcitonina presentes en los bancos de datos por la presencia de una secuencia de intrones de 213 nucleótidos (datos no mostrados).

45

#### **EJEMPLO 4: IDENTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO ANTIGÉNICO**

La región codificante del péptido antigénico se identificó con fragmentos de ADNc truncado clonado en plásmidos de expresión (véase Materiales y Procedimientos) y se cotransfектó con la construcción HLA-A2 en células 293-EBNA. 50 Como se muestra en la figura 2B, un fragmento que codifica los primeros 41 residuos de preprocalcitonina transfirió la expresión del Ag, mientras que un fragmento que codifica los primeros 35 residuos no lo hizo. Este resultado sugirió que el péptido antigénico se incluyó en una región de amplificación de los residuos 27 a 41 de la proteína. Sin embargo, esta región no contenía ningún motivo de unión a HLA-A2 distinguible, y ninguno de un conjunto de péptidos sintéticos que cubría esta región fue reconocido por el clon de CTL (datos no mostrados).

55

Después, se preparó una serie de fragmentos de ADNc de calcitonina truncados en su extremo 5' y manipulados por ingeniería para contener un codón de iniciación y una secuencia consenso de Kozak. La detección con el clon de CTL indicó que el péptido antigénico estaba contenido en los residuos 9-47 (figura 2B). Un recorte adicional redujo la región codificante peptídica con respecto a los residuos 9-38 (figura 2B). Entre un conjunto de péptidos solapantes

que cubrían esta región, sólo dos se reorganizaron por el clon Heu161 de CTL: VLLQAGSLHA (SED ID NO: 1) y LVLLQAGSLHA (SED ID NO: 2), que eran idénticos, pero con una leucina más en el último péptido. Como se muestra en la figura 3A, ambos péptidos sensibilizaron las células HLA-A2<sup>+</sup> de melanoma para el reconocimiento por Heu161 de CTL, con efectos medio máximo obtenidos con aproximadamente 10 nM de péptido. En un ensayo de lisis, el decámero era ligeramente más eficaz que el péptido de 11-mer por un factor de aproximadamente tres (figura 3B). Se concluyó que el péptido antigenóico óptimo reconocido por el clon Heu161 de CTL era VLLQAGSLHA (SED ID NO: 1) o preprocalcitonina<sub>16-25</sub>. Este péptido corresponde exactamente a la parte C-terminal del péptido señal de preprocalcitonina (LE MOULLEC y col., FEBS Lett, 167, 93-7, 1984).

#### 10 EJEMPLO 5: PROCESAMIENTO DEL PÉPTIDO ANTIGÉNICO

Esta ubicación del péptido en la proteína sugirió que podía procesarse en el ER independientemente de los proteasomas citoplasmáticos y los transportadores TAP. Para examinar la participación de los proteasomas, las células tumorales IGR-Heu se trataron con un inhibidor específico de proteasoma, epoxomicina (figura 4A). Usando 10 µM no se observó ningún efecto en el reconocimiento por el clon Heu161 de CTL dirigido contra preprocalcitonina (figura 4A). Por el contrario, la epoxomicina inhibió en gran medida la estimulación de otro clon autólogo de CTL, Heu127, que reconoce un péptido mutado de  $\alpha$ -actinina-4 (ECHCHAKIR y col., Cancer Res, 61, 4078-83, 2001). Esto era lo que se esperaba, ya que la  $\alpha$ -actinina-4 es una proteína citosólica que se degrada, al menos en parte, en los proteasomas (GOLDBERG & ROCK, Nature, 357, 375-9, 1992). Estos resultados sugieren que el procesamiento 20 de la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> peptídica no requiere actividad proteasómica.

La participación del TAP se ensayó por co-transfacción en construcciones de células 293-EBNA que codifican el péptido antigenólico, HLA-A2, y la proteína inmediata temprana ICP47 del virus herpes simple de tipo 1, que se une a e inhibe el TAP humano (BANKS y col., Virology, 200, 236-45, 1994). Como se muestra en la figura 4B, la co-25 transfectación ICP47 no tuvo ningún efecto detectable en el reconocimiento de los transfectantes por CTL dirigidos contra preprocalcitonina, mientras que se inhibió en gran por el clon de CTL dirigido contra  $\alpha$ -actinina-4. Estos resultados sugieren fuertemente que el procesamiento del epítopo de preprocalcitonina<sub>16-25</sub> es independiente de TAP.

30 Ya que el extremo C del péptido antigenólico VLLQAGSLHA (SED ID NO: 1) correspondía al extremo C de la secuencia señal de la preprocalcitonina (LE MOULLEC y col., FEBS Lett, 167, 93-7, 1984), se esperaba que se generase por la peptidasa señal de tipo I (SP), que separa los péptidos señal de las proteínas secretoras en el lado luminal de la membrana del ER (DALBEY y col., Protein Sci, 6, 1129-38, 1997). La participación del SP se ensayó durante el uso del inhibidor de serina proteasa, dícloroisocoumarina (DCI), que evita la liberación de las secuencias 35 señal de las proteínas precursoras (RUSBRIDGE & BEYNON, FEBS Lett, 268, 133-6, 1990). Notablemente, la preincubación de células tumorales IGR-Heu con DCI las convirtió totalmente resistentes a lisis por el clon de CTL dirigido contra preprocalcitonina (figura 5A). El mismo tratamiento tuvo solamente un efecto moderando en el reconocimiento por el clon de CTL dirigido contra  $\alpha$ -actinina-4 (figura 5A), y esto probablemente se produjo por la disminución de la expresión de moléculas de CMH-I en la superficie de las células tumorales tratadas con DCI (datos 40 no mostrados). Estos resultados son compatibles con la participación del SP en el procesamiento de la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> peptídica.

Después de la escisión por SP, algunas de las secuencias señales insertadas en la membrana del ER en una orientación de tipo II, o similar a un bucle, pueden escindirse adicionalmente por la peptidasa del péptido señal 45 aspártico intramembrana (SPP) (revisado en (MARTOGLIO & DOBBERSTEIN, Trends Cell Biol, 8, 410-5, 1998)). Por lo tanto, se intentó inactivar específicamente la expresión de SPP en células tumorales IGR-Heu con ARN(si) de corta interferencia (véase Materiales y Procedimientos). ARNsi-S1 y ARNsi-S2 inhiben específicamente la expresión de SPP en IGR-Heu tanto en los niveles de ARN (figura 5B) como de proteínas (datos no mostrados). La regulación por disminución de SPP dio como resultado un fuerte descenso en la sensibilidad de las células tumorales a lisis por 50 la anti-preprocalcitonina, pero no por el clon de CTL dirigido contra la  $\alpha$ -actinina-4 (figura 5C). Se observó una inhibición similar cuando se usaron células tumorales para estimular la producción de IFN $\gamma$  por CTL (figura 5D). Conjuntamente, estos resultados indicaron que la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> peptídica se procesó más probablemente por SP y SPP en el ER antes de cargarse en moléculas HLA-A2 (figura 5E).

#### 55 EJEMPLO 6: EXPRESIÓN DEL PRODUCTO DEL GEN DE LA CALCITONINA EN MUESTRAS TUMORALES

La expresión del transcripto de calcitonina se ensayó en un panel de muestras y líneas celulares de carcinoma pulmonar mediante el ensayo por RT-PCR como se describe en Materiales y Procedimientos. Las muestras positivas se seleccionaron por tinción con gel de agarosa con bromuro de etidio. Veintisiete muestras de 209 muestras

tumorales y 5 de 38 líneas celulares fueron positivas (Tabla I).

**Tabla I:** Expresión del transcripto de calcitonina en tumores pulmonares

	Muestras tumorales	Líneas celulares tumorales
<b>Cánceres pulmonares de células no pequeñas</b>		
Cánceres de células escamosas	7 / 122	0 / 3
Adenocarcinomas	10 / 61	0 / 7
Cánceres de células grandes	2 / 8	1 / 5
Cánceres no diferenciados	1 / 3	
Cánceres pulmonares de células pequeñas	3 / 5	4 / 23
Tumores neuroendocrinos	3 / 6	-
<b>Tumores bronquioalveolares</b>	1 / 4	-

5 Después, el análisis de la expresión génica cuantitativa del transcripto de calcitonina se realizó en algunas de las muestras positivas, y los resultados se normalizaron con respecto a ARN 18S (Tabla II). Los niveles de expresión génica de calcitonina en las 3 líneas celulares ensayadas, concretamente IGR-Heu de CCG, DMS53 de CPCP y TT de carcinoma medular tiroideo (CMT), fueron al menos 100 veces mayores que los encontrados en la tiroides humana normal. Cabe destacar que el nivel de expresión observado en las dos líneas celulares de carcinoma de 10 pulmón era similar al observado en la línea celular de CMT (Tabla II). También se detectaron altos niveles de expresión del transcripto de calcitonina en la biopsia tumoral de un paciente Heu (Heu-T) y en varias muestras de carcinoma de pulmón diferentes, tales como ADC 8 y ADC 14 (Tabla II).

**Tabla II:** Expresión relativa del transcripto de calcitonina en líneas celulares tumorales y biopsias

		Tipo histológico	Expresión relativa del transcripto de calcitonina												
<b>Líneas células tumorales</b>															
I	G	R	-	H	e	u	C	C	G	1	9	1	,	3	4
DMS53							CPCP								116,97
TT							CMT								259,57
C	P			C		N		P							
<b>Biopsias tumorales</b>															
1				(Heu-T)			CCG								14,93
2							CCG								0,02
3							CCE								0,28
4							CCE								0,82
5							CCE								0,11
6							CCE								0,17
7							CCE								0,02
8							ADC								19,43
9							ADC								4,86
10							ADC								0,02
11							ADC								0,00
12							ADC								12,82
13							ADC								9,92
14							ADC								29,65
15							ADC								1,00
16							ADC								7,26
17							No diferenciado								7,57
18							No diferenciado								13,64
<b>CPCP</b>															
19							CPCP								0,14
20							Neuroendocrina								2,27
22							Neuroendocrina								0,74
23							Bronquioalveolar								0,02
<b>Tejidos normales</b>															
Agrupación de pulmón humano							Pulmón								0,00
Agrupación de tiroides humana							Tiroides								1,15

A continuación, se quiso verificar que el clon Heu161 de CTL podía también reorganizar otras células HLA-A2<sup>+</sup> que

expresan en exceso el producto del gen de la calcitonina. Como se muestra en la figura 6A, el CTL de Heu161 lisó de forma eficaz la línea celular TT HLA-A2<sup>+</sup> de CMT. Los niveles más débiles de lisis de TT comparados con IGR-Heu no pueden explicarse por diferencias en los niveles de expresión del gen CALCA (Tabla II), pero si por diferencias en la expresión superficial de la molécula de adhesión / co-estimuladora (LE FLOC'H y col., J Exp Med, 5 2007). Como se esperaba, el CTL de Heu161 no lisó las células DMS53 HLA-A2<sup>-</sup> de CPCP, pero reconoció estas células después de la transfección con una construcción HLA-A2 (figura 6B). Finalmente, las CD maduras obtenidas de monocitos sanguíneos de un donante de HLA-A2<sup>+</sup> sano y transfectadas con el clon de ADNc de calcitonina activaron fuertemente el clon Heu161 de CTL (figura 6C). Se concluye de estos resultados que el procesamiento de la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> de péptidos antigenicos se da en todas las células ensayadas, concretamente en CPCNP, 10 así como el células de CPCP, células de CMT, células de melanoma, células 293 embrionarias de riñón y CD. Por lo tanto, parece que todas las células que expresan el transcripto de calcitonina a altos niveles pueden reorganizarse por el clon de CTL descrito aquí.

Aquí, se confirma, usando el análisis por RT-PCR cuantitativa, que el gen CALCA se expresó a altos niveles en 15 varias líneas celulares de CPCNP y CPCP y en biopsias de tumores de pulmón. Cabe destacar que las preprohormonas de calcitonina y α-CGRP comparten sus 75 residuos N-terminales codificados por exones de CALCA 2 y 3, que la preprocalcitonina<sub>16-25</sub> peptídica también es el péptido de prepro-α-CGRP<sub>16-25</sub>. Por lo tanto, es probable que las células que expresan el α-CGRP pero no los transcriptos de calcitonina también puedan 20 reorganizarse por CTL, tales como Heu161. Por esta razón, se usaron cebadores de PCR en los exones 2 y 3, detectando ambos tipos de transcriptos de CALCA. Se observó que las células IGR-Heu también expresaron altos niveles del ARNm de α-CGRP habitual, así como un ARNm empalmado alternativamente correspondiente a los exones 1-3, parte del exón 4 y los exones 5-6, como se describe en las células de CMT (MINVIELLE y col., J Biol Chem, 266, 24627-31, 1991).

## 25 LISTADO DE SECUENCIAS

< 110 > INSTITUT GUSTAVE ROUSSY  
 EL HAGE, Faten  
 STROOBANT, Vincent  
 30 COULIE, Pierre G.  
 MAMI-CHOUAIB, Fathia

< 120 > EPÍTOPOS T DE ANTÍGENOS DE PREPROCALCITONINA

35 < 130 > MJPrmad-F1534 / 9-WO

< 150 > EP 07290777.7  
 < 151 > 2007-06-22

40 < 160 > 26

< 170 > PatentIn version 3.3

< 210 > 1  
 45 < 211 > 10  
 < 212 > PRT  
 < 213 > Homo sapiens

< 400 > 1

Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Gly	Ser	Leu	His	Ala
1									

50 < 210 > 2  
 < 211 > 11  
 < 212 > PRT  
 < 213 > Homo sapiens  
 55 < 400 > 2

	Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala	
1		5
		10
< 210 > 3		
< 211 > 21		
< 212 > ADN		
5 < 213 > Artificial		
< 220 >		
< 223 > ARNsi		
10 < 400 > 3		
gacaugccug aaacaaucat t		21
< 210 > 4		
< 211 > 21		
15 < 212 > ADN		
< 213 > Artificial		
< 220 >		
< 223 > ARNsi		
20 < 400 > 4		
ugauuguuuc aggcauguct g	21	
< 210 > 5		
25 < 211 > 22		
< 212 > ADN		
< 213 > Artificial		
< 220 >		
30 < 223 > cebador PCR		
< 400 > 5		
ggtgtcatgg gcttccaaaa gt	22	
35 < 210 > 6		
< 211 > 22		
< 212 > ADN		
< 213 > Artificial		
40 < 220 >		
< 223 > cebador PCR		
< 400 > 6		
45 atcagcacat tcagaaggcag ga	22	
< 210 > 7		
< 211 > 20		
< 212 > ADN		
< 213 > Artificial		
50 < 220 >		
< 223 > cebador PCR		
< 400 > 7		
55 atctggtcc tgtgcaggc	20	

< 210 > 8  
 < 211 > 21  
 < 212 > ADN  
 < 213 > Artificial  
 5  
 < 220 >  
 < 223 > cebador PCR  
  
 < 400 > 8  
 10 tggagccctc tctctttgc t 21  
  
 < 210 > 9  
 < 211 > 22  
 < 212 > ADN  
 15 < 213 > Artificial  
  
 < 220 >  
 < 223 > cebador PCR  
  
 20 < 400 > 9  
 cctccctgctg gctgcactgg tg 22  
  
 < 210 > 10  
 < 211 > 10  
 25 < 212 > PRT  
 < 213 > Artificial  
  
 < 220 >  
 < 223 > Péptido modificado  
 30 < 400 > 10  
  
 Tyr Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Val  
 1 5 10  
  
 < 210 > 11  
 < 211 > 10  
 35 < 212 > PRT  
 < 213 > Artificial  
  
 < 220 >  
 < 223 > Péptido modificado  
 40 < 400 > 11  
  
 Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Val  
 1 5 10  
  
 < 210 > 12  
 < 211 > 10  
 45 < 212 > PRT  
 < 213 > Artificial  
  
 < 220 >  
 < 223 > Péptido modificado  
 50 < 400 > 12

ES 2 379 209 T3

Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Leu  
1 5 10

<210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> Péptido modificado

10 <400> 13

Leu Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Val  
1 5 10

<210> 14  
<211> 47  
<212> PRT  
15 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Phe Gln Lys Phe Ser Pro Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val  
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu  
20 25 30

Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Asp Glu Ala  
35 40 45

<210> 15  
20 <211> 41  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Gly Phe Gln Lys Phe Ser Pro Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val  
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu  
20 25 30

Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr  
35 40

25 <210> 16  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 16

ES 2 379 209 T3

Met Gly Phe Gln Lys Phe Ser Pro Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val  
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu  
20 25 30

Glu Ser Ser  
35

<210> 17

<211> 29

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

Met Gly Phe Gln Lys Phe Ser Pro Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val  
1 5 10 15

Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala Pro Phe Arg  
20 25

<210> 18

10 <211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Pro Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser  
1 5 10 15

Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp  
20 25 30

Pro Ala Thr Leu Ser Glu Asp Glu Ala  
35 40

15

<210> 19

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 19

Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala  
20 25 30

Thr Leu Ser Glu Asp Glu Ala  
35

<210> 20

<211> 36

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 379 209 T3

< 400 > 20

Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala Pro  
1 5 10 15

Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr Leu Ser  
20 25 30

Glu Asp Glu Ala  
35

< 210 > 21

5 < 211 > 31

< 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

< 400 > 21

Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu  
1 5 10 15

Glu Ser Ser Pro Ala Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Asp Glu Ala  
20 25 30

10

< 210 > 22

< 211 > 30

< 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

15

< 400 > 22

Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala Asp  
20 25 30

< 210 > 23

< 211 > 29

20 < 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

< 400 > 23

Phe Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu Glu Ser Ser Pro Ala  
20 25

25 < 210 > 24

< 211 > 9

< 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

ES 2 379 209 T3

< 400 > 24

Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala  
1 5

< 210 > 25

< 211 > 11

5 < 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

< 400 > 25

Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His Ala Ala  
1 5 10

10 < 210 > 26

< 211 > 9

< 212 > PRT

< 213 > Homo sapiens

15 < 400 > 26

Val Leu Leu Gln Ala Gly Ser Leu His  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Péptido inmunogénico que constituye un epítopo T presentado por CMH I, **caracterizado porque** se selecciona entre:

5

- a) el péptido de secuencia: VLLQAGSLHA (SEQ ID NO: 1)
- b) el péptido de secuencia: LVLLQAGSLHA (SEQ ID NO: 2),
- c) derivados de los mismos que tienen las siguientes sustituciones:

10 - la sustitución del aminoácido N-terminal de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 con una tirosina, o la sustitución de la valina N-terminal de SEQ ID NO: 1, con una leucina; y/o  
 - la sustitución de la alanina C-terminal de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 con una valina o una leucina.

15 2. Péptido inmunogénico de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** se selecciona entre el grupo que consiste en YL-LQAGSLHV (SEQ ID NO: 10), VLLQAGSLHV (SEQ ID NO: 11), VLLQAGSLHL (SEQ ID NO: 12) y LLLQAGSLHV (SEQ ID NO: 13).

20 3. Un polipéptido químérico que consiste en al menos una copia de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, condensado a un polipéptido heterólogo.

4. Polinucleótido que codifica un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un polipéptido químérico de la reivindicación 3.

25 5. Composición que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.

30 6. Composición de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** es una composición multiepítopo que comprende adicionalmente uno o más péptidos inmunogénicos o uno o más polinucleótidos que codifican dicho otro péptido o péptidos inmunogénicos.

35 7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** comprende un polipéptido químérico de la reivindicación 3 que comprende al menos una copia de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 y al menos una copia de otro péptido inmunogénico, o un polinucleótido que codifica dicho polipéptido químérico.

8. Composición que comprende células dendríticas, **caracterizada porque** dichas células dendríticas se pulsan con un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, y opcionalmente con uno o más péptidos inmunogénicos diferentes, o se transforman con un polinucleótido de la reivindicación 4.

40 9. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un polipéptido químérico de la reivindicación 3, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso como un medicamento.

45 10. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un polipéptido químérico de la reivindicación 3, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** dicho medicamento está diseñado para inmunoterapia antitumoral.

50 11. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un polipéptido químérico de la reivindicación 3, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** dicho medicamento está diseñado para la inmunoterapia de tumores que expresan preprocalcitonina y/o α-CGRP.

55 12. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un polipéptido químérico de la reivindicación 3, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, o una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado porque** dicho medicamento está diseñado para el tratamiento de pacientes HLA-A\*0201.

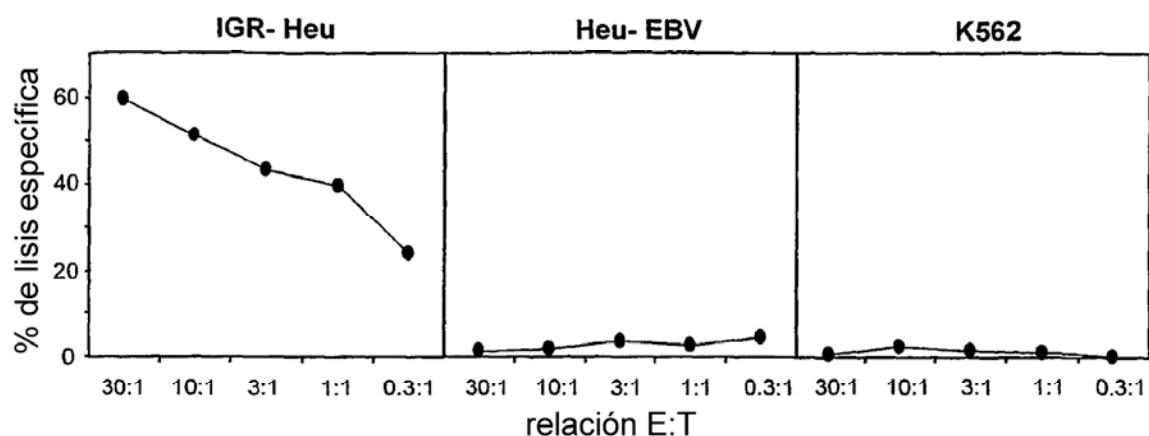
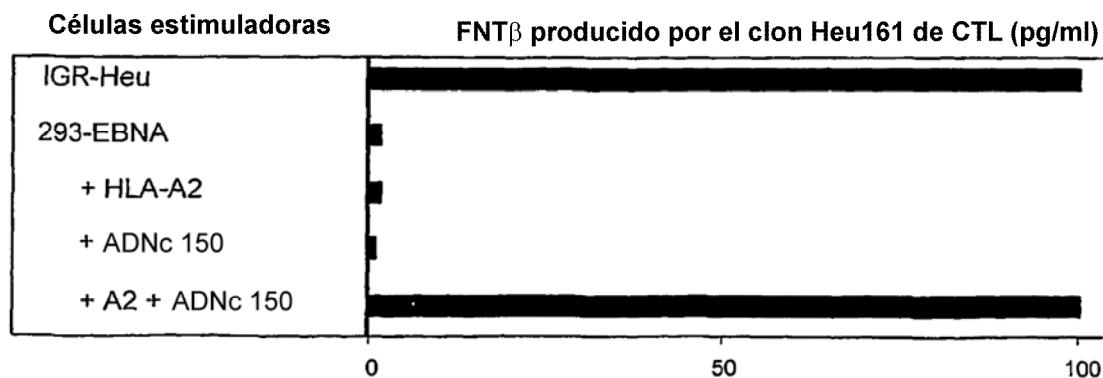
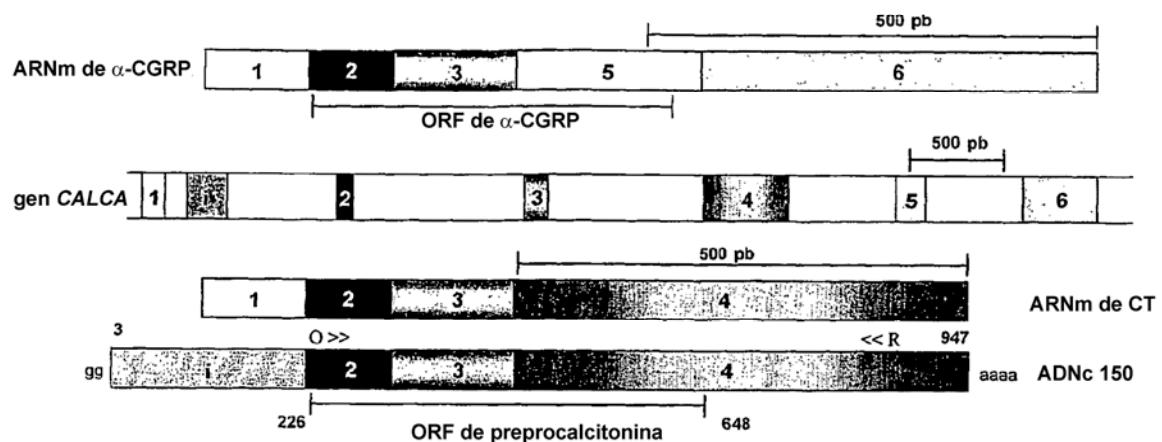
**A****B**

Figura 1

**A****B**

Fragmentos peptídicos	FNT $\beta$ producido por el clon Heu161 (pg/ml)
1-47 MGFQKFSPFLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEA	42
1-41 MGFQKFSPFLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPAT	38
1-35 MGFQKFSPFLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESS	3
1-29 MGFQKFSPFLALSILVLLQAGSLHAAPFR	2
7-47 SPFLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEA	39
9-47 FLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEA	36
12-47 LSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEA	2
17-47 LLQAGSLHAAPFRSALESSPADPATLSEDEA	2
9-38 FLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPAD	38
9-37 FLALSILVLLQAGSLHAAPFRSALESSPA	0

Figura 2

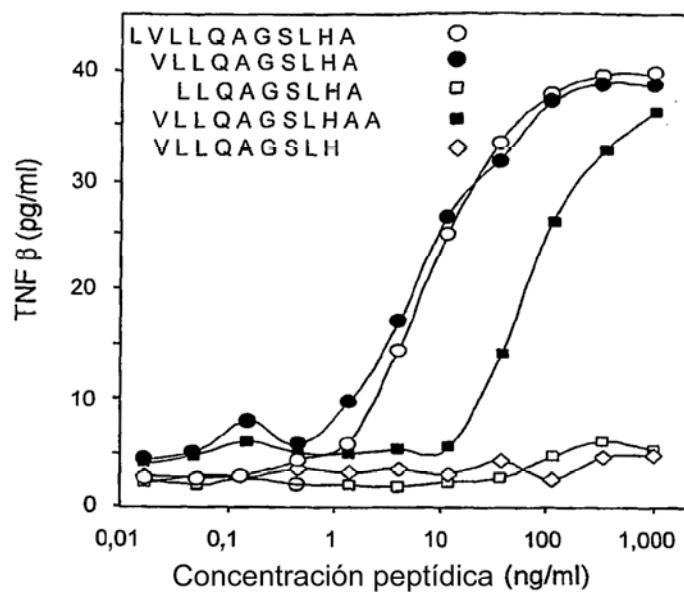
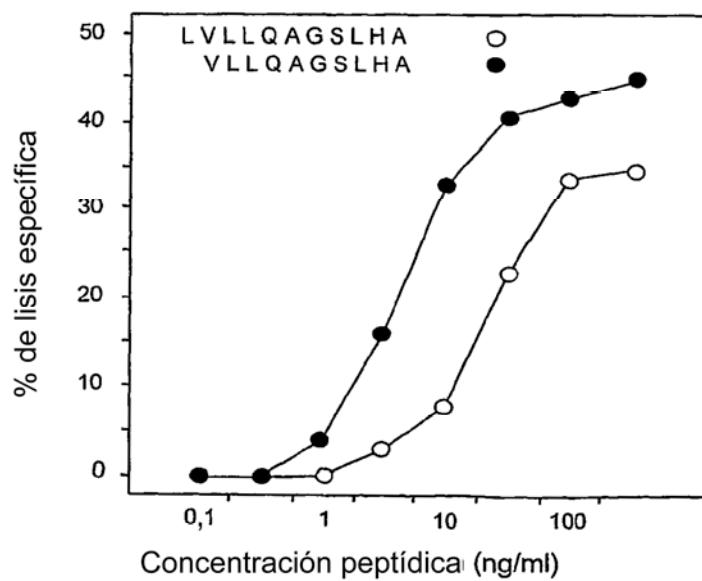
**A****B**

Figura 3

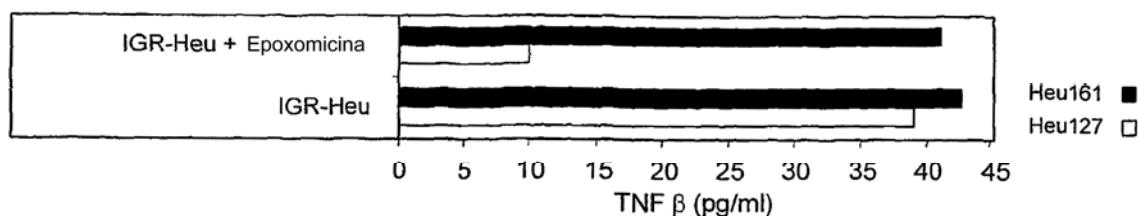
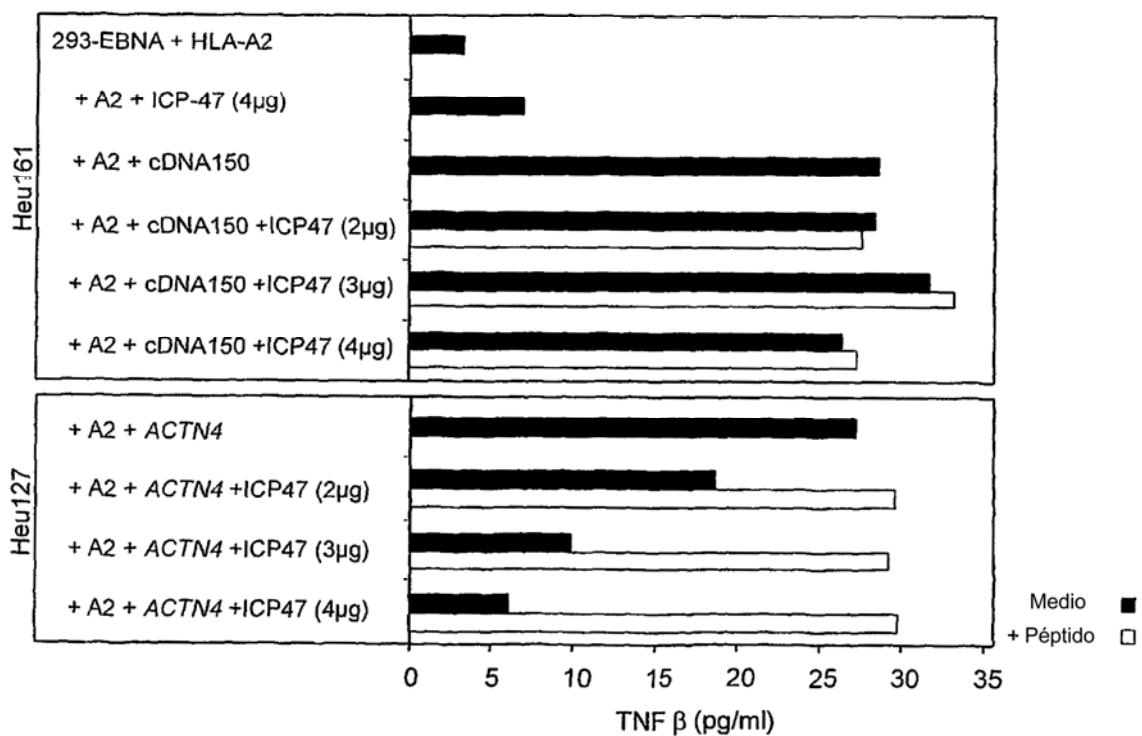
**A****B**

Figura 4

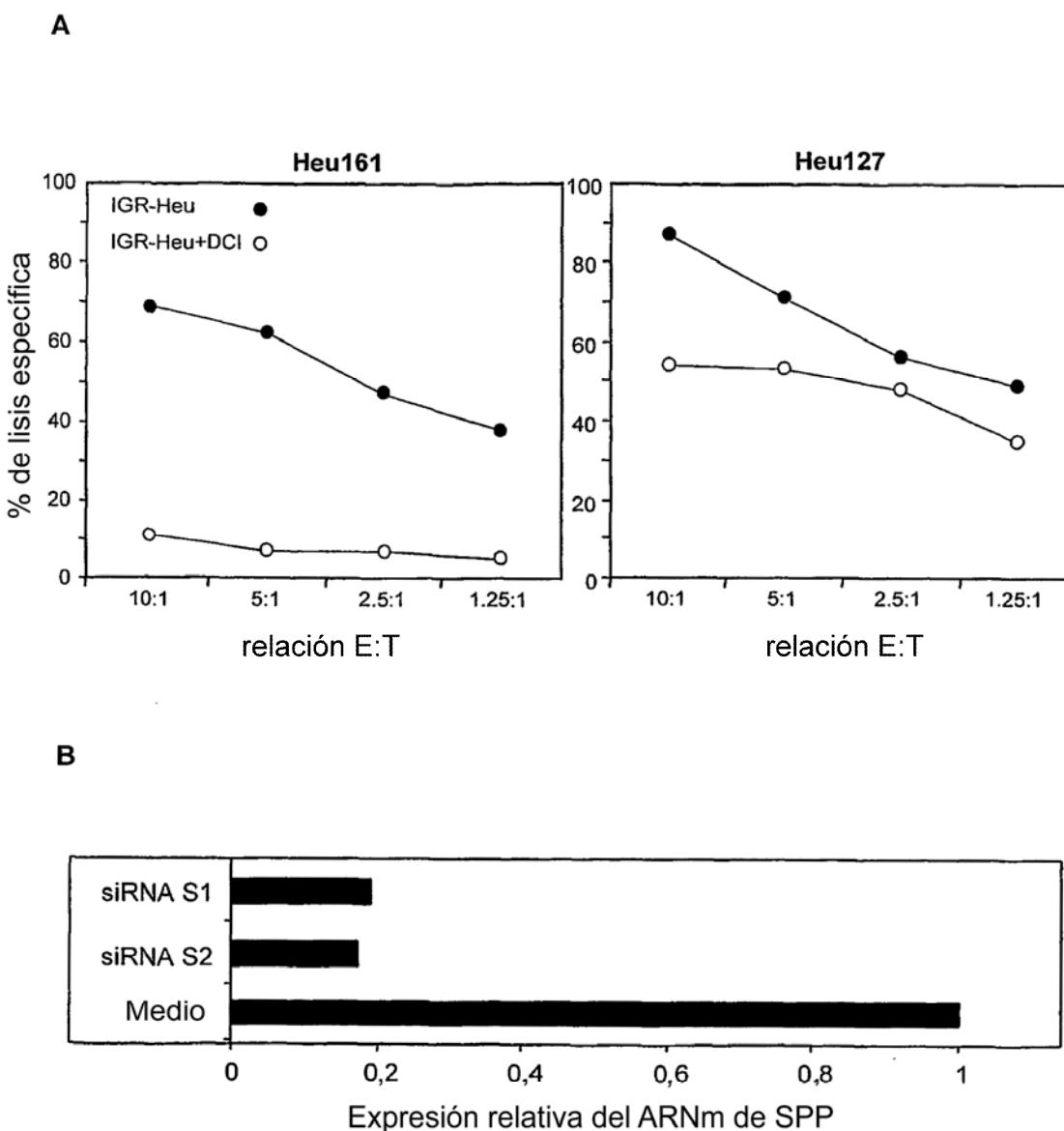


Figura 5

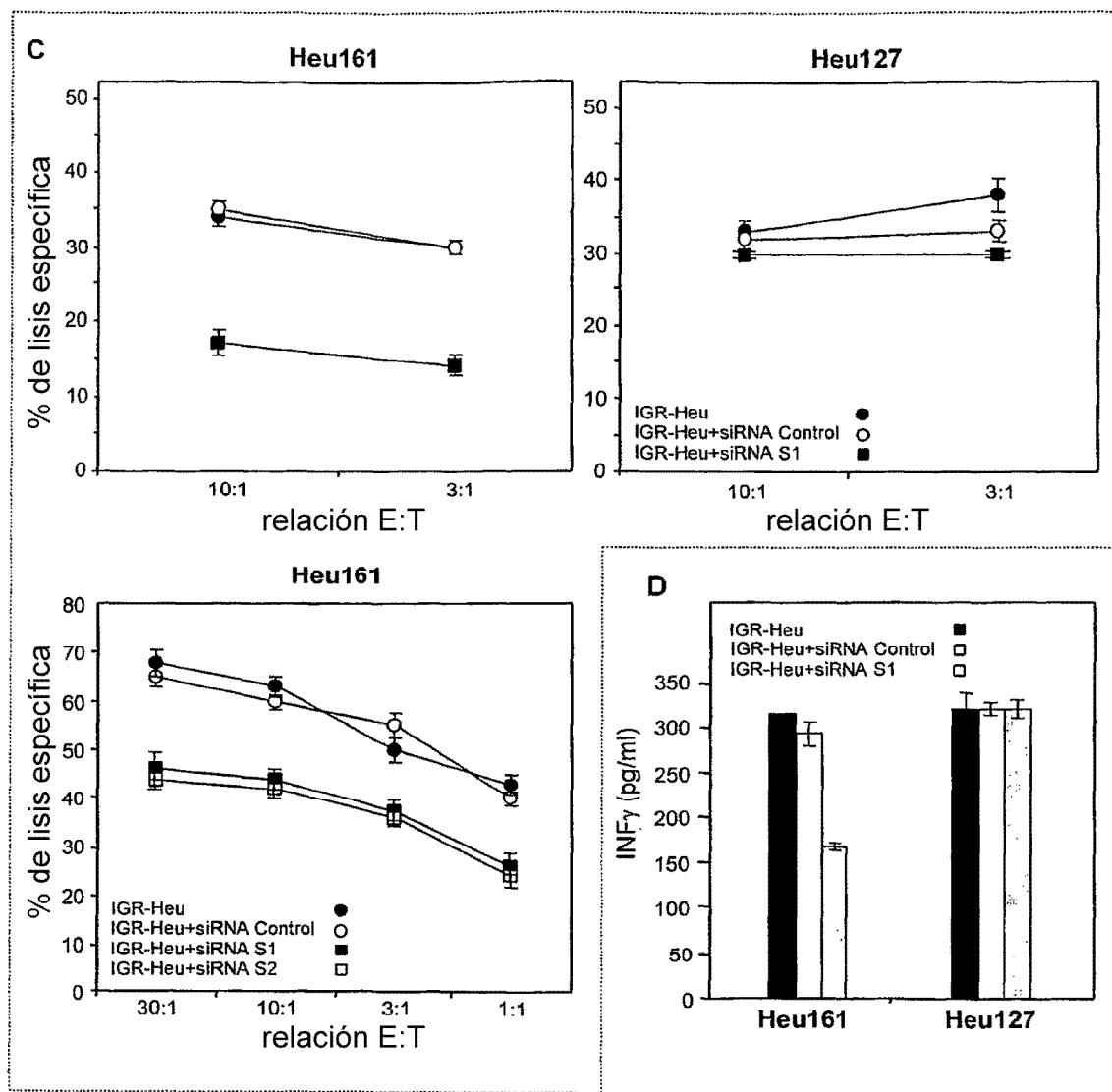
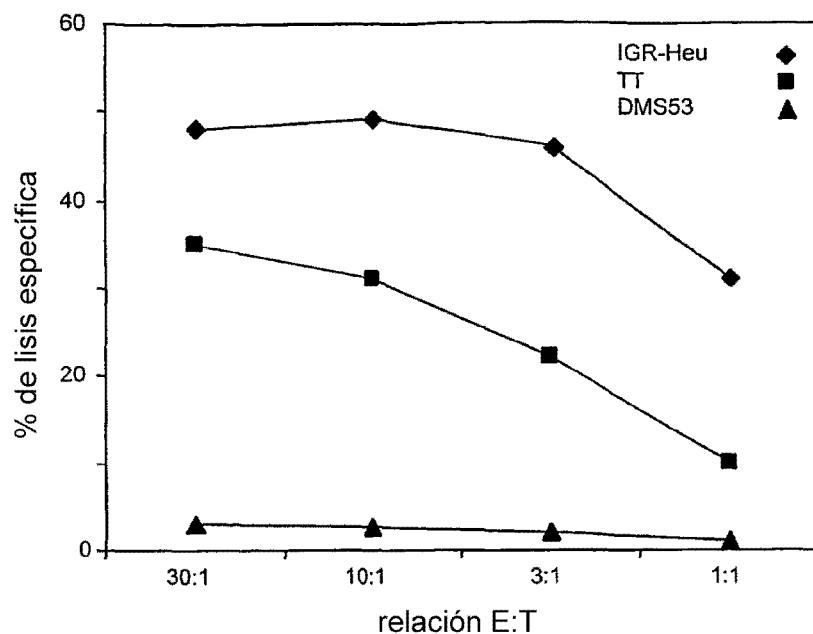
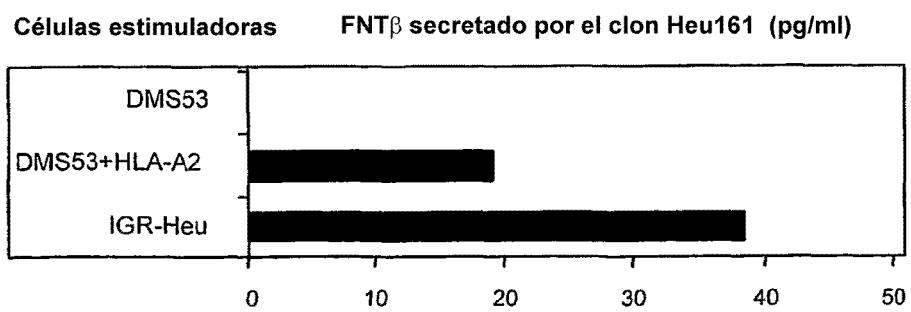


Figura 5 (continuación)

A



B



C

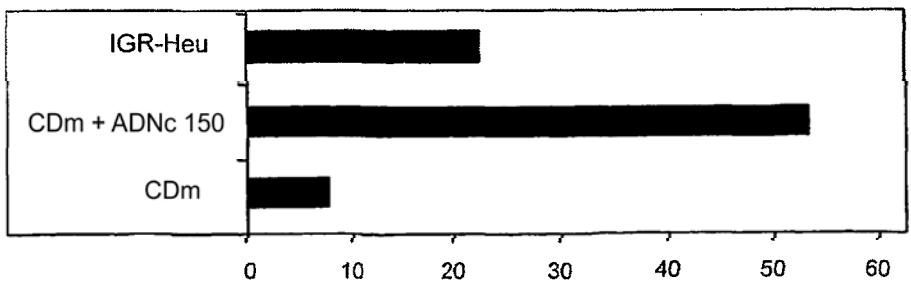


Figura 6