



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 530**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04011673 .3**
86 Fecha de presentación : **22.09.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1447414**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **Péptidos antagonistas del antígeno carcinoembrionario (CEA).**

30 Prioridad: **10.10.1997 US 61589 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**
The National Institute of Health
Office of Technology Transfer
6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, Maryland 20852, US

72 Inventor/es: **Schlom, Jeffrey;**
Salazar née Barzaga, María Elena y
Zaremba, Sam

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 286 530 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

Péptidos antagonistas del antígeno carcinoembrionario (CEA).

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la preparación y utilización de péptidos que pueden actuar como agonistas del antígeno carcino-embriionario humano (CEA). Más específicamente, el péptido agonista según la presente invención se puede utilizar como inmunógeno, ya sea solo, o en protocolos de cebado y refuerzo con otros inmunógenos como rV-CEA, para una variedad de enfermedades neoplásicas. Estas pueden incluir cáncer colorectal, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer de pecho. De este modo, la presente invención también se refiere a la producción y utilización de vacunas contra el cáncer. Los agonistas de péptido según la presente invención se pueden también utilizar para facilitar la propagación de linfocitos T, por ejemplo, para pacientes vacunados, para estudios de transferencia adoptiva.

15 **Antecedentes de la invención**

Un reto principal de la inmunoterapia de cáncer moderna es la identificación de epítomos de linfocitos T citotóxicos (CTL) de antígenos asociados al tumor (TAA) definidos que favorecen la lisis de células tumorales. La mayoría de los antígenos en cánceres humanos no son específicos del tumor y se sobreexpresan en células malignas al contrario que las células de los tejidos normales. Por consiguiente, la inmunidad al cáncer en seres humanos puede quedar mayormente en el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz dirigida principalmente a las auto-moléculas cualitativamente comunes a todos los tipos de células.

El antígeno carcino-embriionario humano (CEA) es una glucoproteína de 180 kD en la mayoría de los tumores de colon, rectales, de estómago y pancreáticos (1), algunos del 50% de los carcinomas de mama (2) y el 70% de los carcinomas de pulmón (3). CEA se expresa también en el tejido del intestino fetal y en menor extensión en el epitelio del colon normal. La inmunogenicidad de CEA ha sido ambigua, describiendo varios estudios la presencia de anticuerpos, anti-CEA en pacientes (4-7), mientras que otros estudios no la han descrito (8-10). CEA se describió en primer lugar como un antígeno fetal específico del cáncer en el adenocarcinoma del aparato digestivo humano en 1965 (Gold, P. y Freeman, S.O. (1965) *Exp. Med.* 121; 439-462). Desde ese momento, CEA se ha caracterizado como un antígeno superficial celular producido en exceso en casi todos los tumores sólidos del aparato gastrointestinal humano. Se ha clonado el gen para la proteína del CEA humano. (Oikawa *et al.* (1987) *Biochim. Biophys. Res.* 142:511.518; Publicación de patente europea n° EP 0346710).

Recientemente, se publicó la primera evidencia de una respuesta de CTL humano a CEA (11; WO 36726271). Este péptido CAP1 presentó el nivel mayor de unión a linfocitos T2 entre los diversos péptidos de CEA probados con estimulación de los linfocitos T resultantes de la generación de líneas de linfocitos T citotóxicos. Se ha identificado un péptido no número, denominado CAP1 (con la secuencia YLSGANLNL) (SEC. ID n°: 1), basándose en la unión a HLA-A2 y en la capacidad para generar CTL específicos de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) de los pacientes de carcinoma inmunizados con un virus de vacuna recombinante que expresa CEA (rV-CEA). Por ejemplo, los linfocitos de la sangre periférica (PBL) de 5 pacientes presentaron síntomas de respuesta a linfocitos T al péptido CAP1 después de la inmunización con rV-CEA. Otros dos laboratorios han generado *in vitro* ya CAP1 específico de CTL empleando péptidos pulsados por células dendríticas como células que presentan antígenos (APC) (12). Recientemente se ha publicado (13) también que CTL específicos de CAP1 se pueden generar a partir de PBMC de pacientes de carcinoma inmunizados con ALVAC-CEA recombinante de viruela aviar. Varios grupos han descrito también la generación de anticuerpos, anti-CEA y respuestas a linfocitos T proliferantes específicos de CEA después de la inmunización con un anti-Id a un anticuerpo monoclonal (Mab) anti-CEA (14), proteína CEA recombinante (15) o rV-CEA (16).

Varios investigadores han introducido CTL en el tumor asociado y antígenos virales por estimulación *in vitro* de PBMC con un péptido inmunodominante. Recientes trabajos con el antígeno de melanoma gp100 (17-19), un péptido de polimerasa de VIH (20) y el antígeno E6 tumoral del virus del papiloma (21) demostraron el aumento de inmunogenicidad después de las modificaciones en las secuencias del péptido. En estos estudios, las sustituciones fueron en posiciones ancladas y se intentó aumentar la unión a antígenos murinos o de MHC humano. Este enfoque estaba basado en una correlación demostrada entre la inmunogenicidad y la afinidad de unión al péptido a las moléculas MHC de clase I (complejo de histocompatibilidad principal) para los epítomos de antígeno vírico (22).

Los investigadores anteriores han trabajado también con fragmentos de CEA. Por lo tanto, Shively (1989), en una publicación de patente europea (EP n° 0343946 A2) describe numerosos fragmentos de CEA que incluyen un epítomo único (definido por su reactividad con un anticuerpo). El último fragmento de CEA es de una longitud de 177 restos de aminoácidos y contiene la secuencia no número de CAP1. Sin embargo, no se describieron ninguno de los fragmentos de CEA más cortos que incluyen la secuencia de CAP1.

En resumen, la utilización de rV-CEA solo como agente para reforzar la respuesta inmunitaria específica para CEA de los pacientes de rV-CEA adolece del inconveniente de estimular una respuesta inmunitaria al virus de la vacuna. Sin embargo, la nueva combinación de rV-CEA y CAP1 sugirió utilizar un "segundo protocolo de generación" para el tratamiento de pacientes de cáncer.

ES 2 286 530 T3

Es un principio aceptado que cuando un péptido inmunógeno se modifica de forma conservadora (p. ej.: se sustituye un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo) el péptido modificado probablemente tenga actividad inmunógena similar basada en el mantenimiento de la forma, carga y carácter hidrófobo de la molécula.

5 De forma más específica, un estudio de Madden (33) ha identificado preferencias de aminoácido específico en péptidos para el acomplejamiento de MHC, una etapa precursora para el reconocimiento de linfocitos T. Madden así como otros investigadores (31) sugieren que las posiciones de los aminoácidos específicos en los péptidos estén disponibles para el reconocimiento de linfocitos T.

10 Skipper *et al.* (40) describe la identificación y caracterización de un epítipo de un péptido natural de tirosinasa, en el que la secuencia del péptido se diferencia de la que se prevé a partir del ADN. Este péptido modificado es reconocido por los linfocitos T citotóxicos humanos (“CTL”) específicos de tirosinasa de modo más eficaz que el producto de traducción directa y es el único de los dos péptidos que está presentado por moléculas HLA-A2.1 en la superficie celular. La modificación es una sustitución de una asparagina con un ácido aspártico. Los autores proponen
15 que la asparagina esté N-glucosilada en el retículo endoplásmico durante la síntesis de la proteína y esté desamidada después de la traducción.

En el caso de CAP1, los anclajes primario y secundario en las posiciones 2, 9 y 1 están ya ocupados por aminoácidos preferidos y por eso se consideró un enfoque diferente para mejorar la inmunogenicidad del péptido intentando
20 aumentar su capacidad para unirse al TCR. Parece que los restos de aminoácido modificadores que se espera que contacten con TCR podrían generar un análogo de CAP1 con sustituciones en posiciones de anclaje distintas de MHC. Dicho análogo debe representar a continuación un agonista potenciador del linfocito T capaz de estimular a CTL de forma más eficaz que el péptido natural. Los resultados anteriores apoyaron el concepto de que algunos análogos de péptidos podrían actuar como agonistas de linfocitos T inhibiendo las respuestas al péptido antigénico (23-29). Dicha
25 inhibición se demostró que era específica de TCR y podría no estar explicada por la competición por la unión del péptido a la proteína MHC. De forma análoga, un agonista potenciador del péptido sería un análogo que aumentaría la función efectora sin acompañar aumentos en la unión a MHC. Se procuró por lo tanto aumentar la inmunogenicidad de CAP1 analizando paneles de análogos que contienen sustituciones de aminoácidos únicas en los restos, se predijo que interactuarían con el receptor de linfocitos T (TCR) de los CTL específicos de CAP1. La presente invención se
30 refiere a la construcción de un nuevo agonista potenciador de linfocitos T para el péptido CAP1, siendo dicho primer ejemplo para un epítipo de CTL humano.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a la identificación de péptidos que son cambios de aminoácido únicos o dobles de la secuencia del péptido CAP-1. Se ha identificado el péptido CAP-1 como un epítipo muy inmunógeno del antígeno carcino-embriionario (denominado en la presente memoria “CEA”), que es capaz de estimular respuestas a linfocitos T citotóxicos específicos de CEA (“CTL”). CEA es un antígeno de la superficie celular que se encuentra en abundancia en varios tipos de células cancerosas. Por lo tanto, los péptidos de CEA capaces de estimular una respuesta a CTL
40 citotóxicos, tal como CAP-1 son inmunógenos potenciales para su utilización en la inmunoterapia del cáncer.

Los péptidos de la presente invención son agonistas de CAP-1 y CEA; esto es, facilitan la interacción entre el complejo con MHC de la célula que presenta al antígeno y el complejo del receptor de linfocito T (“TCR”) de los linfocitos T. Por lo tanto, estos péptidos pueden servir como inmunógenos para tratar y/o vacunar pacientes con cánceres que
45 expresen a CEA. Además, estos péptidos se pueden utilizar para estimular linfocitos T en cultivos para la transferencia adoptiva de linfocitos C a pacientes de cáncer. Cuatro de dichos péptidos tienen secuencias de aminoácido:

(1) YLSGADLNL (Agonista CAP1-6D) (SEC. ID n°: 2)

50 (2) YLSGADINL (Agonista CAP1-6D, 7I) (SEC. ID n°: 3)

(3) YLSGANINL (Agonista CAP1-7I) (SEC. ID n°: 4); y

(4) YLSGACLNL (Agonista CAP1-6C) (SEC. ID n°: 5)

55 Los aminoácidos subrayados identifican los cambios de aminoácido de la secuencia del péptido CAP-1. Los péptidos CAP1-6D y CAP1-6D, 7I son péptidos preferidos especialmente según la presente invención y presentan aumento de actividad en comparación con la actividad de CAP-1. Los péptidos CAP1-7I y CAP1-6C presentan actividad similar a CAP-1.

60 La presente invención abarca kits que comprenden un péptido agonista y un vector que comprende un gen que codifica CEA o una proteína CEA producida de forma recombinante. Además, el kit puede incluir una molécula inmunoestimulante.

Otro objetivo de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos ago-
65 nistas solos o en combinación con una molécula inmunoestimulante y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de estos péptidos en la inmunoterapia del cáncer. Los péptidos agonistas son útiles para estimular una respuesta inmunitaria citotóxica a CEA, produciendo la reducción

y/o prevención del tumor. Por consiguiente, la presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para tratar pacientes con cáncer con los péptidos así como con una vacuna contra el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

5 Figura 1A-1D: *Efecto de las sustituciones de un solo aminoácido en el péptido CAP1 de CEA en la lisis por CEA CTL T-Vac8.* Se marcaron células C1R-A2 con ^{111}In y se incubaron durante 1 hora en pocillos de fondo redondo (2.000/pocillo) con cada péptido sustituido en 1 (sólido). Se añadió 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (blanco) y 0,01 (rayado) de CTL de T-Vac8 a razón de E:T=1,45:1 y se midió el isótopo liberado después de 4 horas. Se determinó la liberación espontánea para cada péptido a 1 $\mu\text{g/ml}$. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Las Figuras 1A-1D representan sustituciones en las posiciones p5 a p8, respectivamente. Los aminoácidos se denominan por el código de una sola letra; el aminoácido que codifica la secuencia de CAP1 natural está indicado en cada figura y a lo largo del margen derecho.

15 Figura 2A y 2B: *CAP1 y los análogos presentan sensibilidad diferente a la citotoxicidad de CEA CTL T-Vac8.* Se marcaron las células diana T2 de la Figura 2A y C1R-A2 de la Figura 2B con ^{51}Cr y se incubaron en placas de 96 pocillos con fondo redondo (10.000/pocillo) con CAP1 (●) o péptidos CAP1-6D (□) o CAP1-7I (◇) sustituidos en las concentraciones indicadas. Después de 1 hora, se añadieron CTL de T-Vac8 a razón de E:T=2,5:1 y se determinó la liberación de isótopos después de 4 horas. Todos los análisis se hicieron por triplicado. NCA571 (Δ) es un péptido no número obtenido después de la alineación óptima de CEA con el gen NCA (11) relacionado.

20 Figura 3A y 3B: *Efecto de las sustituciones de un solo aminoácido en el péptido CAP1 en la unión a y en la estabilidad de complejos de HLA-A2.* Se recogieron linfocitos T2 en medio exento de suero, a continuación se incubaron (10^6 por pocillo) con péptidos CAP1 (●), CAP1-6D (□) o CAP1-7I (◇) a las concentraciones indicadas (Figura 3A). Se recogieron las células y se determinó la expresión de la superficie celular de las moléculas HLA-A2 por coloración con BB7.2 de MAb con conformación sensible, anticuerpo WG/32 específico de HLA de anticuerpo específico a HLA (no mostrado) y MOPC-195 de Ab de referencia del isótopo (no mostrado). Se determinó la intensidad fluorescente media en una población viva, activada de células.

25 Figura 3B: Se incubaron células con péptido a razón de 100 $\mu\text{g/ml}$ toda la noche, se lavaron a continuación sin péptido no unido y se incubaron a 37°C. A los tiempos indicados se colorearon las células para la presencia de complejos péptido-HLA-A2 de la superficie celular. Las barras de error indican SEM para dos experimentos.

30 Figura 4A y 4B: *CTL generado a partir de individuos aparentemente sanos con péptido CAP1-6D que reconoce CAP1 y CAP1-6D.* Se generaron líneas de CTL (denominadas T-N1 y T-N2) con CAP1-6D y se analizó la especificidad del péptido. Se analizó T-N1 después de 5 ciclos de estimulación en una proporción de efector a diana de 20:1 (Figura 4A). Se analizó T-N2 después de 10 ciclos en una proporción de efector a diana de 15:1 (Figura 4B). Se incubaron dianas de C1R-A2 marcadas con ^{51}Cr con la cantidad indicada de péptido CAP1 (●) o CAP1-6D (□). Después de 4 horas se determinó la cantidad de liberación de isótopo con un contador gamma. Se determinaron los valores de los cultivos por triplicado.

35 Figura 5A y 5B: *CAP1-6D, pero no CAP1 generados con líneas de linfocitos T de donantes aparentemente sanos reconocen células tumorales que expresan CEA endógeno.* CAP1-6D generadas con CTL de T-N2 (Figura 5A) y linfocitos T generados con CAP1 natural (Figura 5B) se analizaron después de 9 ciclos de estimulación *in vitro* frente a dianas tumorales SW480 y SW1463 (CEA⁺, HLA-A2⁺, ● y ▲ respectivamente), Skmel24 (CEA⁻, -A2⁺, □) y K562 (◇). Se cultivaron células tumorales durante 72 horas en presencia de γ -IFN para regular HLA. Las células se trataron con tripsina y se marcaron con ^{51}Cr y se incubaron (5.000 células/pocillo) con CTL de T-N2 en proporciones cada vez mayores de efector a diana. Se incubaron los cultivos durante 4 horas y se determinó la liberación de la cantidad de isótopo en un contador γ . Se determinaron los valores de los cultivos por triplicado.

40 Figura 6: *Restricción de A2.1 de MHC de clase I de la línea CTL (T-N2) procedente del agonista CAP1-6D.* Se utilizó T-N2 de la línea CTL como efector para la célula diana SW837 del carcinoma de colon humano. SW837 es positivo para CEA y negativo para HLA-A2.1. Se infectaron SW837 a una MOI de 10:1 con una vacuna recombinante que contiene el transgén de A2.1 (■) o vacuna natural (Δ).

45 Figura 7A y 7B: *CTL generados con CAP1-6D lisan CEA positivos, tumores positivos a HLA-A2: Efecto de la regulación por aumento de IFN.* Se analizaron los CTL de T-N1 generados con CAP1-6D frente a varias líneas celulares tumorales: SW480 (CEA⁺ y HLA-A2⁺ ●), SW1116 (CEA⁺ menos -A2⁻, □) y CaOV3 (CEA⁻ menos -A2⁺, ◇). Se cultivaron células tumorales 72 horas en ausencia (Figura 7A) o presencia (Figura 7B) de γ -IFN, tratada con tripsina y se marcaron con ^{51}Cr , se incubaron (5.000 células/pocillo) a continuación con CTL de T-N1 a proporciones cada vez mayores de efector a diana. Se incubaron los cultivos durante 4 horas y se determinó la cantidad de liberación de isótopo en un contador gamma. Se determinaron los valores de los cultivos por triplicado.

Descripción detallada de la invención

50 La invención consiste en un agonista del péptido del epítipo CEA natural, CAP-1 (SEC. ID n°: 1). El agonista está caracterizado por su capacidad para producir linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno que inhiben el crecimiento o destruyen las células de carcinomas que expresan los CEA o los epítipos de CEA.

ES 2 286 530 T3

Los agonistas de péptido de la presente invención comprenden aproximadamente de 8 a 10 aminoácidos, preferentemente de 9 a 10 aminoácidos. En una forma de realización, el agonista comprende una secuencia con una sustitución en la posición 6 comparada con el CAP-1 natural (SEC. ID. n°: 1). En otra forma de realización el agonista comprende una secuencia con una sustitución de aminoácido en la posición 7 comparada con el CAP-1 natural (SEC. ID. n°: 1). Todavía en otra forma de realización, el agonista comprende una secuencia con una sustitución de aminoácido en la posición 6 y en la posición 7 comparada con el CAP-1 natural. El aminoácido sustituido resulta útil para mejorar la interacción del complejo de TCR en los linfocitos T citotóxicos con el complejo ligando antígeno MHC-péptido. Dichas interacciones mejoradas resultan en una función efectora superior por los linfocitos T citotóxicos.

Un ejemplo de una sustitución comprende Asp y Cys en la posición 6 o Ile en la posición 7.

En una forma de realización, el agonista de péptido comprende la secuencia de aminoácido siguiente:

<u>Posición del aminoácido</u>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Péptido CAP-1 natural	Y	L	S	G	A	N	L	N	L
Agonista	Y	L	S	G	A	<u>D</u>	L	N	L
Agonista	Y	L	S	G	A	<u>D</u>	<u>I</u>	N	L
Agonista	Y	L	S	G	A	N	<u>L</u>	N	L
Antagonista	Y	L	S	G	A	<u>C</u>	L	N	L

El péptido agonista de la presente invención se puede obtener por tecnología de ADN recombinante o por síntesis química del péptido.

El péptido agonista se puede formular en una composición farmacéutica en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable para su utilización como inmunógeno en un mamífero, preferentemente un ser humano. La composición puede comprender además uno o más de otros constituyentes para aumentar la respuesta inmunitaria que incluye, pero no se limita a moléculas inmunoestimulantes, tales como interleucina 2, interleucina 6, interleucina 12, interferón gamma, factor alfa de la necrosis tumoral, GM-CSF, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD72 y ciclofosfamida.

El péptido agonista se administra a un mamífero en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria específica de CEA, preferentemente una respuesta inmunitaria celular. La eficacia del péptido *ras mutante* como inmunógeno se puede determinar mediante parámetros *in vivo* o *in vitro* como es sabido en esta técnica. Estos parámetros incluyen, pero no se limitan a ensayos de citotoxicidad específica, regresión de tumores que expresan CEA o epítomos de CEA, inhibición de células cancerosas que expresan CEA o epítomos de CEA, producción de citocinas y similares.

Al menos uno o más péptidos agonistas se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg por vacunación del mamífero, preferentemente aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por vacunación. Se pueden proporcionar varias dosis durante un periodo de semanas tal como se indica. En una forma de realización se proporciona una dosis cada mes durante 3 meses. El péptido agonista se puede administrar solo o en combinación con adyuvantes, incorporados en liposomas (patentes U.S. n° 5.643.999; n° 5.464.630; n° 5.059.421; n° 4.885.172), con citocinas, modificadores de respuesta biológica u otros reactivos en la técnica que se conocen porque aumentan la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a Detox™ de RIBI, QS21, alumbre y adyuvante incompleto de Freund. En una forma de realización, el péptido agonista se administra en combinación con Detox™ (RIBI Immunochem Research, Hamilton, MT). Detox™ de RIBI contiene como ingredientes activos el esqueleto de la pared celular de *Mycobacterium phlei* y el monofosforil lípido A de *Salmonella minnesota* R595 preparado como una emulsión de aceite en agua con escualeno y Tween 80.

Los péptidos agonista se pueden también conjugar con péptidos cooperadores o con moléculas portadoras grandes para aumentar la inmunogenicidad del péptido. Estas moléculas incluyen, pero no se limitan al péptido de la gripe, a la vacuna del tétanos, al epítomo CD4 de la vacuna del tétanos, a la exotoxina A de *Pseudomonas*, poli-L-lisina, una cola de lípido, la secuencia con señal del retículo endoplásmico (ER) y similares.

Los péptidos de la presente invención se pueden también conjugar con una molécula de inmunoglobina utilizando los procedimientos aceptados en la técnica. La molécula de inmunoglobina puede ser específica para un receptor superficial presente en las células tumorales, pero ausente o en cantidades muy bajas en las células normales. La inmunoglobina puede ser también específica de un tejido específico. Dicho conjugado péptido-inmunoglobina permite el direccionamiento del péptido a un tejido y/o célula específico.

Otra forma eficaz de péptido agonista para generar una respuesta inmunitaria específica del péptido en un mamífero es una célula que presenta el antígeno pulsado por el péptido agonista. Las células que presentan el antígeno incluyen, pero no se limitan a células dendríticas, linfocitos B, monocitos, macrófagos y similares. En una forma de realización preferida, la célula que presenta el agonista pulsado por el péptido agonista es una célula dendrítica.

Los CEA y los linfocitos T citotóxicos específicos del péptido agonista pueden ser generados *in vivo* o *in vitro* por estimulación de linfocitos de una fuente con una cantidad eficaz de un agonista solo o en combinación con la molécula

ES 2 286 530 T3

inmunoestimulante y/o adyuvante o en una formulación de liposomas. Las fuentes de linfocitos incluyen, pero no se limitan a la sangre periférica, tejidos tumorales, ganglios linfáticos y derrames, tales como de fluido pleural o fluido ascítico y similares.

5 Los CEA y los linfocitos T citotóxicos específicos del péptido agonista son inmunorreactivos con agonista o péptido de CEA. Los linfocitos T citotóxicos inhiben la aparición de células tumorales y de cáncer e inhiben el desarrollo o destruyen las células tumorales que expresan CEA o los epítomos de las mismas o las células tumorales que expresan agonistas. Los linfocitos T citotóxicos, además de ser específicos para el antígeno, son MHC de clase I restringidos. En una forma de realización los linfocitos T citotóxicos son HLA-A2 de MHC de clase I restringidos. Los linfocitos
10 T citotóxicos presentan un fenotipo CD8⁺.

Los pacientes seleccionados con células de carcinoma que expresan CEA o epítomos de CEA son vacunados por vía subcutánea hasta tres veces a intervalos mensuales con adyuvante DETOXTM mezclado con el agonista del péptido apropiado, pueden ser también pacientes de carcinoma vacunados con células mononucleares de sangre periférica
15 autólogas pulsadas previamente *ex vivo* con un agonista del péptido solo o en combinación con un agonista del péptido. Las respuestas de los linfocitos T anti-CEA se evalúan por medición por ensayos de proliferación.

La vacunación con péptidos agonistas de CEA de la presente invención provoca respuestas inmunitarias celulares anti-CEA muy específicas y generalizadas. Además, el desarrollo de dichos péptidos agonistas restringidos de MHC de clase I tiene importantes implicaciones para ambas inmunoterapias activa (es decir, vacunación) y pasiva (es decir, propagación *ex vivo* para la transferencia celular adoptiva), que se pueden utilizar para la producción y propagación de respuestas de CTL con CD8⁺ específicas en los pacientes con cáncer.

Los pacientes con tumores sólidos que expresan CEA o sus epítomos, incluyendo pero sin limitarse al cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de tiroides, melanoma, cáncer oral, cáncer de laringe, seminoma, cáncer hepatocelular, cáncer de las vías biliares, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma basocelular, carcinoma escamoso, cáncer de próstata y similares se benefician de la inmunización con los péptidos agonistas. Los pacientes susceptibles al tratamiento que utilizan los péptido agonistas de la presente invención son aquellos pacientes que tienen tumores con CEA o epítomos de CEA.
25

Los péptidos se pueden sintetizar químicamente en condiciones GMP y purificar por HPLC hasta una pureza >95% y liofilizar. Las composiciones farmacéuticas se formulan redisolviendo el péptido con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como cloruro sódico. En un ejemplo, cada mililitro de solución contiene 150 µg de un péptido agonista más 9,0 mg de cloruro sódico.
30

35 Cuando el péptido agonista se administra con un adyuvante es deseable mezclar el péptido con el adyuvante momentos antes de la administración al paciente.

El péptido agonista se puede administrar a un paciente por varias vías incluyendo pero sin limitarse a subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa o similares. En una forma de realización el péptido agonista se administra por vía subcutánea. El péptido se puede administrar en una o más zonas al paciente. En una forma de realización, el péptido, solo o en combinación con un adyuvante, se administra en tres zonas por vía subcutánea, sobre el deltoides, los fémures y el abdomen.
40

En otro procedimiento para generar una respuesta inmunitaria, las células que presentan el antígeno pulsado por el péptido agonista son administradas al paciente en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria específica del antígeno. Las células que presentan el antígeno incluyen pero no se limitan a las células dendríticas, linfocitos B, monocitos, macrófagos y similares. En una forma de realización, las células dendríticas se aíslan de un paciente por los procedimientos descritos en Romani, N. *et al.* (1994). Las células dendríticas se cultivan *in vitro* con un péptido agonista durante un período de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 horas y se lavan para eliminar el péptido no ligado. Las células dendríticas pulsadas por el péptido agonista se vuelven a transferir al paciente a una concentración de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10⁹ células dendríticas. Dicha concentración es eficaz para generar una respuesta inmunitaria en el paciente que incluye la generación de linfocitos T citotóxicos específicos del péptido agonista que son capaces de inhibir el crecimiento o destruir las células tumorales.
45
50
55

Los criterios para determinar una respuesta antitumoral en el paciente inmunizado son los siguientes:

1. Remisión completa (CR): Desaparición completa de todos los indicios de tumor y retorno de las pruebas anormales a los niveles normales durante un mínimo de 4 semanas.
60

2. Respuesta parcial (PR): Disminución de al menos el 50% de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones medidas en ausencia de avance de cualquier lesión o de la aparición de cualquier lesión nueva durante al menos 4 semanas.

65 3. Enfermedad estable (SD): Cambio mensurable en la enfermedad demasiado pequeño para reunir los requisitos de la respuesta o el avance parcial y la aparición de ninguna nueva lesión durante un periodo de al menos 12 semanas. Puede ser que no empeoren los síntomas.

ES 2 286 530 T3

4. Enfermedad evolutiva (PD) o recaída: Para considerar la enfermedad evolutiva se deben reunir alguno de los siguientes criterios:

Desarrollo de algún área nueva de enfermedad maligna (mensurable o palpable),

Enfermedad (>25%) en cualquier área de pretratamiento de la enfermedad maligna mensurable.

La respuesta inmunológica a la inmunización con los péptidos agonistas se evalúa por el ensayo de proliferación de linfocitos T *in vitro* y/o mediante el ensayo de linfocitos T citotóxicos *in vitro* antes y después de la vacunación.

La presente invención permite la inmunización *in vitro* para la proliferación de linfocitos T y la generación de líneas de linfocitos T citotóxicos para el péptido agonista específico del tumor. El cultivo *in vitro* de los linfocitos T específicos para el péptido procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tejido de ganglio linfático (LNT), o linfocitos infiltradores del tumor (TIL) con péptido agonista e IL-2 genera CEA y linfocitos T específicos del péptido agonista. Se determina la citotoxicidad de estos linfocitos T frente a APC (linfocitos B transformados por EBV autólogos o células tumorales autólogas) cebados con péptido agonista como se ha descrito en la presente memoria. Los clones de linfocitos T generados se caracterizan fenotípicamente por citometría de flujo para expresar CD3, CD4 y CD8. Los linfocitos citotóxicos específicos del péptido agonista se pueden transferir de manera adoptiva a un paciente para inhibir o destruir CEA o los epítomos de CEA que expresan células tumorales. Los pacientes pueden ser reinmunizados a continuación con péptido agonista preferentemente en adyuvante.

En general, entre aproximadamente 1×10^5 y 2×10^{11} linfocitos T citotóxicos por infusión se administran, por ejemplo, en una a tres infusiones de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 ml cada una durante un periodo de 30 a 60 minutos. Después de terminar las infusiones, el paciente puede ser tratado con un modificador de respuesta biológica tal como interleucina 2 (IL-2). En el caso de IL-2, se administra por vía intravenosa IL-2 recombinante a una dosis de 720.000 IU por kilogramo de peso corporal cada ocho horas. Después de la transferencia adoptiva de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno a un paciente, el paciente puede ser tratado además con el péptido agonista utilizado para cebar los linfocitos T citotóxicos, para propagar además el número de linfocitos T *in vivo*.

Un péptido agonista puede ser codificado mediante una secuencia de ADN y sus variantes.

En una forma de realización la secuencia de ADN que codifica el péptido agonista es una variante de la secuencia de ADN que comprende:

TAC CTT TCG GGA GCG AAC
Tyr Leu Ser Gly Ala Asn

CTC AAC CTC (SEC. ID n°: 6)
Leu Asn Leu (SEC. ID n°: 1)

Una variante de la SEC. ID n°: 6 incluye, pero no está limitada a un codón ATC (Ile) en lugar del codón CTC (Leu en la posición 7). Otra variante de la SEC. ID n°: 6 incluye pero no se limita a un codón TGT (Cys) en lugar del codón ACC (Asn en la posición 6).

En otra forma de realización, la secuencia de ADN que codifica el péptido agonista comprende:

TAC CTT TCG GGA GCG GAC
Tyr Leu Ser Gly Ala Asp

CTC AAC CTC (SEC. ID n°: 7)
Leu Asn Leu (SEC. ID n°: 2)

y variantes de las mismas.

En otra forma de realización todavía, la secuencia de ADN que codifica el péptido agonista comprende:

TAC	CTT	TCG	GGA	GCG	GAC
Tyr	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp

ATC	AAC	CTC	(SEC. ID nº: 8)
Ile	Asn	Leu	(SEC. ID nº: 3)

o variantes de las mismas.

Están incluidas las sustituciones conservadoras basadas en la degeneración del codón siempre que la modificación produzca un péptido agonista funcionalmente equivalente o un péptido con inmunogenicidad aumentada.

Los vectores y plásmidos que comprenden una secuencia de ADN que codifica un péptido agonista incluyen, pero no se limitan al plásmido de *E.coli*, a un vector de *Listeria* y a un vector vírico recombinante. Los vectores víricos recombinantes incluyen, pero no se limitan al virus de la viruela, virus de la viruela aviar, al virus de la viruela caprina, al virus de la viruela porcina, vacunas, baculovirus, adenovirus humano, SV40, virus del papiloma bovino y similares que comprenden la secuencia de ADN que codifica un péptido antagonista.

El péptido agonista recombinante se puede obtener utilizando un sistema de expresión de baculovirus según el procedimiento de Bei *et al. J. Clin. Lab. Anal.* 9:261-268 (1995). Los vectores víricos recombinantes se pueden reconstruir por procedimientos conocidos en la técnica tales como la patente U.S. nº 5.093.258; el documento WO 96/10419; Cepko *et al. Cell* 37:1053-1062 (1984); Morin *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4626-4630 (1987); Lowe *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3896-3900 (1987); Panicali & Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4927-4931 (1982); Mackett *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7415-7419 (1982); documento WO 91/19803; Perkus *et al. Science* 229:981-984 (1985); Kaufman *et al. Int. J. Cancer* 48:900-907 (1991); Moss *Science* 252:1662 (1991); Smith y Moss *BioTechniques* Nov/Dic, pág. 306-312 (1984); Patente U.S. nº 4.738.846; Sutter y Moss *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10847-10851 (1992); Sutter *et al. Virology* (1994); y Baxby y Paoletti *Vaccine* 10:8-9 (1992).

Las células huésped que pueden expresar el ADN que codifica el péptido agonista realizado por vectores o plásmidos son células huésped procarióticas o eucarióticas e incluyen pero no se limitan a *E. coli*, *Listeria*, *Bacillus species*, células COS, células de Vero, embriones de pollo, fibroblastos, células tumorales, células que presentan antígeno y similares. Cuando la célula huésped es una célula que presenta antígeno, la célula huésped debería expresar además una molécula MHC de clase I.

Se describió recientemente (11) la prueba de respuestas de CTL a CEA en pacientes inmunizados con rV-CEA. Se empleó el péptido no número CAPI para propagar CTL *in vitro* debido a: (a) su fuerte unión a HLA-A2, y (b) su falta de identidad con otros miembros de la familia del gen de CEA expresada en tejidos normales. Se generaron CTL a partir de PBMC después de la inmunización de pacientes mientras que no pudo proliferar la sangre de preinmunización de los mismos pacientes. Además, las células dendríticas pulsadas por CAPI estimularon el desarrollo *in vitro* de CTL restringidos por -A2 de la sangre periférica de pacientes con cáncer inmunizados (12). Por último cuando se generaron CTL *in vitro* por estimulación con células dendríticas que codifican el ARNm de CEA completo, la citotoxicidad frente a CAPI fue mayor que la actividad frente a otros 6 péptidos de CEA que se unen a -A2 (S. Nair y E. Gilboa, comunicación personal u observación no publicada). Dichos resultados animan la idea de que CAPI es un epítipo inmunodominante de la molécula de CEA.

La presente invención está destinada a mejorar la inmunogenicidad del péptido CAPI introduciendo sustituciones de aminoácidos en posiciones no ancladas para formar los péptidos agonistas de la presente invención. Cuando se utilizó CTL de T-Vac8 como efector, el análogo CAPI-6D sensibilizó las células diana para la lisis mucho mejor que el propio CAPI. Estudios adicionales demostraron que la actividad citolítica de un segundo -A2 restringido, CTL específico de CAPI, T-Vac24, fue tan bueno o mayor con CAPI-6D que con CAPI. Estas demostraciones de aumento de reactividad no se podrían explicar por la presentación mejorada por MHC de clase I. Por último, se pudo utilizar CAPI-6D para estimular CTL *in vitro* a partir de PBMC tanto de pacientes de carcinoma como de donantes normales. Antes de la presente invención, los intentos para estimular CTL de anti-CAPI de donantes normales utilizando esta misma metodología no tuvieron éxito. La presente invención se refiere a la estimulación de donantes normales con CAPI-6D en oposición a CAPI natural cuando la estimulación con la secuencia nativa no puede producir actividad citotóxica específica. En cambio, la estimulación con CAPI-6D produjo varios CTL con reactividad del péptido anti-CAPI específico así como reactividad anti-tumoral. Por lo tanto, el péptido CAPI-6D análogo es capaz de seleccionar una población de CTL humana específica de CAPI con más eficacia que CAPI natural. Dicho antagonista puede hallar aplicaciones en el diseño de vacunas dirigidas a linfocitos T contra el carcinoma que expresa CEA.

La presente invención también se refiere a la generación más eficaz y a la propagación de linfocitos T específicos del tumor para inmunoterapia adoptiva. En los últimos años, se ha conseguido muchos avances en la caracterización del tumor asociado a péptidos antígenos que pueden ser presentados a CTL por antígenos HLA de clase I. En los casos en que las mutaciones generen neoantígenos, tal como el punto mutado ras (35, 36), p53, (37, 38) o β -catenina (39), nunca se ha observado que las estrategias de vacunación dirijan la nueva secuencia bajo la suposición de que el sistema inmunitario no es "tolerante" para un antígeno. Más recientemente se ha propuesto que los neo-antígenos

pueden también aparecer mediante desamidaciones después de la traducción (29, 40). Sin embargo, en muchos casos las dianas deseadas de la terapia tumoral no son neoantígenos sino más bien antígenos oncofetales normales o de diferenciación que las células malignas sobreexpresan o expresan de forma extrasistólica. Tal es el caso de CEA (41). En dichas situaciones, los modelos que recurren a la "tolerancia" predicen que el sistema inmunitario ha encontrado estos antígenos y es menos capaz de responder a ellos. Este cuadro clásico ha sido puesto en duda en los últimos años por numerosos informes de inmunidad producidos para antígenos de diferenciación sobreexpresados, oncogenes y genes supresores del tumor (37, 38, 42-44). No obstante, con frecuencia es difícil generar experimentalmente y propagar linfocitos T con la actividad antitumoral deseada y es deseable, por lo tanto, idear nuevas estrategias para generar CTL.

Se han descrito algunos péptidos de unión de clase II en los que las sustituciones aumentan las respuestas de los clones Th murinos y humanos sin aumentar la unión a los antígenos de clase II (29, 45-47). Entre los péptidos de clase I humanos, sin embargo, las únicas sustituciones descritas para la generación de CTL fueron aquellas que aumentan la unión a HLA (17-20). Las sustituciones en esos estudios se dirigieron a restos en las posiciones de anclaje primarias o secundarias que definen los motivos de unión a los antígenos MHC de clase I. Incluso las sustituciones dirigidas a una posición sin anclaje (19) consiguieron su efecto de potenciación aumentando la unión a HLA-A2. El análogo CAP1-6D en el presente informe representa que parece ser una clase diferente de péptidos de CTL sustituidos, agonistas que aumentan el reconocimiento del ligando péptido-MHC por el receptor del linfocito T y producen mayor función efectora sin aumentos de unión. A nuestro juicio este es el dicho primer péptido agonista potenciador descrito para un CTL humano.

La susceptibilidad lítica aumentada de las dianas en presencia de CAP1-6D es poco probable que se deba a la presentación del antígeno mejor. Los experimentos de unión demuestran que HLA-A2 presenta el CAP1 natural y los análogos CAP1-6D y CAP1-71 aproximadamente de igual modo. Otra posibilidad es que CAP1-6D presente actividad aumentada porque se presenta por más de un alelo y T-Vac8 es promiscuo hacia los complejos péptido-MHC. Sin embargo, T-Vac8, T-Vac24 CTL procedentes de pacientes no inmunizados mostraron mejor lisis con CAP1-6D. Como HLA-A2 es el único MHC de clase I en las dianas empleadas, la lisis mejorada no puede ser tenida en cuenta para la regeneración de otra MHC de clase I.

Como los CTL anti-CAP1 procedentes de múltiples donantes demuestran una actividad cruzada del agonista es posible que CAP1-6D se pueda utilizar para estimular el crecimiento de CTL de numerosos -A2 individuales. Estamos animados por las diferencias completamente distintas entre T-Vac8 y T-Vac24 en magnitud de respuesta al agonista; esto implica que cada efector utiliza diferentes segmentos de gen TCR y que no obstante pueden reconocer tanto la secuencia natural como la sustitución de CAP1-6D. La capacidad de CAP1-6D para actuar como agonista con los linfocitos T que expresan diferentes receptores de linfocitos T significa claramente su potencial terapéutico. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la estimulación con el agonista y generación posterior de linfocitos T que reconocen la secuencia normal en individuos no inmunizados. Dichos individuos no han encontrado nunca supuestamente la secuencia modificada y como el agonista es más eficaz para desencadenar una respuesta en los linfocitos T, dichos agonistas pueden ser capaces de seleccionar más fácilmente CTL que los inmunógenos basados en la secuencia natural.

Para que los CTL derivados de péptidos sean reactivos terapéuticos útiles es esencial demostrar que pueden lisar las células tumorales que expresan el antígeno endógeno (48, 49). Anteriormente (11) se ha demostrado que las células tumorales procesan CEA y antígenos presentes reconocidos por los CTL generados por estimulación con CAP1. Según la presente invención, los CTL desarrollados en donantes normales por estimulación con CAP1-6D son también capaces de reconocer CEA alógenos positivos, células tumorales positivas a HLA-A2. Estos linfocitos T no pueden reconocer células tumorales negativas -A2 o células positivas -A2 que carecen de expresión de CEA.

Se ha demostrado también que CTL seleccionados con el agonista CAP1-6D se puede mantener posteriormente por estimulación con la secuencia de CAP1 natural. Este es un descubrimiento importante ya que CTL en pacientes, bien establecido *in vivo* mediante inmunización activa o transferido de forma adoptiva después de propagación *ex vivo*, probablemente sólo encontrará la secuencia natural. Esto permite que los CTL se mantengan durante una duración prolongada *in vivo*.

Una de las razones originales para seleccionar y probar CAP1 fue su falta de identidad con otras secuencias descritas en el genoma humano. Se predijo por lo tanto que cualquiera de las respuestas inmunitarias alcanzadas sería improbablemente para dañar tejidos normales que llevan otros antígenos. Por esta razón se emprendió una búsqueda similar de bases de datos de proteínas para los péptidos CAP1-6D y CAP1-71 y se dio a conocer que no están descritos como secuencias humanas en ninguna parte en el banco de genes (Genetics Computer Group, Madison, WI). Sin embargo, dos secuencias similares, YLNVQDLNL (SEC. ID n°: 9) e YLHDPEFNL (SEC. ID n°: 10), se describen para los antígenos del virus de la fiebre porcina africana y del virus del sarampión, respectivamente. Estas secuencias establecen el motivo del consenso para HLA-A2 y por lo tanto permiten a los individuos infectados expresar antígenos que interaccionan con CAP1. Una posibilidad interesante es que la presencia de CTL con anti-CAP1 en algunos pacientes representa un ejemplo de mimetismo del epítipo (50).

Dos recientes publicaciones sugieren que los restos de asparagina modificada pueden aumentar la inmunogenicidad de los péptidos de MHC de clase I. Skipper *et al.* (40) utilizó CTL generados en cultivos de células tumorales de linfocitos mezclados para identificar antígenos en extractos de células de melanoma. Un péptido antigénico fue

idéntico en 8 de las 9 posiciones en una secuencia de tirosinasa, con una sustitución de asparagina a ácido aspártico en la posición 3. Cuando se probaron utilizando péptidos sintéticos, los CTL fueron más activos frente al péptido del ácido aspártico que frente al péptido que contiene la asparagina predicha genéticamente. Estos autores piensan que las desamidaciones después de la traducción pueden generar péptidos antigénicos en antígenos con diferenciación normal.

5 Hace poco, Chen *et al.* (51) describieron la generación de CTL murinos en un derivado de succinimida establecido de un péptido antigénico que contiene asparagina. Aunque estos CTL podrían destruir dianas pulsadas con el péptido de asparagina natural, lo hacen también con menos sensibilidad. Aumentan la posibilidad de que la desamidación de las proteínas *in vivo* e *in vitro* pueda producir intermedios transitorios de succinimida que representan autoligandos alterados capaces de producir una respuesta inmunitaria. En el otro extremo, Kersh y Allen (52) sustituyeron una asparagina con contacto en TCR por ácido aspártico en un péptido de hemoglobina y eliminaron la sensibilidad a un clon Th murino. Actualmente no se puede excluir la posibilidad de que el aumento de reactividad de CAP1-6D sea debido a la desamidación de la secuencia natural que a su vez ceba la respuesta que se detecta con CAP1. Sin embargo, nuestra incapacidad repetida para aumentar los CTL anti-CAP1 de PBMC preinmunizados de los mismos pacientes en los que se generó CTL después de la inmunización, alega razones contra de esto. Además, las supuestas desamidaciones no tendrían en cuenta el reconocimiento de otros análogos tales como CAP1-6C o CAP1-7I por CTL de T-Vac8. En lugar de ello parece más razonable que los receptores de linfocitos T tanto de T-Vac8 y T-Vac24, así como las nuevas líneas descritas en la presente memoria, pueden reconocer alguna desviación de la secuencia de CAP1 natural.

20 En resumen, la síntesis de análogos de un péptido de CEA inmunodominante con sustituciones de aminoácidos en las situaciones previstas para interactuar potencialmente con el receptor de linfocitos T permitió identificar un agonista potenciador. Este agonista fue reconocido por dos CTL de CEA diferentes y aumenta la actividad de uno de ellos en 2 a 3 órdenes de magnitud. El agonista fue también capaz de estimular el crecimiento de CTL en la sangre periférica de donantes no inmunizados normales con mucha más facilidad que la secuencia de péptido natural. Más importante, el CTL generado utilizando el agonista potenciador fue capaz de reconocer y lisar dianas que presentan la secuencia natural, incluyendo líneas celulares tumorales que expresan el CEA endógeno. Según la presente invención, la caracterización de este péptido agonista potenciador facilita más inmunoterapias antitumorales agresivas cuando se emplea como inmunógeno *in vivo* o para la propagación *ex vivo* de CTL autólogos antitumorales. El enfoque sintético empleado según la presente invención es también útil para mejorar la inmunogenicidad de otro péptido de epítomos de CTL.

Materiales y procedimientos

Péptidos

35 Se preparó un panel de sustituciones de un solo aminoácido en las posiciones p5 a p8 del péptido CAP1 de CEA por química f-moc utilizando una tecnología punta (Chiron Mimotopes, Victoria, Australia). CAP1 (YLSGANLNL) Y CAP1-6D (YLSGADLNL), más del 96% puro, se preparó también mediante Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). Se sintetizaron otros péptidos CAP1-7I y NCA571 en un sintetizador 432A de Applied Biosystems y tenían más del 90% de pureza por HPLC en fase inversa de C18.

Líneas celulares

45 T-Vac8 (53) y T-Vac24 (11) son CTL humanos específicos para el péptido CAP1 de CEA. Estas líneas celulares se generaron por estimulación *in vitro* de PBMC utilizando CAP1 e IL-2, según los procedimientos publicados anteriormente (11). En resumen, las PBMC después de la inmunización procedían de individuos HLA-A2+ con carcinoma avanzado a los que se había administrado rV-CEA en una prueba en fase I. PBMC se aislaron en ingredientes de medio de separación de linfocitos (Organon Teknika, Durham, NC) y se colocaron 2 x 10⁵ células en pocillos de placas de cultivo estériles de 96 pocillos (Coming Costar, Cambridge, MA) junto con 50 µg/ml de péptido. Después de 5 días de incubación a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%, se eliminaron los sobrenadantes y se sustituyeron por medio conteniendo 10 U/ml de IL-2 humano (donación del Surgery Branch, NCI). Los cultivos se alimentaron con IL-2 cada 3 días durante 11 días y a continuación se volvieron a estimular con PBMC (5x10⁵) autólogas irradiadas (4000 rad) y péptidos. Se proporcionó IL-2 reciente cada tres días y se realizaron reestimulaciones posteriores cada 2 semanas. Los CTL se mantuvieron en medio de RPMI completo (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) con glutamina (GIBCO/BRL), penicilina, estreptomina y suero AB humano mezclados al 10% (Gemini Bioproducts, Inc., Calabasas, CA).

60 La línea celular C1R-A2 (proporcionada por el Dr. W. Biddison, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD) se mantiene en RPMI completo con suero de bovino fetal al 10% (FBS, Biofluids Inc., Rockville, MD), glutamina, aminoácidos no esenciales y piruvato (Biofluids) y 1 mg/ml de G418. La línea celular 174.CEM-T2 (proporcionada por el Dr. P. Creswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT) es deficitaria en tratamiento del péptido endógeno y se mantiene en Iscove (GIBCO/BRL) con FBS al 10%. Tanto las líneas C1R-A2 y T2 presentan péptidos endógenos con HLA-A2.

65 Las líneas celulares tumorales positivas a CEA SW480, SW463, SW1116 y SW837 se consiguieron en el American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) y se pasaron semanalmente en el medio de cultivo respectivo descrito en el catálogo de ATCC. La línea Skme124 de melanoma negativo a CEA (proporcionada por el Dr. S. Rosenberg, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD), se pasó semanalmente en RPMI 1640,

ES 2 286 530 T3

FBS al 10% y 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Life Technologies). El CaOV3 del tumor de ovario negativo para CEA fue proporcionado por el Dr. R. Freedman (MD Anderson Cancer Center, Houston TX) y se cultivó en RPMI con FBS al 15%, glutamina, 12 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (Sigma, St. Louis, MO), 10 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona (Biofluids) y 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina. Todas las líneas tumorales se trataron con tripsina con Trypsin/Versene (Biofluids) durante 5 a 10 minutos antes de marcar con isótopo para los análisis de CTL. La diana K562 destructora (NK) natural muy sensible se consiguió en ATCC y se pasó semanalmente con RPMI 1640, FBS al 10%.

Generación de CTL

Se generaron líneas de linfocitos T T-N1 y T-N2 de PBMC de dos donantes positivos a HLA-A2 normales mediante estimulación *in vitro* con péptido de la forma siguiente. Para el primer ciclo de estimulación, se seleccionaron linfocitos T positivamente mediante separación por lavado en matraces CD3+ MicroCollector (Applied Immune Sciences, Santa Clara, CA). Se cultivaron células CD3+ (3×10^6) con 10^6 células 174.CEM-T2 que se habían infectado previamente con virus de vacuna que expresa B7 humano en una multiplicidad de infección de 10, pulsadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de péptidos CAP1 o CAP1-6D y 2 $\mu\text{g/ml}$ de microglobulina $\beta 2$ humana (Intergen, Purchase, NY), y se irradiaron (10.000 rad). Se incubaron los cultivos a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo CO_2 al 5%, en matraces T25 RPMI con suero humano al 10%, glutamina 2 mM y 10 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina en un volumen total de 10 ml con 2×10^7 PBMC autólogas irradiadas (2500 rads) como células nutrientes. Después de 24 horas de cultivo se añadieron 10 U/ml de hIL-2 y 0,1 ng/ml de rIL-12 (R & D Systems, Minneapolis, MN). Después de 9 días de cultivo, se volvieron a estimular las células utilizando células EBV-B autólogas irradiadas (10.000 rads) incubadas previamente con 25 $\mu\text{g/ml}$ de péptido en una proporción de 2,5:1 células estimulantes a linfocitos T, y 24 horas después se añadieron de nuevo IL-2 e IL-12. La concentración del péptido se dividió por dos en cada ciclo de estimulación posterior hasta conseguir una concentración final de 3,12 $\mu\text{g/ml}$.

Además, se generaron CTL de PBMC después de la inmunización de Vac8 del paciente de cáncer por estimulación con CAP1-6D según los procedimientos (11) ya publicados.

Análisis de CTL

Se marcaron células diana con ^{51}Cr o ^{111}In , se incubaron a continuación a razón de 2.000-10.000 por pocillo con o sin péptidos en placas de microvaloración de fondo redondo (Corning Costar). Una hora más tarde, se añadieron linfocitos T. Se recogieron los sobrenadantes (Skatron, Inc., Sterling VA) después de 4 horas y se midió la liberación de isótopos. Todos los análisis se realizaron por triplicado y se calculó el porcentaje de liberación específica según:

$$\frac{(\text{liberación observada} - \text{liberación espontánea})}{(\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})} \times 100$$

en la que la liberación espontánea se obtiene omitiendo los linfocitos T y la liberación máxima se obtiene añadiendo Triton X100 al 1%.

Análisis de unión

Se evaluó la unión de los péptidos a HLA-A2 mediante incubación con células 174.CEM-T2 con tratamiento insuficiente y midiendo la estabilidad de los complejos péptido-A2 en la superficie de la célula (30). En resumen, se recogieron las células y se lavaron con RPMI exento de suero, se incubaron a continuación toda la noche a razón de $1-2 \times 10^6$ células/pocillo con varias concentraciones de péptidos. Al día siguiente, se recogieron las células, se lavaron con PBS con Ca^{2+} , Mg^{2+} y FBS al 5%, se dividieron a continuación en alícuotas para análisis citométrico de flujo de un solo color. Se incubaron las células 1 hora en hielo sin anticuerpo, con anticuerpo A2, 69 anti-A2 (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) o con anticuerpo de referencia UPC-10 compatible con el isótopo (Organon Teknika) se lavó a continuación y se tiñó 1 hora con Ig anti-ratón de cabra fluoresceína-isotiocianato (FITC) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Se midió la coloración en la superficie de la célula en un citómetro de flujo de Becton Dickinson (Mountain View, CA) y se representó la intensidad media de fluorescencia (MFI) para 10.000 células vivas frente a la concentración de péptido.

Utilización de la cadena de TCR

Se cultivaron CTL de T-N1 como se describe para 5 ciclos de estimulación antigénica utilizando el análogo de CAP1-6D. Se cortó y empalmó a continuación la línea y se mantuvieron los cultivos duplicados con CAP1 o con CAP1-6D durante 5 ciclos de estimulación adicionales. Se colorearon los linfocitos T (5×10^5) purificados por Ficoll con un panel de 19 anticuerpos monoclonales murinos, anti-V β y 2 anti-V α para zonas variables de receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ humanos. Se incubaron las células con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo purificados durante 30 minutos a 4°C. Los monoclonales utilizados no marcados fueron: clon 8 F10 de V β 3.1, clon 1C1 de V β 5(a), clon W112 de V β 5(b), clon LC4 de V β 5(c), clon OT145 de V β 6.7, clon 16G8 de V β 8(a), clon S511 de V β 12, clon BAM13 de V β 13, con F1 de V α 2 y clon 6D6 de V α 12.1 (T Cell Diagnostics, Woburn, MA) y V β 18 (Immunotech, Westbrook, ME). Se colorearon las células con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo de IgG anti-ratón de cabra marcado con FITC (Southern Biotechnology Associates) durante 30 minutos en la oscuridad. Los monoclonales marcados directamente fueron: V β 11, V β 21.3, V β 13.6, V β 14, V β 16, V β 17, V β 20 y V β 22 marcados con FITC y V β 9 y V β 23 marcados con PE

(Immunotech). Se fijaron las células con paraformaldehído al 1%, se lavaron con tampón bajo en FACSF (Becton Dickinson) y se analizaron utilizando un citómetro de flujo de Becton Dickinson.

Ejemplos

5

Péptidos sustituidos con CAP1

Se consideraron varios factores para decidir qué posiciones examinar para efectos sobre la actividad de linfocitos T. Los experimentos de secuenciado y cartografía han definido un motivo de unión en el que la posición 2 y el C-terminal (posición 9 ó 10) son críticas para la presentación del péptido por HLA-A2 (para reseña, véase 31). Además, se ha identificado Tyr en la posición 1 como anclaje secundario eficaz, (20, 32). Como el CAP1 del péptido CEA ya tiene los aminoácidos preferidos en estas tres posiciones estos restos no se alteraron. En su lugar, se centró la atención en los restos previstos para interactuar con el TCR con la esperanza de encontrar análogos que estimulen los linfocitos T citotóxicos de CAP1 humanos. Estudios cristalográficos por rayos X de varios péptidos unidos a HLA-A2 soluble sugieren que todos los péptidos de unión suponen una conformación común en el surco de unión al péptido (33). Cuando se examinaron cinco péptidos modelo, sobresalieron 5 a 8 restos del surco de unión y están disponibles en potencia para la unión a un TCR. Por consiguiente se produjo un panel de 80 péptidos análogos a CAP1 en el que se sintetizaron los restos en las posiciones 5 a 8 (p5-p8) con cada uno de los 20 aminoácidos naturales. Los péptidos se denominan CAP1-pAA, en el que p se refiere a la posición en el péptido y AA se refiere al aminoácido de sustitución, utilizando el código de aminoácidos de una sola letra, es decir, CAP1-6D en el que la posición 6 está ocupada por el ácido aspártico.

Aumento de sensibilidad de CTL de las dianas para el análogo de CAP1-6D

Se estudiaron los efectos de estas sustituciones de aminoácidos sobre el reconocimiento potencial de TCR utilizando un CAP1 específico, la línea CTL humana restringida de HLA-A2 denominada T-Vac8. En resumen, se generó T-Vac8 como se describe en Materiales y Procedimientos por estimulación del péptido *in vitro* de PBMC de un paciente al que se había administrado TV-CEA. Para la detección inicial, se utilizó T-Vac8 en un análisis de citotoxicidad para medir la liberación de ¹¹¹In en células C1R-A2 marcadas, incubadas con cada elemento del panel de péptidos (a tres concentraciones de péptido). Se determinó la liberación espontánea de las dianas (en ausencia de T-Vac8) para cada péptido individual.

En las Figuras 1A a 1D se presentan los resultados. De las 80 sustituciones de un solo aminoácido, la mayoría no pudo activar la citotoxicidad de T-Vac8. Sin embargo, seis sustituciones independientes conservaron la reactividad. En la posición 5, tres análogos CAP1-5F, CAP1-5I y CAP1-5S proporcionaron estimulación, aunque a niveles reducidos comparados con el propio CAP1. En la posición 6 las sustituciones CAP1-6C y CAP1-6D activaron la citotoxicidad de T-Vac8 y parecían ser iguales o mejores que CAP1, ya que fueron más activas a la concentración intermedia (0,1 $\mu\text{g/ml}$) de péptido. En la posición 7 pareció además que el análogo CAP1-7I era activo. Por último, en la posición 8 ningún análogo fue capaz de sensibilizar las dianas para la lisis por T-Vac8. Se analizaron a continuación con detalle los dos análogos más activos (CAP1-6D y CAP1-7I), omitiendo CAP1-6C debido a que afectan a la formación de disulfuro en condiciones de oxidación.

Se sintetizaron las preparaciones más puras (pureza de 90 a 96%) de CAP1 natural y los análogos CAP1-6D y CAP1-7I y se compararon en un análisis de CTL durante un intervalo más amplio de concentraciones de péptido, utilizando dos líneas celulares diferentes como dianas (Figuras 2A y 2B). Empleando el análogo CAP1-6D de linfocitos T2 fue al menos 10^2 veces más eficaz que el CAP1 natural. La actividad lítica de CAP1-6D fue en el $1/2$ máximo a 10^{-4} $\mu\text{g/ml}$ (Figura 2A). En cambio, el análogo CAP1-7I y la secuencia CAP1 natural eran comparables entre sí en todo el intervalo de valoración del péptido y presentaban media lisis máxima a 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$. Empleando las células C1R-A2 como dianas, CAP1-6D fue igualmente más eficaz entre 10^2 y 10^3 que CAP1 para mediar la lisis (Figura 2B).

Se analizó también el péptido de CAP1-6D utilizando una segunda línea de linfocitos T específicos de CEA, T-Vac24 (11). Esta línea se generó a partir de PBMC después de la vacunación con rV-CEA de un paciente con carcinoma diferente por estimulación *in vitro* con el péptido CAP1 natural; en cambio con T-Vac8 de CD8+ principalmente, T-Vac24 tiene un gran porcentaje de células positivas dobles CD4+CD8+ (11). En un ensayo de liberación de ¹¹¹In de 4 horas que emplea T-Vac24, CAP1-6D fue ligeramente más eficaz (30% de lisis) que la secuencia natural de CAP1 (20% de lisis); aunque las diferencias no fueron tan pronunciadas como con T-Vac8, el aumento de sensibilidad en el análogo se observó en tres experimentos independientes. El péptido análogo se acopla claramente al aparato lítico de un segundo CTL específico de CAP1.

Análogos y péptido natural muestran idéntica presentación por HLA-A2

El aumento de eficacia de CAP1-6D en el análisis de CTL podría ser debido a la mejor presentación por la diana. Se determinó la unión a HLA-A2 de los análogos de CAP1 más activos midiendo la superficie celular de HLA-A2 en la línea celular T2 humana insuficiente para el transporte. Cuando se comparan en todo un intervalo 4 log de concentraciones, CAP1 natural y los dos análogos CAP1-6D y CAP1-7I se presentan igualmente en los linfocitos T2 (Figura 3). Además, los experimentos de disociación indican que los complejos HLA-A2 que se forman con los 3 péptidos no muestran apreciables diferencias en la estabilidad (Figura 3 - inserción). Cuando se lavaron células T2 pulsadas con péptidos exentas de péptido no ligado, las vidas medias de los complejos péptido-A2 de la superficie celular fueron de

12,5 h (CAP1), 9,7 h (CAP1-6D) y 10,8 h (CAP1-7I). Si existe, el complejo formado con el péptido agonista parece ligeramente menos estable. Ya que no existen diferencias en la unión a HLA-A2, la eficacia mejorada de CAP1-6D en los análisis de CTL parece que se debe al mejor acoplamiento del linfocito T por el receptor, comportamiento característico de un péptido agonista potenciador.

5

CTL humanos generados con CAP1-6D también reconocen a CAP1 natural

El agonista CAP1-6D puede ser útil tanto en aplicaciones experimentales como clínicas si puede estimular el crecimiento de CTL específico de CEA en pacientes con carcinomas probados. En un experimento, las PBMC después de la inmunización de rV-CEA de Vac8 del paciente con cáncer, (el mismo paciente con rV-CEA en el que se probaron los CTL de T-Vac8) se estimularon *in vitro* con CAP1-6D y después de 5 rondas de estimulación se determinó la actividad de CTL frente a dianas recubiertas con CAP1 o CAP1-6D. Esta nueva línea demostró la actividad citotóxica dependiente del péptido frente a células diana recubiertas con CAP1-6D o CAP1 natural (Tabla 1).

Las PBMC después de la inmunización de Vac8 y Vac24 de pacientes se demostró ya que producen actividad de CTL cuando se estimulan con CAP1 mientras que las PBMC antes de la inmunización fueron negativas (11, 34). Además, los intentos previos de estimular la actividad de CTL en donantes sanos, no inmunizados con el péptido de CAP1 no tuvieron éxito. Para probar si el péptido agonista es realmente más inmunógeno que el CAP1 natural se intentó generar CTL de donantes sanos, no inmunizados utilizando CAP1-6D. Se estimularon *in vitro* PBMC de HLA-A2+ de individuos aparentemente sanos con CAP1 o con agonista CAP1-6D. Después de 4 ciclos de estimulación *in vitro*, se analizó la especificidad en líneas celulares frente a células C1R-A2 pulsadas con CAP1 o con CAP1-6D.

Mientras que las estimulaciones con péptido de CAP1 o de CAP1-6D produjeron líneas de linfocitos T, la lisis específica del péptido se obtuvo solamente en las líneas generadas con CAP1-6D. Se derivaron dos líneas de linfocitos T independientes de donantes diferentes utilizando CAP1-6D y se denominaron T-N1 y T-N2 (Figura 4A y Figura 4B respectivamente). Ambas líneas CTL lisan dianas de C1R-A2 pulsadas con péptidos de CAP1 naturales. Sin embargo, se obtiene una lisis más eficaz utilizando el agonista de CAP1-6D. CTL de T-N1 reconoce CAP1-6D a una concentración de péptido 3 a 10 veces inferior que CAP1 y T-N2 reconoce el agonista 100 veces mejor que CAP1. En cambio, los intentos para generar una línea celular CTL de donantes normales por estimulación con CAP1 produjo líneas sin lisis dependiente del péptido y pérdida de las líneas en los ciclos de estimulación iniciales. De este modo los intentos para generar líneas de linfocitos T utilizando los dos péptidos demostraron la capacidad de CAP1-6D para actuar como antagonista no solamente en la etapa del efector, en la lisis de dianas, sino también para seleccionar linfocitos T que están supuestamente en frecuencias bajas de precursor.

Para determinar si los CTLs probados con el agonista se podían mantener en la secuencia de CAP1 natural, se cultivó T-N1 durante 5 ciclos tal como se describe utilizando CAP1-6D, a continuación se dividió en cultivos duplicados mantenidos en el agonista o en CAP1. T-N1 continuó creciendo cuando se estimuló con uno de los dos péptidos y respondía a ambos péptidos en el análisis de CTL. El análisis fenotípico de la utilización de TCR en T-N1 indica que la mayoría de las células (71%) utilizan V β 12, con una población menor que utiliza V β 5.3 (Tabla 2). El mismo modelo de uso de V β de TCR se observó después de conectar las células a CAP1 durante más de 5 ciclos de estimulación. Este patrón de uso de V β fue distinto del de T-Vac8. Estos datos indican que el agonista puede seleccionar linfocitos T que están probablemente en una frecuencia de precursor más baja pero que una vez seleccionados, dichos CTL se podrían mantener con el CAP1 natural.

CTL generados con CAP1-6D lisaron específicamente células tumorales CEA⁺, HLA-A2⁺

Se llevaron a cabo estudios para determinar la capacidad de CTL generados con el agonista potenciador para lisar de forma endógena las células tumorales humanas que expresan CEA. Se probaron T-N1 y T-N2 frente a un panel de las células tumorales siguientes: CEA⁺/A2⁺ (SW480 y SW1463), CEA⁺/A2⁻ (SW1116) o CEA⁻/A2⁺ (CaOV3 y SKme124). Se determinó la capacidad para lisar de forma endógena dianas tumorales que expresan CEA de una línea de linfocitos T (T-N2) procedente del donante normal. Los CTL de TN-2 generados con el agonista lisaron células tumorales que expresan tanto CEA como HLA-A2 mientras presentaban lisis no valorable de células de melanoma SKme124 de CEA⁻/A2⁺ (Figura 5A). No se observó lisis significativa de K562. En cambio, las líneas celulares generadas por estimulación con CAP1 natural no presentaron ninguna actividad antitumoral detectable (Figura 5B). La restricción de HLA-A2.1 de la respuesta de T-N2 a las dianas tumorales positivas a CEA se demostró además por la lisis específica de una célula tumoral para HLA-A2.1 positiva para CEA, SW837 después de la infección con una construcción vacuna-A2.1 (rV-A2.1). No se observó lisis cuando las dianas SW837 se infectaron con la vacuna de referencia natural sin el transgén de A2.1 (Figura 6).

La capacidad de la línea de CTL (T-N1) procedente de un segundo donante para destruir las dianas de carcinoma que expresan CEA endógeno se presenta en las Figuras 7A y 7B. T-N1 lisó de forma específica las células tumorales WS480. Ésta aumentó drásticamente al 79% de la lisis mediante pretratamiento de las células tumorales con IFN- γ , tratamiento que aumenta la densidad de la superficie celular tanto de HLA-A2 como de CEA. La especificidad de la destrucción de T-N1 se demuestra por su incapacidad para lisar tumores con CEA⁻/A2⁺ tal como el tumor CaOV3 procedente del ovario, el tumor SKme124 de melanoma o la diana K562 de NK. Por último, la restricción por HLA-A2 se demuestra por la incapacidad de TN-1 para lisar las células tumorales SW1116 de CEA⁺/A2⁻ (Figura 7A), incluso después del tratamiento con IFN- γ (Figura 7B).

65

ES 2 286 530 T3

TABLA 1

CTL generado por estimulación con el análogo de CAP1-6D procedente de PBMC de un paciente de HLA-A2 inmunizado con rVCEA

Proporción efector/diana	% de lisis		
	sin péptido	CAP1	CAP1-6D
25:1	10%	41%	40%
6,25:1	0,5%	38%	46%

Se analizaron linfocitos T después de 5 estimulaciones *in vitro*. Se determinó la actividad citotóxica en el ensayo de liberación de 4 horas con péptido a 25 µg/ml.

TABLA 2

Uso por el TCR de la línea de CTL probada en el agonista de CAP1-6D

Uso por TCR ^a	T-N1 ^b		T-N1 ^c	
	% positivo	MFI	% positivo	MFI
Vβ12	71	83	70	83
Vβ5.3	18	47	20	57
Vβ3.1	6	48	8	46
Vβ8	3	30	6	26
Vβ17.6	2	19	3	39
Vβ12.1	3	43	3	40

^a Determinado por análisis FACS utilizando un panel de 19 anticuerpos Vβ y 2 Vα (véase Materiales y Procedimientos). Sólo se muestran anticuerpos con coloración positiva.

^b Línea de CTL seleccionada y mantenida en el agonista CAP1-6D, tal como se describe en el apartado de Materiales y Procedimientos.

^c Línea de CTL seleccionada en el agonista CAP1-6D durante 5 ciclos de estimulación y mantenida en CAP1 para 10 ciclos adicionales.

Referencias

1. **Muraro, R., Wunderlich, D., Thor, A., Lundy, J., Noguchi, P., Cunningham, R., y Schlom, J.** Definition by monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes of carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinoma versus normal adult tissues. *Cancer Res.* 45: 5769-5780, 1985.

2. **Steward, A.M., Nixon, D., Zamcheck, N, y Aisenberg, A.** Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients: serum levels and disease progress. *Cancer*, 33: 1246-1 252, 1974.

3. **Vincent, R.G. y Chu, T.M.** Carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma of the lung. *J. Thor. Cardiovas. Surg.*, 66: 320-328, 1978.

4. **Gold, J.M., Freedman, S.O., y Gold, P.** Human anti CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis. *Nature New Biology*, 239: 60-62. 1973.

5. **Pompecki, R.** Presence of immunoglobulin G in human sera binding to carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA). *Eur. J Cancer*, 16: 973-974, 1980.

6. **Ura, Y., Ochi, Y., Hamazu, M., Ishida, M., Nakajima, K., y Watanabe, T.** Studies on circulating antibodies against CEA and CEA like antigen in cancer patients. *Cancer Lett.*, 25: 283-295, 1985.

7. **Fuchs, C., Krapf, F., Kern, P., Hoferichter, S., Jager, W., y Kalden, J.R.** CEA-containing immune complexes in sera of patients with colorectal and breast cancer-analysis of complexed immunoglobulin classes. *Cancer Immunol. Immunother.*, 26:180-184, 1988.

8. **LoGerfo, P., Herter, F.P., y Bennett, S.J.** Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic antigen in patients with gastrointestinal malignancies. *Int. J. Cancer*, 9: 344-348. 1972.

9. **MacSween**, J.M. The antigenicity of carcinoembryonic antigen in man. *Int. J. Cancer*, 15: 246-252. 1975.
10. **Chester**, K.A. and **Begent**, H.J. Circulating immune complexes (CIC), carcinoembryonic antigen (CEA) and CIC containing CEA as markers for colorectal cancer. *Clin. Exp. Immunol.*, 58: 685-693, 1984.
11. **Tsang**, K Y., **Zaremba**, S., **Nieroda**, C.A., **Zhu**, M.Z, **Hamilton**, J.M., y **Schlom**, J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87: 982-990. 1995.
12. **Gadea**, J., **Brunette**, E., **Philip**, M., **Lyeriy**, H.K., **Philip**, R., y **Alters**, S. Generation of antigen specific CTL using peptide and gene modified dendritic cells. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* [abstr], 3154. 1996.
13. **Marshall**, J.L., **Hawkins**, M.J., **Richmond**, E., **Tsang**, K., y **Schlom**, J. A study of recombinant ALVAC-CEA in patients with advanced CEA-bearing cancers. *J. Immunol.* [abstr]. 19: 461. 1996.
14. **Foon**, K.A., **Chakraborty**, M., **John**, W.J., **Sherraff**, A., **Kohler**, H., y **Bhattacharya-Chatterjee**, M. Immune response to the carcinoembryonic antigen in patients treated with an anti-idiotypic antibody vaccine. *J. Clin. Invest.*, 96: 334-342. 1995.
15. **Fagerberg**, J., **Samanci**, A., **Yi**, Q., **Strigard**, K., **Ryden**, U., **Wahren**, B., y **Mellstedt**, H. Recombinant carcinoembryonic antigen and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for active immunization of colorectal carcinoma patients. *J. Immunol.* [abstr]. 19: 461. 1996.
16. **Conry**, R.M., **Saleh**, M.N., **Schlom**, J., and **LoBuglio**, A.F. Human immune response to carcinoembryonic antigen tumor vaccines. *J. Immunother.* [abstr], 18: 137, 1995.
17. **Parkhurst**, M.R., **Salgaller**, M.L, **Southwood**, S., **Robbins**, P.F., **Sette**, A., **Rosenberg**, S A., and **Kawakami**, Y. Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A*0201 -binding residues. *J. Immunol.*, 157: 2539-2548, 1996.
18. **Salgaller**, M.L, **Marincola**, F.M., **Cormier**, J.N., and **Rosenberg**, S.A. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res.*, 56: 4749-4757, 1996.
19. **Bakker**, A.B.H., van der **Burg**, S.H., **Huubens**, R.J.F., **Drijfhout**, J.W., **Melief**, C.J., **Adema**, G.J., and **Figdor**, C. G. Analogues of CTL epitopes with improved MHC class-I binding capacity elicit anti-melanoma CTL recognizing the wild type epitope. *Int. J. Cancer*, 70: 302-309, 1997.
20. **Pogue**, R.R., **Eron**, J., **Frelinger**, J.A., and **Matsui**, M. Amino-terminal alteration of the HLA-A*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and *in vitro* immunogenicity. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92: 8166-8170, 1995.
21. **Lipford**, G., **Bauer**, S., **Wagner**, H., and **Heeg**, K. Peptide engineering allows cytotoxic T cell vaccination against human papilloma virus tumor antigen E6. *Immunol.*, 84: 298-303. 1995.
22. **Grey**, H.M., **Ruppert**, J., **Vitiello**, A., **Sidney**, J., **Kast**, W.M., **Kubo**, R.T., and **Sette**, A. Class I MHC-peptide interactions: structural requirements and functional implications. *Cancer Surv.*, 22: 37-49, 1995.
23. De **Magistris**, M.T., **Alexander**, J., **Coggeshall**, M., **Altman**, A., **Gaeta**, F.C A., **Grey**, H.M., and **Sette**, A. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell*, 68: 625-634. 1992.
24. **Bertoletti**, A., **Sette**, A., **Chissari**, F.V., **Penna**, A., **Levrero**, M., **Carli**, M.D., **Fiaccadori**, F., and **Ferrari**, F. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature*, 369: 407-410, 1994.
25. **Klenerman**, P., **Rowland-Jones**, S., **McAdam**, S., **Edwards**, J., **Daenke**, S., **Lalloo**, D., **Koppe**, B., **Rosenberg**, W., **Boyd**, D., **Edwards**, A., **Giangrande**, P., **Phillips**, R.E., and **McMichael**, A.J. Cytotoxic T cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 gag variants. *Nature*. 369: 403-407. 1994.
26. **Kuchroo**, V.K., **Greer**, J.M., **Kaul**, D., **Ishioka**, G., **Franco**, A., **Sette**, A., **Sobel**, R A., and **Lees**, M.B. A single TCR antagonist peptide inhibits experimental allergic encephalomyelitis mediated by a diverse T cell repertoire. *J. Immunol.*, 153: 3326-3336. 1994.
27. **Jameson**, S.C. and **Bevan**, M.J. Tcell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity*, 2: 1-11, 1995.
28. **Meier**, U-C., **Klenerman**, P., **Griffin**, P., **James**, W., **Koppe**, B., **Larder**, B., **McMichael**, A., and **Phillips**, R. Cytotoxic T lymphocyte lysis inhibited by viable HIV mutants. *Science*. 270: 1360-1362. 1995.

29. **Chen, Y., Matsushita, S., and Nishimura, Y.** Response of a human Tcell clone to a large panel of altered peptide ligands carrying single residue substitutions in an antigenic peptide: characterization and frequencies of TCR agonist and TCR antagonism with or without partial activation. *J. Immunol.*, 157: 3783-3790. 1996.
- 5 30. **Nijman, H.W., Houbiers, J.G., Vierboom, M.P., van der Hurg, S.H., Drijfhout, J.W., D'Amaro, J., Kenemans, P., Melief, C.J., and Kast, W.M.** Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 23: 1215-1219, 1993.
- 10 31. **Rammensee, H-G., Friede, T., and Stevanovic, S.** MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41 : 178-228, 1995.
32. **Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R.T., Grey, H.M., and Sette, A.** Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell*, 74: 929-937. 1993.
- 15 33. **Madden, D.R., Garboczi, D.N., and Wiley, D.C.** The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell*, 75: 693-708, 1993.
34. **Hamilton, J.M., Chen, A.P., Nguyen, B., Grem, J., Abrams, S., Chung, Y., Kantor, J., Phares, J.C., Bastian, A., Brooks, C., Morrison, G., Allegra, C.J., and Schlom, J.** Phase I study of recombinant vaccinia virus (rV) that expresses human carcinoembryonic antigen (CEA) in adult patients with adenocarcinomas. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* [abstr], 961. 1994.
- 20 35. **Abrams, S.I., Horan Hand, P., Tsang, K.Y., and Schlom, J.** Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines. *Semin. Oncol.*, 23: 118-134, 1996.
- 25 36. **Elas, A.V., Nijman, H.W., Van Minne, C.E., Mourer, J.S., Kast, W.M., Melief, C.J.M., and Schrier, P.I.** Induction and characterization of cytotoxic T lymphocytes recognizing a mutated p21 RAS peptide presented by HLA-A2010. *Int. J. Cancer*, 61 : 389-396, 1995.
- 30 37. **Houbiers, J.G.A., Nijman, H.W., van der Burg, S.H., Drijfhout, J.W., Kenemans, P., van de Velde, C.J.H., Brande, A., Momburg, F., Kast, W.M., and Melief, C.J.M.** *In vitro* induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild type p53. *Eur. J. Immunol.*, 23:2072-2077, 1993.
- 35 38. **Ropke, M., Regner, M., and Claesson, M.H.** T cell mediated cytotoxicity against p53-protein derived peptides in bulk and limiting dilution cultures of healthy donors. *Scand. J. Immunol.*, 42: 98-103, 1995.
39. **Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.** A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 1185-1192, 1996.
- 40 40. **Skipper, J.C.A., Hendrickson, R.C., Guiden, P.H., Brichard, V., van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C.L., Jr., Boon, T., Hunt, D.F., and Engelhard, V.H.** An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from post-translational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J. Exp. Med.*, 183: 527-534, 1996.
- 45 41. **Thompson, J.A., Grunert, F., and Zimmerman, W.** Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.*, 5: 344-366, 1991.
42. **Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T.** A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254: 1643-1647, 1991.
- 50 43. **Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L., Miki, T., and Rosenberg, S.A.** Cloning of the gene coding for a shared human melanocyte antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91 : 3515-3519. 1994.
- 55 44. **Peoples, G.E., Goedegebuure, P.S., Smith, R., Linehan, D.C., Yoshino, I., and Eberlein, T.J.** Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 92: 432-436. 1995.
- 60 45. **Matsuoka, T., Kohroggi, H., Ando, M., Nishimura, Y., and Matsushita, S.** Altered TCR ligands affect antigen-presenting cell responses: up regulation of IL-12 by analogue peptide. *J. Immunol.*, 157:4837-4843. 1996.
- 65 46. **Ikagawa, S., Matsushita, S., Chen, Y-Z, Ishikawa, T., and Nishimura, Y.** Single amino acid substitutions on a Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1)-derived peptide induced alterations in human T cell responses and T cell receptor antagonism. *J. Aller. Clin. Immunol.*, 97: 53-64, 1996.

ES 2 286 530 T3

47. **England, R.D., Kullberg, M.C., Cornette, J.L., and Berzofsky, J.A.** Molecular analysis of a heteroclitic T cell response to the immunodominant epitope of sperm whale myoglobin: Implications for peptide partial agonists. *J. Immunol.*, 155: 4295-4306, 1995.

5 48. **Ropke, M., Hald, J., Guldborg, P., Zeuthen, J., Norgaard, L., Fugger, L., Svejgaard, A., Van Der Burg, S., Nijman, H.W., Melief, C.J.M., and Claesson, M.H.** Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 93: 14704-14707, 1996.

10 49. **Correale, P., Walmsley, K., Nieroda, C., Zaremba, S., Zhu, M., Schlom, J., and Tsang, K.Y.** *In vitro* generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 293-300, 1997.

15 50. **Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L.** Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, 80: 695-705, 1995.

20 51. **Chen, W., Ede, N.J., Jackson, D.C., McCluskey, J., and Purcell, A.W.** CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement: Implications for immunity and vaccine design. *J. Immunol.*, 157: 1000-1005, 1996.

25 52. **Kersh, G.J. and Allen, P.M.** Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: A single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J. Exp. Med* 184: 1259-1268, 1996.

30 53. **Tsang, K.Y. Zhu, M.Z. Nieroda, C.A, Correale, P., Zaremba, S., Hamilton, J.M., Cole, D., Lam, C., and Schlom, J.** Phenotypic Stability of a Cytotoxic T Cell Line Directed Against an Immunodominant Epitope of Human Carcinoembryonic Antigen (accepted by Clinical Cancer Res.).

30

35

40

45

50

55

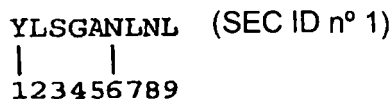
60

65

REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende un agonista de una secuencia natural de unión de MHC de clase I:

5



10

en el que dicho agonista varía en una sustitución de aminoácido en la posición 6 y/o la posición 7 de la SEC. ID. nº 1 y dicho agonista presenta aumento de inmunogenicidad en comparación con la secuencia natural.

15

2. Composición farmacéutica que comprende al menos un péptido según la reivindicación 1 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende además una molécula autoestimulante.

20

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que la molécula inmunoestimulante se selecciona de entre el grupo que consta de IL-2, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-3, CD72, GM-CSF, TNF α , INF γ , IL-12, IL-6 y combinaciones de las mismas.

25

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende además una molécula HLA de clase I o una célula que expresa una molécula HLA de clase I.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende además un fármaco quimioterapéutico, antibiótico, fármaco antivírico, fármaco antimicótico o ciclofosfamida.

30

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, que comprende además un adyuvante.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en el que el adyuvante se selecciona de entre el grupo que consta de alumbre, adyuvante incompleto de Freund, QS21 y Ribí DetoxTM.

35

9. Conjugado de péptido-inmunoglobulina que comprende el péptido según la reivindicación 1 y una molécula de inmunoglobulina.

10. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en el que el péptido se incorpora en un liposoma.

40

11. Conjugado de la molécula péptido-excipiente que comprende el péptido según la reivindicación 1 conjugado con una molécula de excipiente.

12. Conjugado de la molécula péptido-excipiente según la reivindicación 11, en el que la molécula de excipiente se selecciona de entre el grupo que consta de péptido de la gripe, vacuna del tétanos, epítipo CD4 de la vacuna del tétanos, exotoxina A de *Pseudomonas*, poli-L-lisina, una cola de lípido y una secuencia con señal del retículo endoplásmico.

45

13. Kit que comprende un péptido agonista según la reivindicación 1 y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica CEA.

50

14. Kit según la reivindicación 13, que comprende además una molécula inmunoestimulante.

15. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la molécula HLA de clase I es la HLA-A2.

55

16. Kit según la reivindicación 13, en el que el CEA codificado comprende un epítipo YLSGANLNL (SEC ID nº 1).

17. Kit según la reivindicación 14, en el que la molécula inmunoestimuladora es el GM-CSF.

60

18. Péptido según la reivindicación 1 para su utilización en medicina.

19. Utilización del péptido según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la inmunoterapia del cáncer.

65

20. Utilización según la reivindicación 19, en la que la inmunoterapia del cáncer comprende tratar y/o vacunar a un paciente con un cáncer de expresión de CEA.

ES 2 286 530 T3

21. Utilización según la reivindicación 19 ó 20, en la que el cáncer es seleccionado de entre el grupo constituido por cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de mama, cáncer de tiroides, melanoma, cáncer bucal, cáncer de laringe, seminoma, cáncer hepatocelular, cáncer del conducto biliar, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas y cáncer de próstata.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

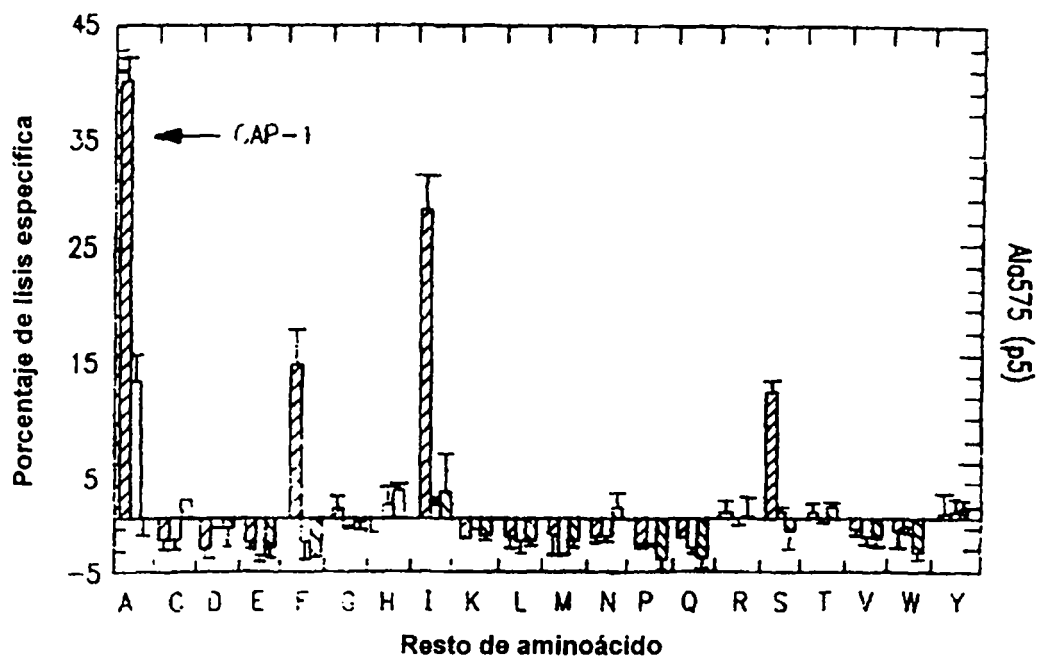


FIG. IA

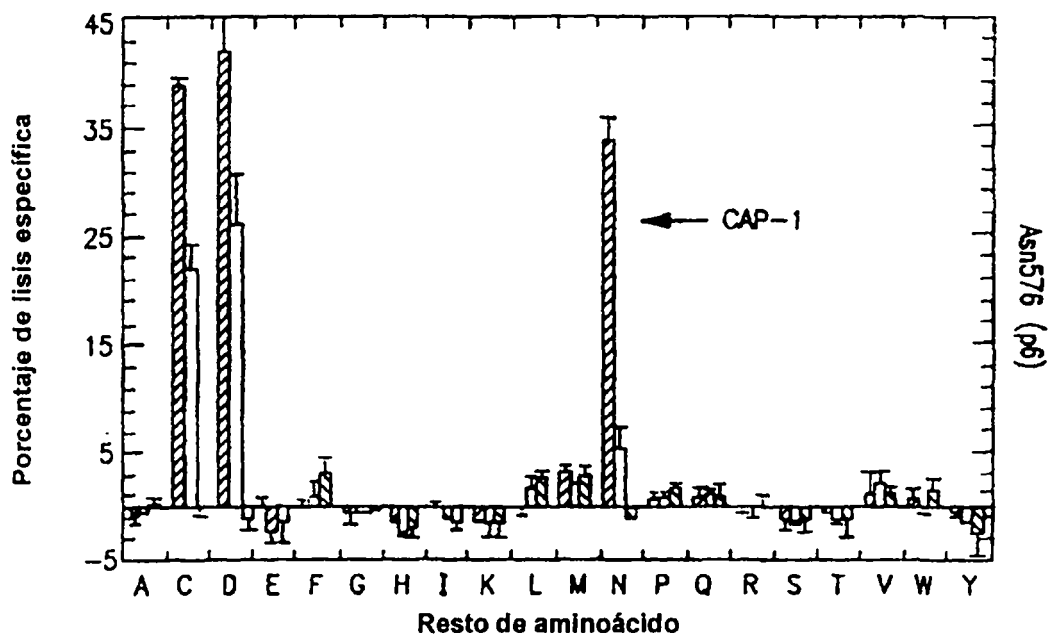


FIG. IB

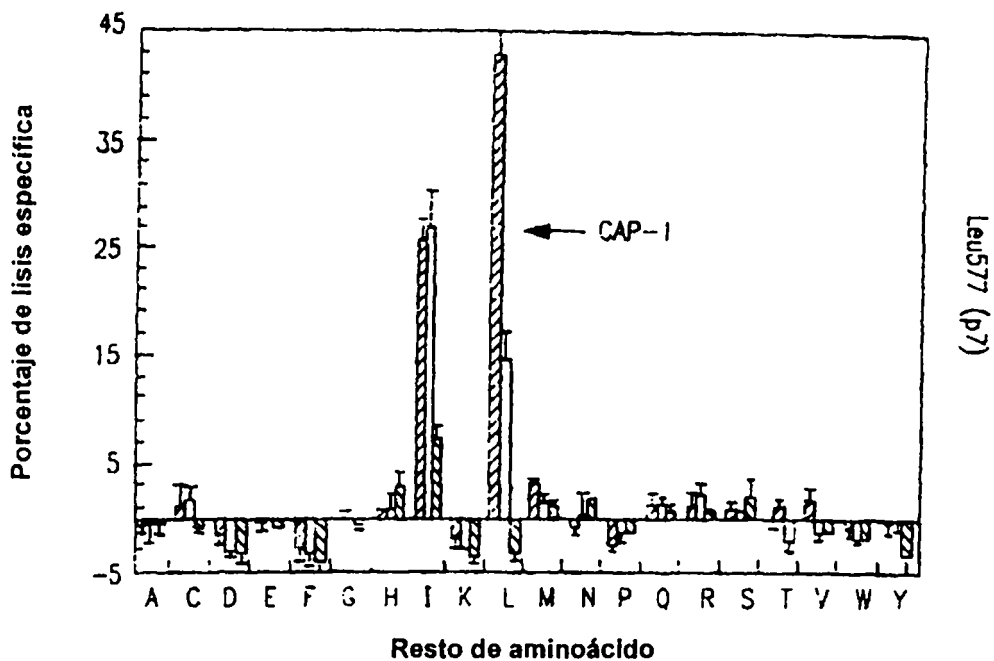


FIG. IC

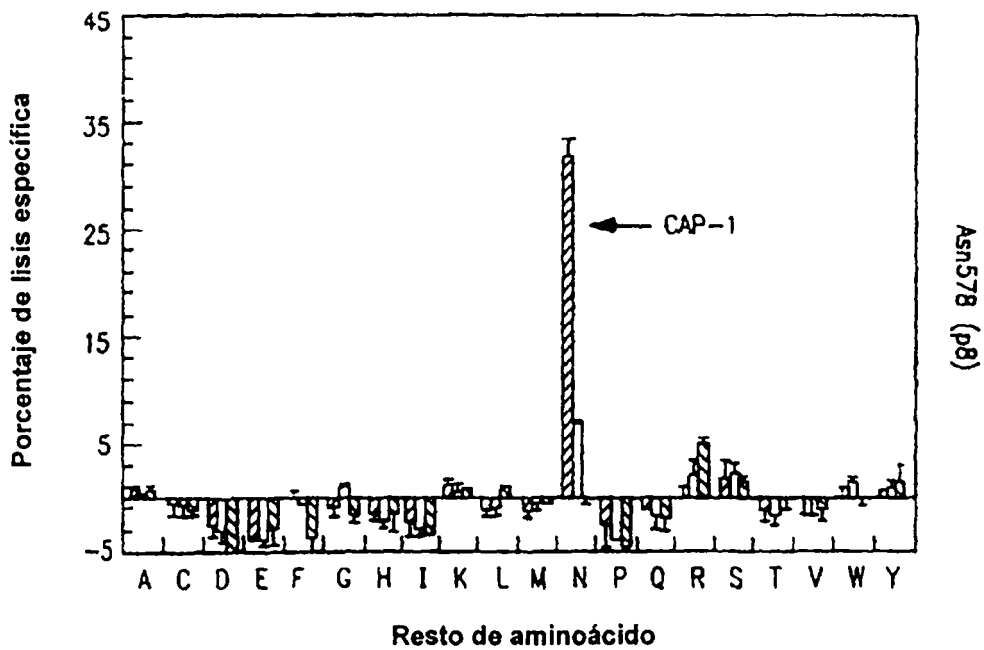


FIG. ID

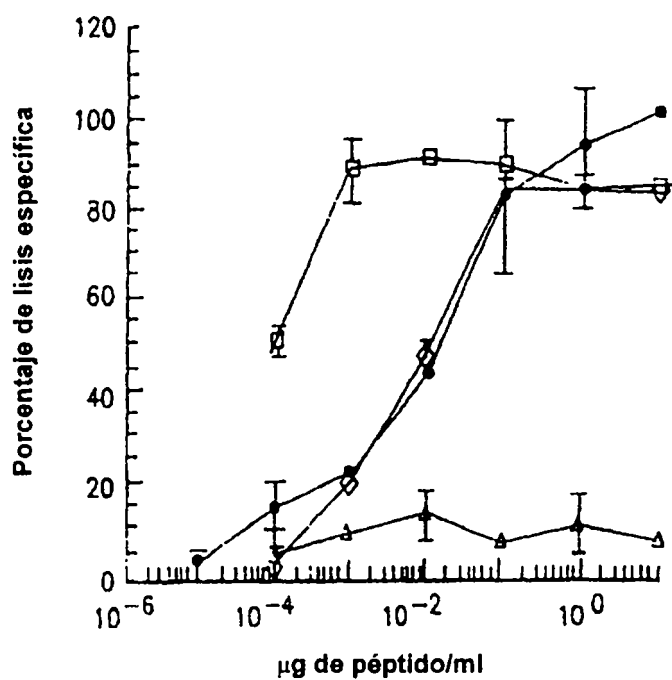


FIG. 2A

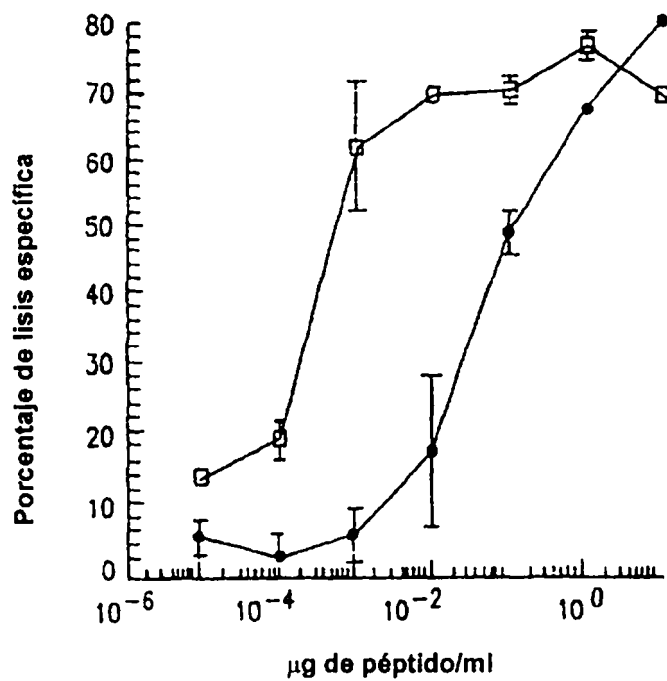


FIG. 2B

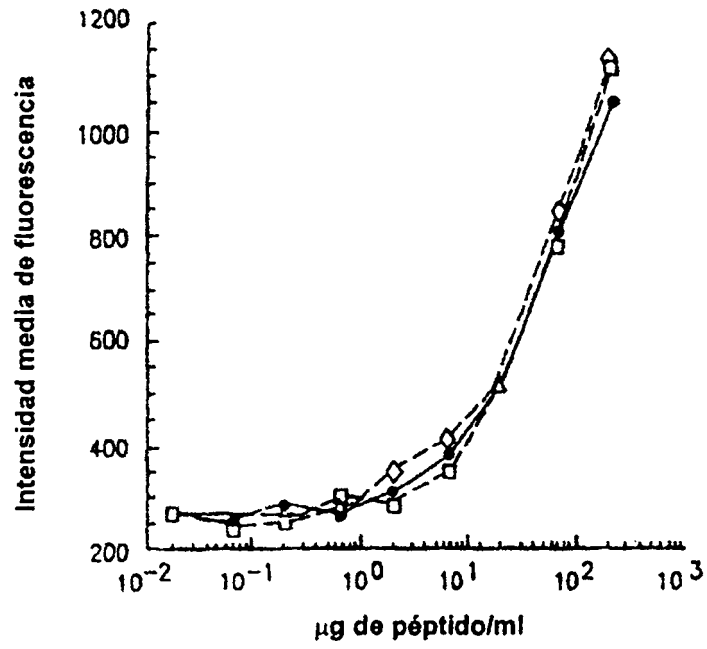


FIG. 3A

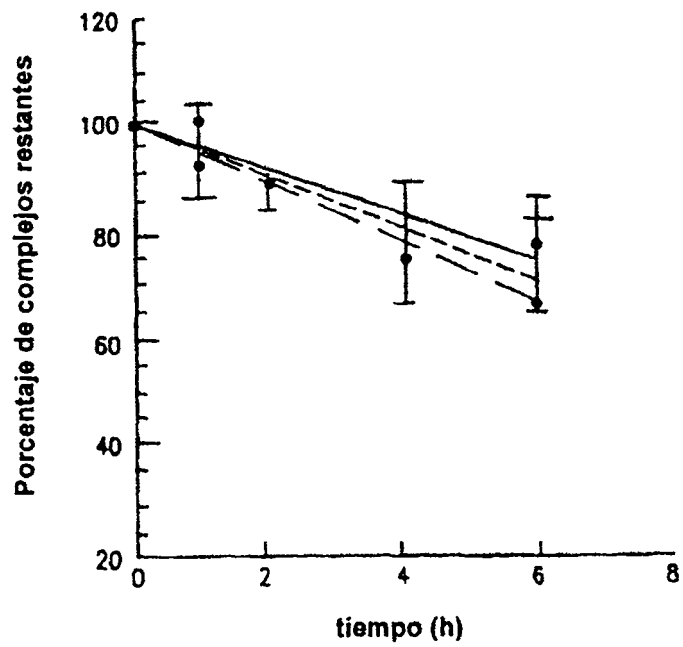


FIG. 3B

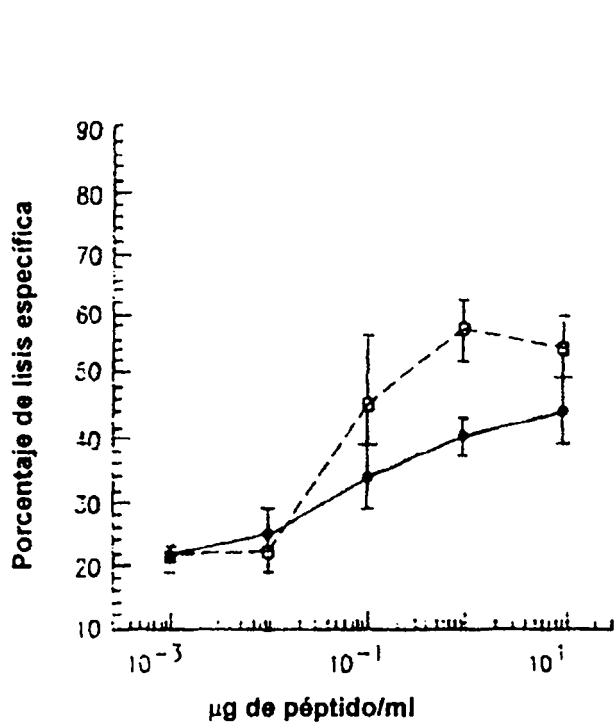


FIG. 4A

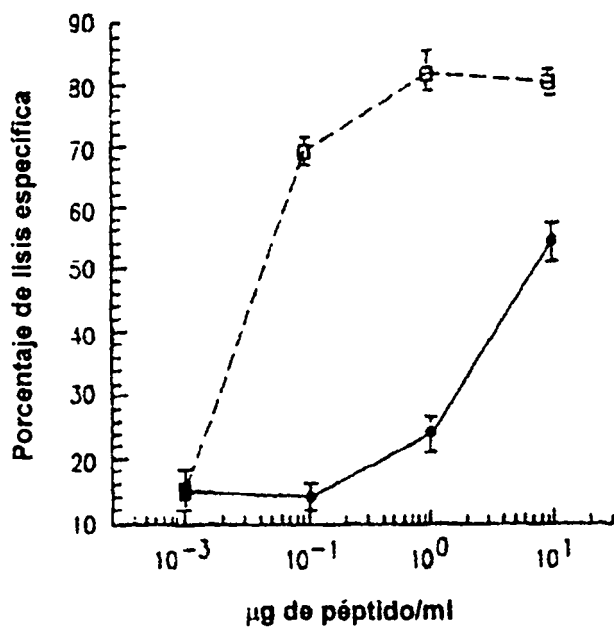


FIG. 4B

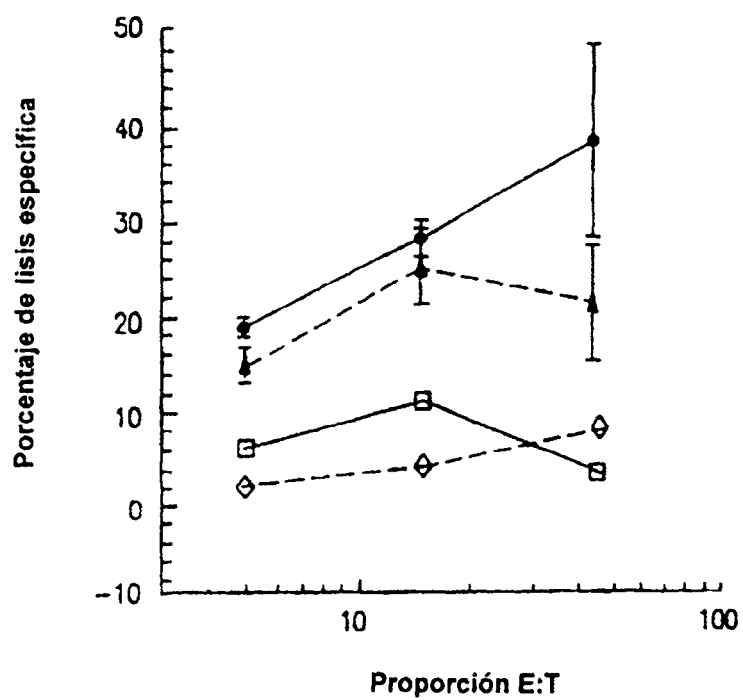


FIG. 5A

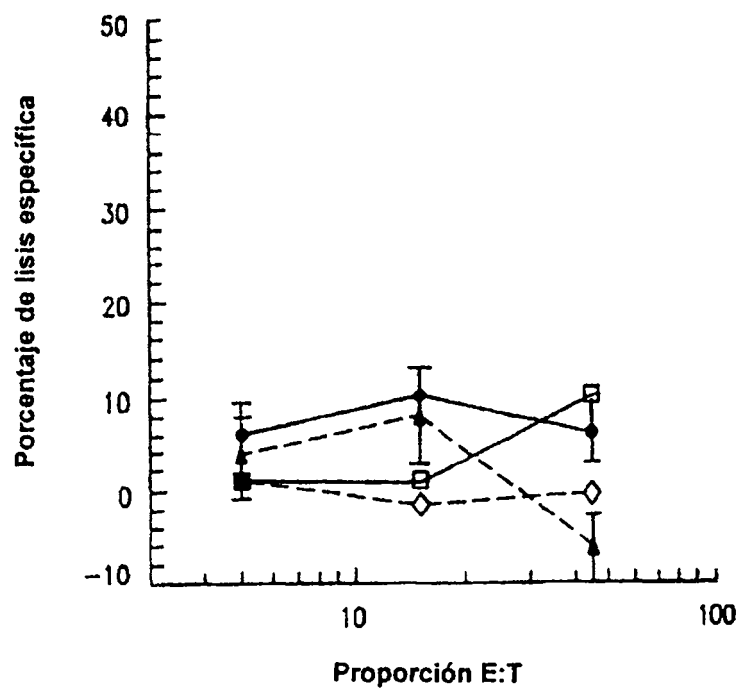


FIG. 5B

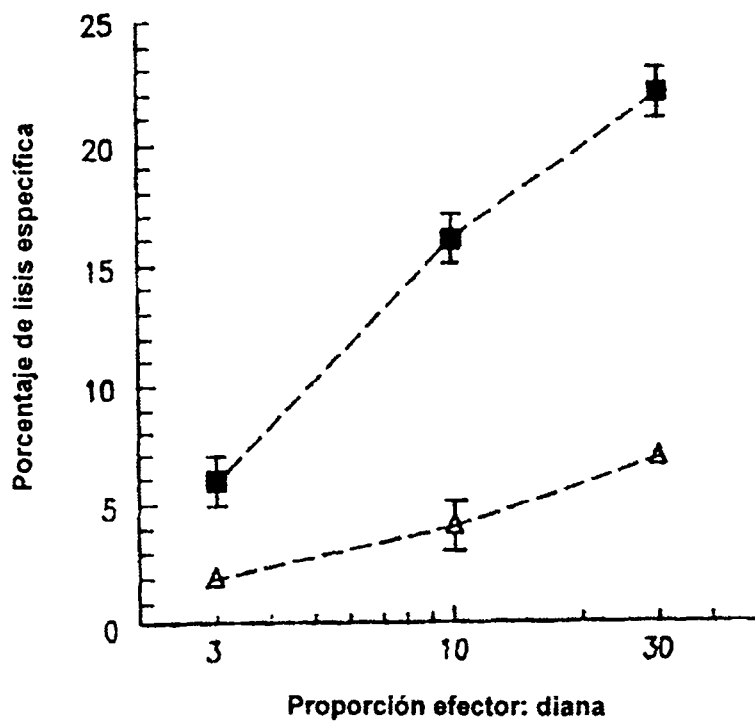


FIG. 6

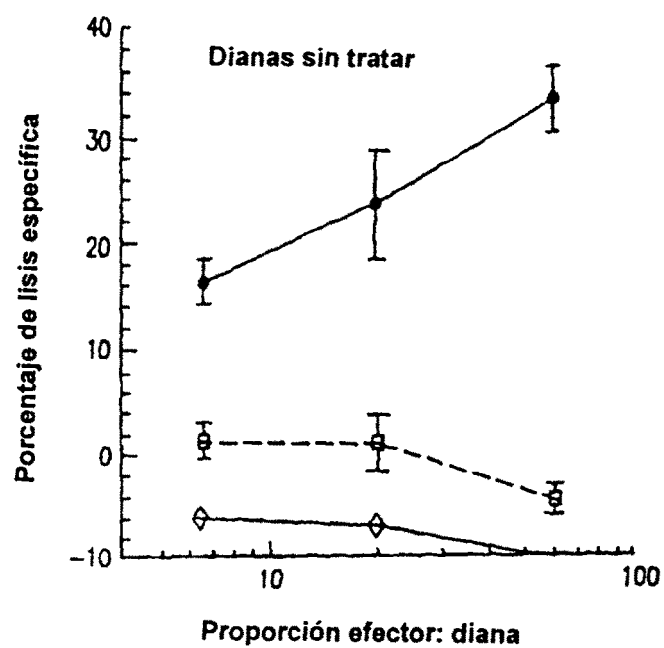


FIG. 7A

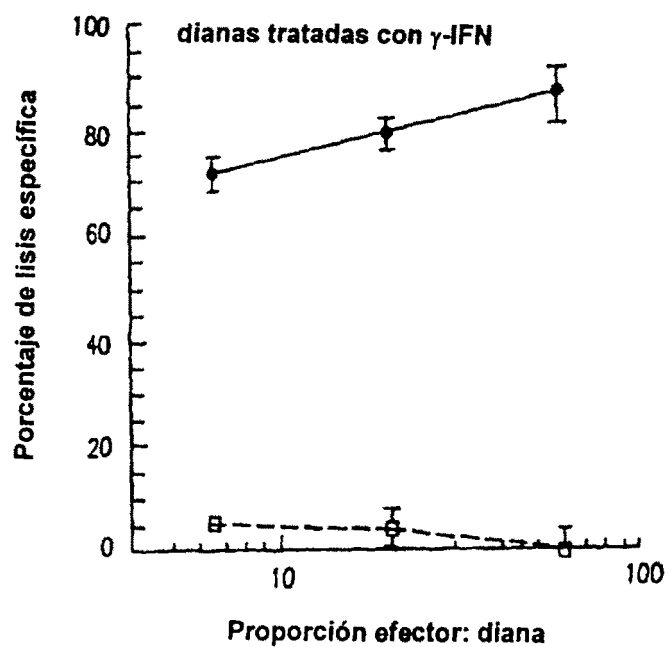


FIG. 7B

ES 2 286 530 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA ET

5 <120> PÉPTIDOS ANTAGONISTAS DEL ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO (CEA)
<130> 21-66EPT1

<140> EP 04 011 673.3

10 <141> 1998-09-22

<150> US60/061,589
<151> 1997-10-10

15 <160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

20 <210> 1
<211> 9
<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

30 Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

40 Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Leu Asn Leu
1 5

45 <210> 3
<211> 9
<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

55 Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Ile Asn Leu
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

65 Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Ile Asn Leu
1 5

ES 2 286 530 T3

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 5
10 Tyr Leu Ser Gly Ala Cys Leu Asn Leu
1 5

<210> 6
15 <211> 27
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 6
tacctttcgg gagcgaacct caacctc 27

25 <210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 7
tacctttcgg gagcggacct caacctc 27

35 <210> 8
<211> 27
<212> DNA
40 <213> *Homo sapiens*

<400> 8
45 tacctttcgg gagcggacat caacctc 27

<210> 9
<211> 9
50 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9
55 Tyr Leu Asn Val Gln Asp Leu Asn Leu
1 5

60 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 286 530 T3

<400> 10
Tyr Leu His Asp Pro Glu Phe Asn Leu
1 5
5
<210> 11
<211> 27
<212> DNA
10 <213> *Homo sapiens*

<400> 11
15 taccttcgg gagcgaacat caacctc 27

<210> 12
<211> 27
20 <212> DNA
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 12
taccttcgg gagcgtgtct caacctc 27

30

35

40

45

50

55

60

65