

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 777**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2013** **E 17194252 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 3301447**

54 Título: **Respuesta antitumoral contra autoepítomos modificados**

30 Prioridad:

07.08.2012 GB 201214007

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
20.07.2021

73 Titular/es:

SCANCELL LIMITED (100.0%)
City Hospital, Hucknall Road
Nottingham NG5 1PB, GB

72 Inventor/es:

DURRANT, LINDA GILLIAN;
BRENTVILLE, VICTORIA ANNE y
METHERINGHAM, RACHEL LOUISE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 843 777 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

Respuesta antitumoral contra autoepítopos modificados

- 5 La presente invención se refiere, en líneas generales, al cribado de péptidos modificados que pueden usarse como dianas para inmunoterapia contra el cáncer. Estos péptidos modificados pueden usarse como vacunas o como dianas para tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAb). Dichas vacunas o mAb pueden usarse en el tratamiento del cáncer.
- 10 El foco de las respuestas inmunitarias antitumorales ha estado dirigido en gran medida a la generación de respuestas CD8 específicas de tumor debido, en parte, a la ausencia de expresión de MHC de clase II por la mayoría de los tumores sólidos. Estos tumores, por lo tanto, constituyen mejores dianas para linfocitos T CD8 que linfocitos T CD4. Sin embargo, los tratamientos que implican linfocitos T CD8 han provocado únicamente respuestas moderadas y de corta vida en los pacientes. Se ha sabido durante muchos años que las células auxiliares CD4 desempeñan una función central en la inducción de respuestas inmunitarias específicas de epítipo, ya sean mediadas por anticuerpo o por CD8. Se ha informado de que las respuestas CD8 de memoria se alteran si se inducen en ausencia de auxiliar CD4 [1,2]. Inicialmente se creyó que esto se debía a su secreción de IL-2 [3], pero más recientemente se ha creído que también se debe a la modificación/activación de las células dendríticas (DC) que a su vez activan las células CD8 [4-7]. En la mayoría de casos, esta ayuda se proporciona por epítopos CD4 exógenos originados en patógenos o insertados en vacunas. Sin embargo, las respuestas CD4 específicas de tumor también son necesarias en el sitio del tumor para potenciar la inflamación, que provoca el reclutamiento potenciado y la retención de células CD8, linfocitos NK y otros mediadores inflamatorios de la inmunidad antitumoral [8-11]. La implicación de los linfocitos T auxiliares CD4 en la inmunidad contra el cáncer se interpretó además a partir de estudios usando ratones con CD4 o MHC de clase II deficientes donde sucede la regresión del tumor, lo que indica la importancia de los linfocitos T CD4 en la erradicación de los tumores. Los informes más recientes en la bibliografía sugieren la importancia de linfocitos T CD4 reactivos de tumor que desempeñan una función directa en la erradicación del tumor, así como la acción superior de linfocitos T Th17 específicos de tumor en la mediación de la destrucción del tumor *in vivo* [12-15]. Las respuestas CD4 de alta frecuencia y avidez contra epítopos específicos de tumor pueden generarse si el repertorio no está sujeto a tolerancia [16-18]. Cuando el repertorio está sujeto a autotolerancia, la inducción de las respuestas CD4 específicas de epítipo es mucho más limitada y las respuestas resultantes son de menor frecuencia y avidez.

- Hay varios tipos de epítopos tumorales que pueden abordarse dentro de los tumores. Estos incluyen epítopos específicos de tumor y epítopos asociados a tumor. Los primeros surgen debido a mutaciones o a duplicaciones o a eliminaciones de segmentos más grandes de ADN que se adquieren durante la generación y patogénesis del tumor. Las mutaciones puntuales son difíciles de abordar por el sistema inmunitario ya que deben crear nuevos epítopos porque crean nuevos restos de anclaje que pueden unirse a MHC o nuevos aminoácidos que interactúan más fuertemente con receptores de linfocitos T o B (TCR o BCR6). Incluso si las mutaciones generan nuevos epítopos, frecuentemente se reconocen solamente por una parte pequeña de individuos con el haplotipo MHC apropiado. Las duplicaciones y las eliminaciones génicas son difíciles de abordar ya que habitualmente son únicas para cánceres individuales. Por el contrario, los epítopos asociados a tumor son epítopos normales sobreexpresados. Dichos epítopos normales habitualmente se expresan dentro del timo directamente o mediante la enzima AIRE, y los linfocitos T que reconocen estos epítopos con alta afinidad se eliminan o diferencian en linfocitos T reguladores naturales. Aunque se ha informado de respuestas CD8 contra epítopos asociados a tumor, hay muy pocas respuestas CD4 contra epítopos asociados a tumor, lo que sugiere que el repertorio contra estos epítopos está más fuertemente regulado para células CD4 que para células CD8. Las únicas respuestas CD4 presentadas son contra antígenos testiculares de cáncer que se expresan durante la embriogénesis, pero permanecen activos únicamente en los gametos en adultos y no pueden someterse a tolerancia tímica, aunque las evidencias recientes son que AIRE también puede presentar estos epítopos en el timo. El reto es, por lo tanto, encontrar un repertorio de linfocitos T que puedan reconocer autoepítopos y atacar a los tumores.

- Los autores de la invención han descubierto inesperadamente que determinadas modificaciones a los epítopos de linfocitos T o B producen epítopos que generan una respuesta inmunitaria más fuerte en comparación con los epítopos no modificados. Sorprendentemente, los autores de la invención han descubierto que determinados epítopos modificados están asociados con tumores y, por consiguiente, pueden usarse para generar una respuesta inmunitaria contra dichos tumores.

- En la técnica anterior, Irelan et al., *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 13, 2011-12-12, páginas 2625-2632, desvelan que el procesamiento de la proteína de lisozima de la clara de huevo de la gallina (HEL, siglas del inglés *hen egg-white lysozyme*) dio como resultado la citrulinación de péptidos presentados en las moléculas del MHC de clase II por las células presentadoras de antígeno. La presentación de los péptidos citrulinados pero no de los péptidos no modificados se asoció con autofagia. Pardoll et al, *Current Opinion in Immunol*, vol. 10, no. 5, 1998-10-01, páginas 588-594, revisaron el papel de las respuestas de los linfocitos T CD4⁺ sobre la inmunidad antitumoral. Ossendorp et al, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 187, no. 5, 1998-03-02, páginas 693-702, desvelan que la inducción de linfocitos T CD4⁺, específicos de tumores, a través de la vacunación con un epítipo vírico específico de linfocitos T auxiliares, contenido en un péptido sintético, da como resultado una inmunidad protectora contra

células tumorales inducidas por virus, negativas al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) de clase II. En el documento US 2011/070253 se desvelan péptidos derivados de vimentina, que contienen arginina, que tienen la capacidad de unirse al MHC de clase I.

- 5 De acuerdo con la invención, se proporciona un método de cribado *in vitro* para identificar un epítipo de linfocitos T citrulinados de un péptido diana que estimula la inmunidad antitumoral, que comprende:

el cribado del péptido diana para la inducción de una respuesta de linfocitos T específica contra un epítipo citrulinado; y

- 10 el cribado de linfocitos T específicos para el epítipo citrulinado para el reconocimiento de tumores.

El cribado para la inducción de una respuesta de los linfocitos T contra un epítipo citrulinado puede comprender la clasificación de linfocitos T CD4 y CD8 para identificar si el epítipo citrulinado es un epítipo de CD4 o CD8.

- 15 En este documento se divulga un epítipo asociado a tumor que estimula una reacción inmunitaria contra el tumor para su uso en medicina, teniendo el epítipo una modificación seleccionada de desiminación de arginina, nitración de tirosina, oxidación de triptófano y desaminación de glutamina o asparagina.

- 20 También se divulga un epítipo asociado a tumor que estimula una reacción inmunitaria contra el tumor, y/o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica dicho epítipo, para su uso en un método para tratar el cáncer, teniendo el epítipo una modificación seleccionada de desiminación de arginina, nitración de tirosina, oxidación de triptófano y desaminación de glutamina o asparagina, así como el uso de dicho epítipo y/o ácido nucleico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En el presente documento se divulga un método de tratamiento del cáncer, que comprende administrar un epítipo o un ácido nucleico divulgado en el este documento a un sujeto que necesite dicho tratamiento. El epítipo puede ser un epítipo de linfocito T o B. Los epítipos pueden usarse en solitario o en combinación. Además, pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes antineoplásicos incluyendo, aunque sin limitación, fármacos de bloqueo del punto de control tales como ipilimumab.

- 30 Una modificación preferida es la desiminación de arginina para formar citrulina. La arginina libre puede convertirse en citrulina libre por la óxido nítrico sintetasa en eucariotas y por la arginina desiminasa en bacterias. La citrulina es un aminoácido modificado pero, como no tiene ARNt, no puede incorporarse directamente en las proteínas y se produce por modificación postraduccional de la arginina por la acción de peptidilarginina desiminasa (PAD), una familia de enzimas encontrada en una diversidad de tejidos. El término "citrulinación" o "desiminación" se refiere a la modificación de arginina en citrulina, que puede ser una modificación postraduccional por la enzima PAD dentro de una secuencia peptídica. Esto se muestra en más detalle en la figura 1 de los dibujos adjuntos. En la reacción de arginina en citrulina, uno de los átomos de nitrógeno terminales de la cadena lateral de arginina se reemplaza por un oxígeno. La reacción usa una molécula de H₂O y produce amoníaco como producto secundario. Esta conversión de arginina en citrulina puede tener consecuencias importantes para la estructura y la función de las proteínas, ya que la arginina está cargada positivamente a pH neutro, mientras que la citrulina está sin cargar. Con la hidrofobicidad amentada de una proteína, puede haber cambios en el plegamiento de proteína. Hay cinco enzimas PAD, concretamente PAD1, 2, 3, 4 y 6. Aunque son muy homólogas con una identidad de secuencia de un 5-60 % a nivel de aminoácidos, tienen diferentes ubicaciones (PAD1 - epidermis y útero; PAD2 - cerebro, sistema reproductor femenino, músculo esquelético y células hematopoyéticas; PAD3 - folículo capilar y epitelio; PAD 4 - células hematopoyéticas, pulmón, esófago, carcinomas de mama y ovario; PAD 6 - ovocitos y embriones previos al implante [19]. Aunque hay algún solapamiento con respecto a las proteínas diana, cada miembro de la familia también parece abordar un conjunto único de proteínas celulares. Esto se determina por la exposición superficial y el agrupamiento de argininas que las hacen buenas dianas y secuencias flanqueantes de aminoácidos preferidas. Para PAD4, se prefieren aminoácidos pequeños no polares en las posiciones -2 y +2 y prolinas que flanquean la arginina previenen la citrulinación [20, 21]. Por tanto, no todas las argininas dentro de una proteína se citrulinan y no todas se presentan en antígenos MHC para el reconocimiento de linfocitos T.

- 55 Los epítipos citrulinados derivados de BiP, NY-ESO-1, MMP7, citoqueratinas, MUC1, CEA.CAM5, CD59, bcl2, β -catenina, CXCL8, CXCL10, CXCL12, α enolasa, proteína básica de mielina, histona, nucleofosmina, B23, complejo coactivador, antitrombina, agregano, factor 1 α de elongación, proteína asociada a adenilciclase (CAP1), proteína regulada por glucosa, ALDH2, proteína de la capa intermedia del cartílago (CLIP), aldolasa, fosfoglicerato cinasa 1 (PGK1), calreticulina, HSP60, HSP90, proteínas 1 y 2 de unión a elemento muy anterior (FUSE-BP), asporina, cathepsina D, proteína de unión a heparina, β -actina, F-actina, subunidad α -1 de la proteína del capuchón (CapZ α -1), albúmina, receptor g de histamina, precursor de proteína disulfuro-isomerasa ER60, aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2) y glucógeno sintasa cinasa-3 β (GSK3 β) pueden usarse para estimular inmunidad antineoplásica. Las referencias Uniprot para estas proteínas se exponen en la figura 32 de los dibujos adjuntos.

- 65 Se encuentran anticuerpos contra una diversidad de proteínas citrulinadas, incluyendo filagrina, colágeno, α -enolasa, fibrinógeno y vimentina en pacientes con artritis reumatoide (AR) y se usan como marcadores específicos para diagnosticar la enfermedad [22-24]. Más recientemente, se han descrito otras varias proteínas citrulinadas incluyendo histona, nucleofosmina, B23, complejo coactivador, antitrombina, agregano, factor 1 α de elongación,

proteína asociada a adenilciclase (CAP1), proteína regulada por glucosa, ALDH2, proteína de la capa intermedia del cartílago (CLIP), aldolasa, fosfoglicerato cinasa 1 (PGK1), calreticulina, HSP60, HSP90, BiP, proteínas 1 y 2 de unión a elemento muy anterior (FUSE-BP), asporina, catepsina D, proteína de unión a heparina, β -actina, F-actina, subunidad α -1 de la proteína del capuchón (CapZ α -1), albúmina, receptor de histamina, precursor de proteína disulfuro-isomerasa ER60, aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ALDH2) como dianas para anticuerpos en pacientes con AR [49]. Además, se ha postulado que la citrulina por sí misma no es suficiente para la generación de una respuesta inmunitaria; en su lugar, los aminoácidos que rodean la citrulina son esenciales en la determinación de la antigenicidad del epítipo [25-27].

Además de la citrulinación, se han observado otras varias modificaciones postraduccionales dentro de los péptidos unidos a MHC. Estos incluyen nitración de restos de tirosina [28] y oxidación de restos de triptófano [29]. La activación de macrófagos y células dendríticas incluye la producción de óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno. La exposición de proteínas puede dar lugar a la nitración de tirosinas y a un menor grado de triptófano. Las células CD4 han demostrado reconocer específicamente estas modificaciones en epítopos derivados de lisozima de huevo de gallina [29]. Sin embargo, la función de los epítopos nitrados en cualquier enfermedad aún tiene que establecerse. La presencia de altos niveles de nitrotirosinas en linfocitos de infiltración en tumor prostático sugiere la producción local de peroxinitritos. La inhibición de la actividad de la arginasa y la óxido nítrico sintetasa, enzimas clave en el metabolismo de la arginina que se expresan mucho en próstata maligna, pero no en próstata normal, redujo la nitración de tirosina y la restauración de los linfocitos de infiltración tumoral [30]. La desaminación de glutamina o de asparagina puede ser el resultado del envejecimiento, pero una proporción significativa de esta modificación se genera por mecanismos enzimáticos. La desaminación crea cadenas laterales predominantemente cargadas negativamente (glutamato o aspartato) y altera la capacidad de la glutamina y la asparagina de formar enlaces de hidrógeno. Las asparaginas pueden convertirse en aspartato por N-glucanasa y, por lo tanto, esta modificación está íntimamente ligada a la N-glucosilación. Los restos de glutamina pueden desaminarse por transglutamato tisular. La desaminación de glutamina en gliadinas del gluten del trigo de la dieta es crucial para la enfermedad celiaca, un trastorno autoinmunitario asociado con intolerancia al gluten en individuos predispuestos genéticamente. Los haplotipos HLA, DQ2 y DQ8 tienen fuerte afinidad por péptidos de gliadina desaminados y estimulan respuestas de linfocitos T contra el revestimiento gastrointestinal [31].

Un epítipo puede comprender, o consistir esencialmente en, una secuencia seleccionada de:

IQKLYGKRS, preferiblemente SQDDIKGIQKLYGKRS (MMP7 -247),
 NILTIRLTAA, preferiblemente PGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR (NYSEO-1-119),
 ILTIRLTAA, preferiblemente PGVLLKEFTVSGNILTIRLTAAADHR (NYSEO-1-119),
 EIRELQSQ, preferiblemente EEEIRELQSQISDTSVVLS (citoqueratina 8 229-247),
 AKQDMARQLREYQEL, preferiblemente AKQDMARQLREYQELMNVKL (citoqueratina 8: 363-382),
 AKQDMARQ, preferiblemente LQRAKQDMARQLREYQELM (citoqueratina 8: 360-378),
 ISSSSFSSRV, preferiblemente PGSRISSSSFSSRVGSS (citoqueratina 8: 29-44),
 PRAFSSRS, preferiblemente STSGPRAFSSRSYTSVSGPG (citoqueratina 8: 13-30),
 EAALQRAKQ, preferiblemente ELEAALQRAKQDMARQL (citoqueratina 8: 355-371),
 LEVDPNIQAVRTQE, preferiblemente LEVDPNIQAVRTQEKEQI (citoqueratina 8: 78-95), y
 QKKLKLVRT, preferiblemente AQKKLKLVRTSPEYGMP (ING4 158-174)
 LKLVRTSPE, preferiblemente AQKKLKLVRTSPEYGMP (ING4 158-174)
 KKKLKLVRTS, preferiblemente AQKKLKLVRTSPEYGMP (ING4 158-174)
 YMSSARSLS, MSSARSLSS o TEYMSSARS, preferiblemente KLATEYMSSARSLSSEEK (ING4 44-58)
 FDLFENRKK, preferiblemente RAPFDLFENRKKKNN (HSP90-346-360)
 YLNFIRGVV o FIRGVVDSE, preferiblemente IPEYLNFIRGVVDSE (HSP90 - 378-392)
 LRYYSASG, LRYYSAS o LSELLRYYT, preferiblemente RKKLSELLRYYSASGDEMVS (HSP90-456-477)
 RRRSELLRYHTSQS (HSP90 beta 456-460)
 VGVFKNGRV o FKNGRVEII, preferiblemente YSCVGVFKNGRVEII (BiP39-53)
 YFNDAQRQA, preferiblemente VPAYFNDAQRQATKDA (BiP 172-186)
 VTFEIDVNG, preferiblemente EVTFEIDVNGILRV (BiP 497-511)
 ITNDQNRLT, preferiblemente KITITNDQNRLTPEE (BiP 522-536)
 LQIVARLKN o VARLKNNNR, preferiblemente NCALQIVARLKNNNR (CXCL12-54-68)
 VEIIATMKK o RVEIIATMK, preferiblemente CPRVEIIATMKKKGE (CXCL10 57-71)

en la que uno o más de los restos R está sustituido por citrulina. En NYESO-1-119, se prefiere que el primer resto R (en la posición 136) se sustituya por citrulina. En la citoqueratina 8: 360-378, se prefiere que el segundo resto R (en la posición 369) se sustituya por citrulina. En la citoqueratina 8: 29-44, se prefiere que el segundo resto R (en la posición 40) se sustituya por citrulina. En HSP90, BiP, ING4, CXCL10 y CXCL12, se prefiere que todos los restos R dentro de las secuencias se sustituyan por citrulina. En este documento se divulga un péptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en, la secuencia de aminoácidos YVTTSTcitTYSLSGALcit, que opcionalmente comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en, la secuencia de aminoácidos citSYVTTSTcitTYSLSGALcitPSTS (vim28-49), en la que cit representa citrulina.

Un epítipo preferido es uno derivado de vimentina y que está citrulinado. Los autores de la invención han

descubierto inesperadamente que los epítomos citrulinados derivados de vimentina pueden usarse para generar una respuesta inmunitaria contra tumores incluyendo, aunque sin restricción, melanoma, tumor de mama, endometrio, colorrectal y de ovario.

Un epítipo preferido de vimentina comprende, consiste esencialmente en o consiste en, YVTTSTRTYSLG^SALR (vimentina 30-45), que opcionalmente puede estar citrulinado. Cualquiera o ambas argininas pueden estar citrulinadas. El epítipo puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en, RSYVTTSTRTYSLG^SALRPSTS (vimentina 28-49), que opcionalmente puede estar citrulinado. Una cualquiera o dos, o las tres argininas presentes pueden estar citrulinadas. Se prefiere que los tres restos R estén citrulinados. El segundo resto R (en la posición 36) puede estar sustituido por citrulina.

Los epítomos alternativos de vimentina comprenden, consisten esencialmente en o consisten en, al menos una de las siguientes secuencias:

VRLRSSVPG o RLRSSVPGV, preferiblemente SAVRLRSSVPGVR (vim65-77), y FSSLNLRET, preferiblemente LPNFSSLNLRET^NLD^SLPL (vim415-433),

en la que uno o más de los restos R está sustituido por citrulina. En vim65-77, se prefiere que el segundo resto R (en la posición 70) esté sustituido por citrulina.

Epítomos alternativos adicionales de vimentina comprenden, consisten esencialmente en o consisten en, al menos una de las siguientes secuencias:

RSSVPGVRL, SAVRLRSSV, ATRSSAVRL, YATRSSAVRLRSSVPGVRL (vim 61-79),
RSSVPGVRL, GVRLQDSV, RLRSSVPGVRLQDSVDFS (vim 69-87),
QLKGQKSR, KSRLGDL^E, EQLKGQKSR^LGLDLYEEEM (vim125-154),
ELRRQVDQL, EMRELRRQV, DLYEEEMRELRRQVDQLTN (vim 148-166),
QLTNDKARV, VEVERDNLA, LTNDKARVE, VDQLTNDKARVEVERDNLA (vim 161-179),
EVERDNLA^E, NDKARVEVERDNLAEDIMR (vim 166-184),
IMRLREKLQ, DNLAEDIMRLREKLQEEML (vim 176-194),
QREEAENTL, KLQEEMLQR, EKLQEEMLQREEAENTLQS (vim 187-205), y/o
FRQDVNAS, ENTLSFRQ, EAENTLSFRQDVNASLA (vim 198-216),

en las que uno o más de los restos R pueden estar sustituidos por citrulina. En lo anterior, los restos R preferidos para sustitución a citrulina están subrayados. La secuencia o secuencias centrales se muestran antes del epítipo.

En este documento se divulga un epítipo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en, la secuencia YVTTSTRTYSLG^SALR y que comprende opcionalmente la secuencia RSYVTTSTRTYSLG^SALRPSTS (vim28-49), y/o un ácido nucleico que codifica dicho epítipo, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

En este documento se divulga un epítipo que comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia FSSLNLRET, preferiblemente LPNFSSLNLRET^NLD^SLPL (vim415-433), y/o un ácido nucleico que codifica dicho epítipo, para su uso en un método de tratamiento de enfermedad autoinmunitaria. Los autores de la invención han descubierto que este epítipo estimula una respuesta IL10 que suprime la respuesta inmunitaria global.

Salvo que se indique de otro modo, los restos subrayados en las secuencias anteriores indican las secuencias centrales. Los aminoácidos fuera de estas secuencias centrales pueden sustituirse de forma conservativa por otros aminoácidos, preferiblemente por aminoácidos que tengan un tamaño y/o carga similar al aminoácido natural que se está reemplazando, o pueden eliminarse. De forma adicional o alternativa, 1, 2, 3, 4, 5 o todos los aminoácidos que no son del núcleo pueden sustituirse o eliminarse. Los epítomos útiles en la presente invención pueden tener una longitud, hidrofobicidad y/o carga que sea óptima para el reconocimiento por linfocitos T CD4⁺ en el contexto de moléculas HLA de clase II. Los epítomos pueden comprender al menos 13, 14, 15, 16 o más aminoácidos. Los expertos en la materia apreciarán que pueden identificarse epítomos adicionales útiles en la invención usando las diversas técnicas expuestas en el ejemplo 10 en este documento.

Los autores de la invención también han descubierto que la administración de ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que codifica vimentina de longitud completa (véase la figura 2 para la secuencia de vimentina humana. El resto de metionina en el extremo N puede incluirse o excluirse), da lugar a fuertes respuestas inmunitarias.

La vimentina (vim) está altamente conservada entre aquellas especies en las que se ha clonado el gen (pollo, ratón, perro, oveja, vaca, caballo, cerdo y ser humano). Por consiguiente, la vimentina y los epítomos derivados de vimentina, tales como los analizados anteriormente, así como los ácidos nucleicos que codifican estos, pueden usarse para tratar el cáncer en mamíferos no humanos.

El solicitante ha demostrado previamente que la incorporación de epítomos de linfocitos T dentro de una construcción de ADN de anticuerpo potencia tanto la frecuencia como la avidez de la respuesta de linfocitos T [32, 33]. Como se

analiza en más detalle en los ejemplos siguientes, los autores de la invención clonaron una diversidad de epítomos exógenos y autoepítomos en construcciones de ADN de anticuerpo y cribaron las respuestas de linfocitos T en ratones transgénicos para HLA. Todos los epítomos exógenos estimularon fuertes respuestas de linfocitos T, pero el único autoepítomo que estimuló una respuesta significativa fue vimentina 28-49. Incluso el epítomo gp100 humano, que únicamente difería en un cambio conservativo de aminoácidos del epítomo de ratón natural, estimulaba una fuerte respuesta en ratones mientras que el epítomo de ratón completamente conservado no lograba estimular una respuesta en ratones. Esto sugiere que hay tolerancia completa/eliminación de linfocitos T que reconocen el epítomo de ratón, pero no el epítomo humano muy similar. La implicación es que el epítomo humano no estimulaba respuestas de linfocitos T en seres humanos y, aunque el epítomo de ratón podría, los linfocitos T no podrán reconocer el epítomo humano procesado de forma natural dentro del tumor. Por el contrario, el autoepítomo vimentina 28-49 estimulaba una respuesta IFN γ en ratones transgénicos para HLA-DR4. Los estudios previos han demostrado que el epítomo vim 28-49 no lograba estimular una respuesta inmunitaria en donadores normales o pacientes con artritis reumatoide (AR) [34]. Por el contrario, los autores de la invención han demostrado que los pacientes con cáncer generan una respuesta inmunitaria contra vim 28-49. Esto sugiere, inesperadamente, que este epítomo no está sometido a autotolerancia y hay un repertorio de linfocitos T tanto en ratones como en seres humanos que puede reconocer y responder a este epítomo.

La vimentina (gi/4507895) es una proteína intracelular a homodimérica encontrada en filamentos intermedios (IF), específicamente IF de clase III, en células mesenquimatosas y en otras células no epiteliales. Los IF son un componente principal del citoesqueleto de células eucariotas superiores y están compuestos de varias proteínas estructuralmente relacionadas diferentes. Diferentes genes de la proteína IF se expresan en diferentes tejidos. Se han caracterizado tanto los genes de vimentina humanos como murinos (véase, por ejemplo, [35, 36]).

La vimentina, junto con otras proteínas IF, se ha usado en la clasificación histológica de tumores humanos (para las revisiones véase [37, 38]) y como marcador para la desdiferenciación en varios tipos de tumores. Se han descrito agentes de diagnóstico y agentes terapéuticos dirigidos por vimentina para enfermedad neoplásica resistente a múltiples fármacos (solicitud de patente de Estados Unidos número 20100260667), ya que tiene marcadores tumorales que se localizan con vimentina y otros IF, véase, por ejemplo, el documento WO0127269. El último describe un marcador novedoso para neuroblastomas llamado VIP54 y su uso en la detección y formación de imágenes celulares de IF como marcador del desarrollo y la progresión tumoral. Se conocen otros varios ejemplos que muestran cambios en el nivel expresado y en la distribución intracelular de vimentina en diferentes tipos de tumores sólidos humanos y líneas celulares de tumores sólidos [39, 40]. Sin embargo, hasta ahora no hay demostración de respuestas de linfocitos T contra vimentina no modificada.

La vimentina humana es una proteína de 57 kDa, que comprende 466 aminoácidos (véase la figura 2 de los dibujos adjuntos) y es una de las proteínas más ampliamente expresada y altamente conservada de la familia de proteínas IF de tipo III. Está ausente en el citosol, pero se expresa en el núcleo y como una proteína extracelular. Está implicada en la organización dinámica del citoesqueleto, con una función vital en el transporte de orgánulos, la migración celular y la proliferación.

Transición mesenquimatosa epitelial (EMT); La vimentina también se sobreexpresa en diversos cánceres epiteliales, incluyendo cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer pulmonar, melanoma maligno y tumores del sistema nervioso central. También se encuentra en cáncer cervical [41], carcinoma renal de células claras [42], determinados tipos de linfomas [43], carcinoma papilar de tiroides [44] y carcinomas de endometrio [45]. Su sobreexpresión en cáncer se correlaciona con crecimiento tumoral acelerado, invasión y mal pronóstico. En cánceres gástricos, la expresión de vimentina se ha asociado muy frecuentemente con el fenotipo invasivo de cáncer gástrico y se sugiere que desempeña una función importante en la metástasis de carcinomas gástricos, así como servir como marcador de pronóstico [46, 47]. Los sarcomas de tejido blando y algunos cánceres epiteliales que muestran fenotipos de transición epitelial a mesenquimatoso (EMT) expresan vimentina. El cambio de células de carcinoma de un fenotipo de tipo epitelial a mesenquimatoso mediante EMT se reconoce como una etapa pertinente en la metástasis de tumores sólidos (véase la figura 3 de los dibujos adjuntos). Adicionalmente, este cambio fenotípico de las células de carcinoma está asociado con la adquisición de mecanismos de resistencia tumoral que reducen los efectos antitumorales de la radiación, la quimioterapia y algunos tratamientos dirigidos a moléculas pequeñas. Aunque la vimentina está reconocida como un marcador para EMT, su función en la tumorigénesis sigue sin estar clara. Uno de los inductores más estudiados de EMT es TGF β , que ha mostrado en múltiples tipos de tumor cooperar con las rutas de señalización de RTK u otras rutas para dirigir las células tumorales hacia un fenotipo más mesenquimatoso, metastásico. Ivaska [48] ha demostrado que la vimentina contribuye a EMT regulando por aumento la expresión génica de varios genes ligados a EMT, especialmente la expresión del receptor tirosina cinasa Axl promigrador. Varios estudios apoyan la noción de que la vimentina funciona como regulador positivo de EMT y su regulación por aumento es un requisito previo para la inducción de EMT [48, 49]. Todos los cánceres mencionados anteriormente pueden tratarse, independientemente del epítomo, así como el cáncer de ovario y gastrointestinal. Puede tratarse el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar, melanoma maligno, tumores del sistema nervioso central, cáncer cervical, carcinoma renal de células claras, linfomas, carcinoma papilar de tiroides y carcinomas de endometrio.

La vimentina 28-49 y otros epítomos pueden suministrarse *in vivo* como un péptido, opcionalmente en forma de

péptido como se divulga en el documento WO02/058728. Los autores de la invención han descubierto sorprendentemente cuales son los epítomos dan lugar a fuertes respuestas inmunitarias cuando se administran como un péptido. Dichos epítomos pueden administrarse como únicamente la secuencia del epítomo, o como un polipéptido que contiene el epítomo, o incluso como la proteína de longitud completa. Como alternativa, los epítomos pueden administrarse *in vivo* como un ácido nucleico que codifica el epítomo, que codifica un polipéptido que contiene el epítomo o incluso que codifica la proteína de longitud completa. Dichos ácidos nucleicos pueden estar en forma de un mini gen, es decir, que codifica una secuencia líder y el epítomo o una secuencia líder y la proteína de longitud completa. Como alternativa, pueden estar en forma de ácidos nucleicos como se divulga en el documento WO2008/116937. En este documento se divulga un ácido nucleico que comprende al menos una secuencia que codifica una cadena pesada recombinante de una molécula de inmunoglobulina, teniendo la cadena pesada al menos un epítomo de linfocitos T heterólogo en la misma, en la que el epítomo de linfocitos T es un epítomo divulgado en este documento, preferiblemente vimentina 28-49. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende además un promotor no específico, y puede ser ADN. La molécula de inmunoglobulina puede ser un anticuerpo. El epítomo puede insertarse en una CDR de la cadena pesada, preferentemente CDR3 de la cadena pesada. Los ácidos nucleicos que codifican epítomos útiles en la presente invención pueden dirigirse a células presentadoras de antígeno y a otras células que expresan enzimas PAD, preferiblemente enzimas PAD4. Los ácidos nucleicos divulgados en este documento pueden dirigirse, incluyendo un ácido nucleico de acuerdo con un agente de dirección, tal como Fc o un anticuerpo monoclonal dirigido a un antígeno diferente en APC, por ejemplo, mAb anti-DEC205 o mediante una inyección intradérmica ya que la piel tiene una gran cantidad de APC.

Los estudios previos habían demostrado que vim 26-44 citrulinada en las posiciones 28 y 36, vim 36-54 citrulinada en las posiciones 36 y 45 y vim 415-433 citrulinada en la posición 424 pueden estimular respuestas de linfocitos T en ratones HLA-DR4 y/o pacientes con AR [34]. Como se describe en detalle en los ejemplos, para ensayar si los epítomos vim dentro de una construcción de ADN estaban estimulando respuestas inmunitarias contra vimentina citrulinada, se inmunizaron ratones con ADN que codificaba los epítomos de vimentina y se cribaron para respuestas contra los epítomos no modificados y citrulinados. Los ratones inmunizados con ADN de vim 28-49 o ADN que codifica la secuencia de vimentina completa respondieron más fuertemente al epítomo 28-49 citrulinado que los epítomos de tipo silvestre. Esto sugiere que, cuando se traduce el ADN, los epítomos vim se citrulinan, el epítomo citrulinado se une con mayor afinidad a MHC o que los linfocitos T estimulados con epítomos vim no modificados reconocen los epítomos citrulinados con más avidez.

En contraste con vim 28-49, el ADN de vim 415-433 o ADN que codifica la secuencia de vimentina completa únicamente estimulaba respuestas que reconocían el epítomo vim415-433 citrulinado, pero no vim415-433 de tipo silvestre, lo que confirma que el ADN dentro de las células presentadoras de antígeno (APC) se estaba traduciendo en un péptido que se estaba citrulinando. En este contexto, recientemente se ha demostrado que las células dendríticas expresan las enzimas de citrulinación PAD2 y PAD4 [51]. Fue de interés adicional que el ADN que codifica vim 415-433 diera una fuerte respuesta Th17. Las vacunas de ADN que codifican epítomos de MMP7 y NY-ESO-1 también estimularon linfocitos T que podían reconocer epítomos citrulinados y no modificados. La respuesta MMP-7 era predominantemente Th17 mientras que la respuesta NYESO-1 era predominantemente Th1. Asimismo, los pacientes con cáncer muestran respuestas contra estos péptidos MMP7 y NYESO-1 modificados y no modificados.

Ha habido varios informes que indican que los monocitos expresan enzimas PAD [27, 52, 53]. Más recientemente, se ha demostrado que las células dendríticas derivadas de médula ósea y también los macrófagos peritoneales expresan PAD2 y PAD4 [51]. La citrulinación como parte del proceso inflamatorio está únicamente comenzando a explotarse. La estimulación de células mononucleares de sangre periférica con IFN γ y ARN bicatenario causa citrulinación de las quimiocinas CXCL8 y CXCL10, con un efecto fundamental sobre su uso de receptor, el procesamiento proteolítico y las actividades biológicas [54-56]. Esto puede implicar que los mediadores de sobrecarga celular mediante receptores TOLL, receptores DAMP u otras proteínas de choque térmico pueden permitir la activación fisiológica de enzimas PAD tanto dentro de las APC como dentro de las células diana, tales como células infectadas o células tumorales, para permitir la ruptura de la tolerancia a autoepítomos modificados y la inducción de respuestas inmunitarias. La citrulinación dentro de células dendríticas parece estar relacionada con autofagia [57], pero esto se ha demostrado únicamente con lisozima de huevo de gallina. Como se divulga en este documento, el ADN que codifica epítomos no modificados puede estimular respuestas de linfocitos T que son específicas para el epítomo citrulinado. Esto implica que el ADN debe traducirse y citrulinarse de forma postraducciona dentro de las APC para estimular los linfocitos T que son específicos para el epítomo citrulinado. Esta es la primera vez que las vacunas de ácido nucleico han demostrado estimular la citrulinación. No hay informes de tumores que citrulinan ningún epítomo presentado en moléculas MHC.

Además de mostrar que esos epítomos codificantes dentro del ADN de anticuerpo dan respuestas de mayor frecuencia y mayor avidez, los autores de la invención también han demostrado en este documento que los péptidos citrulinados pueden estimular respuestas de linfocitos T. Los péptidos vim 28-49 citrulinados estimulaban respuestas predominantemente Th1 que reconocían epítomos modificados, aunque hubo algo de reacción cruzada contra péptidos de tipo silvestre. El péptido vim 28-49 de tipo silvestre estimuló respuestas Th1 contra epítomos tanto de tipo silvestre como modificados. Cuando los pacientes con cáncer se estimularon con cualquier péptido, 2/11 respondieron a los epítomos no modificados y 5/11 a vim 28-49 citrulinada. Hill *et al.* [50] ha demostrado previamente

que un epítipo vim 65-77 citrulinado modificado que sustituye A por L en la posición 33 se une más fuertemente a HLA-DR4 que el epítipo no modificado. Sin embargo, este es un antígeno sintético y se ha demostrado en ratones transgénicos para DR4 que el epítipo vim 65-77 natural incluso si está citrulinado no induce respuestas inmunitarias [34]. En contraste, se ha demostrado en ratones HLA-DR4, que los péptidos vim 28-49 y vim 65-77 citrulinados estimulaban respuestas Th1 que reconocían predominantemente el epítipo modificado, mientras que el epítipo de tipo silvestre era un mal inmunógeno. El análisis adicional confirmó que estas respuestas estaban mediadas por linfocitos T CD4. Vim65-77 citrulinada también estimulaba respuestas en ratones transgénicos HLA-A2.DR1. Sin embargo, el análisis adicional reveló que esta era una respuesta CD8 y el epítipo específico era RLcitSSVPGV. Este es el primer epítipo CD8 citrulinado descrito.

Inesperadamente, se ha demostrado en pacientes con cáncer, que 4/9 pacientes respondían a vim 65-77 y 4/9 a vim 65-77 citrulinada, pero únicamente dos de estos pacientes respondían a ambos péptidos. Como con la inmunización con ADN, los ratones inmunizados con péptido vim 415-433 citrulinado estimulaban respuestas que eran específicas para los epítipos modificados, mientras que el epítipo de tipo silvestre no lograba estimular una respuesta. Además, el péptido vim 415-433 citrulinado estimulaba una respuesta IL-17 muy fuerte. En contraste, en pacientes con cáncer, 8/11 respondieron al epítipo de tipo silvestre mientras que únicamente 5/11 respondieron a vim 415-433 citrulinado. Esto sugiere que tanto los epítipos no modificados como los modificados pueden estimular respuestas de linfocitos T en pacientes y que estas respuestas de linfocitos T no siempre reaccionan de forma cruzada. Esto es también la primera demostración de que los pacientes con cáncer pueden responder a epítipos citrulinados, que previamente se había mostrado restringida a pacientes con AR.

Los péptidos modificados y el ADN que codifica dichos péptidos pueden estimular respuestas inmunitarias contra epítipos modificados, y estos epítipos modificados se expresan por células tumorales diana. La vimentina citrulinada está presente en macrófagos inflamatorios [58, 59] y se observa durante la apoptosis inducida por ionóforo de calcio de macrófagos humanos y de ratón. Los macrófagos expresan PAD tanto a nivel de ARN como a nivel de proteína [60] y la vimentina citrulinada se expresan *in vitro* en células de tipo macrófago después del flujo entrante de Ca^{2+} inducido por ionóforo [27, 58]. Sin embargo, normalmente la concentración citosólica de Ca^{2+} (aproximadamente 10^{-7}M) es demasiado baja para la actividad de la enzima PAD. La concentración mínima de Ca^{2+} necesaria para la actividad de PAD es aproximadamente 100 veces superior que la concentración citosólica normal de Ca^{2+} . Como estos ionóforos y el flujo entrante de Ca^{2+} concomitante causan apoptosis, se sugirió que la citrulinación de vimentina está asociada con la apoptosis. De hecho, la citrulina desempeña una función importante en la preparación de las proteínas intracelulares para su degradación durante la apoptosis. Se ha demostrado que la vimentina se citrulina en macrófagos que experimentan apoptosis, y se demostró que se generaban anticuerpos contra la vimentina citrulinada en el caso de disposición inapropiada de material apoptótico [27]. Dichos estudios sugieren una función importante para las modificaciones postraduccionales en la regulación de la función de la vimentina especialmente dado que las modificaciones parecen específicas de célula y tejido. Sin embargo, si las PAD se activan únicamente en células tumorales apoptóticas, entonces las proteínas citrulinadas serían malas dianas ya que estas células ya están muriendo. Sin embargo, los autores de la invención han demostrado que los linfocitos T que reconocen epítipos modificados generan potentes respuestas antitumorales, lo que sugiere que las células tumorales viables como las APC pueden liberar localmente altos niveles de calcio intracelular que provoca citrulinación de las proteínas diana. Además, los linfocitos T inducidos por vim 415-433 y vim 28-49 citrulinadas inducen linfocitos T CD4 que pueden reconocer y eliminar células tumorales en el contexto de MHC de clase II y expresión de epítipo, pero no células normales.

Aunque se demostró que vim 415-433 citrulinada estimulaba respuesta de linfocitos T mientras que el epítipo no modificado no, esto podría haberse relacionado con la diferencia de dos aminoácidos entre vim 415-433 humana y de ratón. Los ratones se criaron, por lo tanto, para respuestas contra el epítipo de ratón. Los ratones inmunizados con vimentina humana citrulinada reconocían la vimentina de ratón. Además, como el epítipo humano, este era de una respuesta Th1/Th17. Previamente, la inducción de respuestas Th1 o Th17 ha demostrado estar fuertemente influida por adyuvantes inmunitarios que crean el medio correcto de citocinas para las respuestas apropiadas. IFN γ y IL-12 activan la diferenciación de células Th1. Las células Th1 producen IFN γ , IL-2, TNF y GM-CSF y estimulan, por ejemplo, la activación de linfocitos T CD8+. En contraste, las células Th2 se diferencian por IL-4. Secretan IL-4, IL-5 e IL-13 y ayudan a los linfocitos B en la producción de anticuerpos y regulan por disminución las respuestas proinflamatorias inducidas por células Th1. TGF β , IL-1, IL-6, IL-21 e IL-23 activan la diferenciación de células Th17. Producen IL-17 e IL-6. Los linfocitos T CD4 $^{+}$ se diferencian en iTreg en ausencia de citocinas proinflamatorias, pero altas concentraciones de TGF β (véase la figura 4 de los dibujos adjuntos). Estas células secretan TGF β e IL-10, y se caracterizan por la secuencia p3 del factor de transcripción Forkhead (Foxp3). Controlan y contrarrestan las respuestas inmunitarias por otras células T efectoras, y están implicados en la prevención de autoinmunidad [61].

El péptido vim 415-433 citrulinado, por lo tanto, se inmunizó con una diversidad de adyuvantes o, de hecho, sin adyuvante. Los adyuvantes inmunoestimuladores tales como CpG/MPLA y GM-CSF estimulaban ambas respuestas Th1/Th17 y eran necesarios, ya que no hubo respuesta en ausencia de adyuvante. Los adyuvantes inertes tales como alumbre y adyuvante incompleto de Freund causaban inducción de respuestas predominantemente IL-10 similar a esa inmunización con péptido vim 415-433 de tipo silvestre que también inducía una respuesta IL-10, lo que sugiere la inducción de una respuesta iTreg. En contraste, la combinación de péptido vim 415-433 citrulinado con un adyuvante óptimo indujo una respuesta IFN γ /IL-17, lo que sugiere una respuesta Th17. Esta es la primera ilustración

de que los epítomos de linfocitos T pueden determinar la diferenciación de linfocitos T auxiliares.

Como los ratones respondieron con una fuerte respuesta Th1/Th17 a una única inmunización con péptido 415-433 citrulinado, esto puede haber reflejado un refuerzo a una respuesta Treg natural. Sin embargo, la reducción de Treg naturales no logró influir en la frecuencia o la avidez de la respuesta inmunitaria a vim 415-433 citrulinada, lo que sugiere que esto era improbable. Puede ser que el epítipo vim 415-433 de tipo silvestre presentado *in situ* hubiera estimulado una respuesta iTreg, caracterizada por la producción de IL-10. De hecho, los ratones inmunizados con péptido vim 415-433 citrulinado generaron respuestas IFN γ , IL-17 e IL-10 mientras que los ratones inmunizados con epítipo no modificado únicamente estimularon una respuesta IL-10. El péptido vim 415-433 no modificado también estimuló respuestas IL-10 en pacientes con cáncer. Los mab anti-CTLA-4 pueden bloquear la interacción de CTLA-4 con su receptor afín CD80/86, evitando de este modo la inhibición de linfocitos T inducidos por este ligando. La inmunización de ratones con péptido vim 415-433 citrulinado en presencia de un mab anti-CTLA-4 aumentó significativamente la avidez de la respuesta de linfocitos T de 10^{-6} M a 10^{-8} M.

En este documento se divulga un epítipo modificado que estimula una reacción inmunitaria IL-10 contra autoantígenos, y/o un ácido nucleico que codifica dicho epítipo, para su uso en medicina, teniendo el epítipo una modificación seleccionada de desiminación de arginina en citrulina, nitración de tirosina, oxidación de triptófano y desaminación de glutamina o asparagina. En este documento se divulga un método para modular la diferenciación de linfocitos T auxiliares, que comprende poner en contacto un linfocito T auxiliar con un epítipo y/o ácido nucleico como se define en este documento y opcionalmente un adyuvante. En este documento se divulga un epítipo y/o un ácido nucleico como se define en este documento y opcionalmente un adyuvante para su uso en un método de modulación de la diferenciación de linfocitos T auxiliares. En este documento se divulga el uso de un epítipo y/o un ácido nucleico como se define en este documento y opcionalmente un adyuvante en la fabricación de un medicamento para modular la diferenciación de linfocitos T auxiliares. Los epítipos útiles en estos métodos pueden ser un epítipo como se divulga en este documento, y/o puede ser un epítipo modificado que estimula una reacción inmunitaria IL-10 contra autoantígenos, teniendo el epítipo una modificación seleccionada de desiminación de arginina en citrulina, nitración de tirosina, oxidación de triptófano y desaminación de glutamina o asparagina. El adyuvante puede ser adyuvante incompleto de Freund, CpG, MPLA, GMCSF y adyuvante completo de Freund.

Los epítipos y/o ácidos nucleicos útiles en este documento pueden usarse para dirigir la diferenciación de linfocitos T auxiliares para estimular una respuesta inmunitaria. Por tanto, pueden usarse junto con vacunas para aumentar la eficacia de dichas vacunas. Como se demostró por los autores de la invención, el péptido vim 415-433 citrulinado inducía una respuesta IFN γ /IL-17, lo que sugiere una respuesta Th17. Esto está en contraste con la respuesta normal para vim 415-433 y otros autoepítipos, que causan diferenciación de linfocitos T auxiliares en células iTreg.

Como alternativa, los epítipos y/o ácidos nucleicos útiles en la invención pueden usarse para dirigir la diferenciación de linfocitos T auxiliares para suprimir una respuesta inmunitaria. ING4 citrulinado da lugar a una respuesta IL-10, lo que sugiere una respuesta iTreg y supresión de una respuesta inmunitaria. Dichos epítipos pueden usarse en el tratamiento de enfermedades en las que se desea supresión inmunitaria, tales como enfermedades autoinmunitarias y la enfermedad del injerto contra hospedador (EICH). Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias incluyen alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, celiaquía-dermatitis, síndrome inmunitario de fatiga crónica, síndrome de deficiencia (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, penfigoide cicatricial, enfermedad de las aglutininas frías, síndrome CREST, enfermedad de Crohn, enfermedad de Dego, dermatomiositis, dermatomiositis - juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia esencial mixta, fibromialgia - fibromiositis, enfermedad de Grave, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes insulino dependiente (tipo I), artritis juvenil, lupus, enfermedad de Meniere, enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, síndrome de Stiff-Man, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de gigantocitos, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

En este documento se divulga un método de predicción de la supervivencia en cáncer colorrectal, que comprende determinar el nivel de peptidilarginina desiminasa 4 (PAD4) en una célula de cáncer colorrectal. Un 94 % de los tumores expresan PAD4. Las células tumorales que pierden la expresión de PAD4 indican un mal pronóstico y sugieren una supervivencia reducida. Por tanto, si un cáncer colorrectal muestra poca o ninguna expresión de PAD4, entonces el paciente tiene un mal pronóstico. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, esto puede estar relacionado con la ausencia de epítipos citrulinados que pueden reconocerse y eliminarse por linfocitos T. Por tanto, el tumor evade el control inmunitario. A la inversa, si el tumor expresa PAD4, entonces las dianas se desiminan, se controla el crecimiento tumoral por la respuesta inmunitaria y paciente tiene un mejor pronóstico.

El nivel de PAD4 puede determinarse usando un anticuerpo u otro inmunoensayo para medir la cantidad de la

proteína PAD4 en la célula. Como alternativa, puede medirse el nivel de ARNm de PAD4 por hibridación *in situ*. Los expertos en la materia serán conscientes de técnicas alternativas adecuadas para determinar el nivel de ARNm, así como técnicas alternativas para determinar el nivel de una proteína.

Un 90 % de los tumores colorrectales expresaban vimentina, que se encuentra principalmente en células estromales e infiltrantes. En un 15 % de las células, algunas células epiteliales también se tiñeron y en un 12 % de los tumores se tiñó más de un 75 % de todas las células. Únicamente un 6 % de los tumores colorrectales no lograron teñirse con un mAb específico de PAD4. EL análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que hay una correlación con intensidad de PAD4 y supervivencia. En un modelo de múltiples variables, la fase de TNM ($p < 0,0001$), la invasión vascular ($p < 0,0001$) y la expresión de PAD4 ($p = 0,004$) fueron indicadores independientes de la supervivencia del paciente, lo que sugiere que PAD4 podría ser un marcador de pronóstico útil en cáncer colorrectal. Hubo una correlación entre la expresión de PAD4 y BCL2 ($p = 0,01$), β -catenina ($p = 0,001$), el número de linfocitos T CD8 ($p = 0,006$), MUC1 ($p = 0,000$), CEA ($p = 0,000$), CD59 ($p = 0,038$) y vimentina ($p = 0,000$), lo que sugiere que todas estas pueden ser dianas para proteínas modificadas.

En experimentos realizados por los autores de la invención, un 89 % de los tumores de ovario se tiñeron fuertemente para vimentina y únicamente un 4 % no logró teñirse con un anticuerpo anti-PAD4. Además, un 82 % también expresó citrulina, lo que sugiere que la enzima estaba activa. La expresión de PAD4 se correlacionaba con las proteínas relacionadas con sobrecarga RAET1E y ULBP1, lo que sugiere activación de esta enzima cuando las células se sobrecargan. También hubo una fuerte correlación con vimentina, lo que sugiere que la vimentina citrulinada es una buena diana en cáncer de ovario. HMGB1 se expresó por un 87 % de los tumores y también se correlacionó con la expresión de vimentina.

En este documento se divulga un método de predicción de la supervivencia en cáncer de ovario, que comprende determinar el nivel de peptidilarginina desiminasa 2 (PAD2) y/o proteína B1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) en una célula de cáncer de ovario. Un 91 % de los tumores expresan PAD2. Las células tumorales que pierden la expresión de PAD2 indican un mal pronóstico y sugieren una supervivencia reducida. Por tanto, si un cáncer de ovario muestra poca o ninguna expresión de PAD2, entonces el paciente tiene un mal pronóstico. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, esto puede estar relacionado con la ausencia de epítomos citrulinados que pueden reconocerse y eliminarse por linfocitos T. Por tanto, el tumor evade el control inmunitario. A la inversa, si el tumor expresa PAD2, entonces las dianas se desminan, se controla el crecimiento tumoral por la respuesta inmunitaria y paciente tiene un mejor pronóstico.

En experimentos realizados por los autores de la invención, un 16 % de los tumores de ovario se tiñeron fuertemente para PAD2. Además, un 91 % también expresa citrulina. La expresión de PAD2 se correlaciona con la expresión de HMGB1, lo que sugiere una asociación con autofagia y con la expresión de MHC, que sugiere una vinculación con las respuestas inmunitarias.

Un 87 % de los tumores expresan HMGB1. Las células tumorales que pierden la expresión de HMGB1 indican un mejor pronóstico y sugieren una supervivencia aumentada. Los tumores con altos niveles de HMGB1 tuvieron fuerte autofagia, que es un mecanismo potente de supervivencia y está correlacionado con un mal pronóstico. Por tanto, si un cáncer de ovario muestra poca o ninguna expresión de HMGB1, entonces el paciente tiene un mal pronóstico, niveles bajos un mejor pronóstico y alta expresión un mal pronóstico.

El nivel de HMGB1 puede determinarse usando un anticuerpo u otro inmunoensayo para medir la cantidad de la proteína HMGB1 en la célula. Como alternativa, puede medirse el nivel de ARNm de HMGB1 por hibridación *in situ*. Los expertos en la materia serán conscientes de técnicas alternativas adecuadas para determinar el nivel de ARNm, así como técnicas alternativas para determinar el nivel de una proteína.

Un 87 % de los tumores de ovario expresaban HMGB1, que se encuentra principalmente en núcleos y citoplasma. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que hay una correlación con los niveles de HMGB1 y la supervivencia ($p = 0,001$). En un modelo de múltiples variables, la fase de TNM ($p < 0,0001$), el tipo de tumor ($p = 0,031$) la respuesta a quimioterapia ($p < 0,001$) y la pérdida de HMGB1 ($p = 0,002$) fueron indicadores independientes de la supervivencia del paciente, lo que sugiere que HMGB1 podría ser un marcador de pronóstico útil en cáncer de ovario.

En pacientes que mostraban expresión elevada de HMGB1 y baja de PAD2, 219 de 310 pacientes (70 %) obtuvieron la peor supervivencia media de 50 meses, y los pacientes con expresión baja de HMGB1 y baja de PAD2 presentaron la mejor supervivencia, con 41 de 310 pacientes (13 %) que tienen un tiempo de supervivencia medio de 101 meses. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, esto puede estar relacionado con la ausencia de epítomos citrulinados y la ausencia de autofagia del tumor evade el control inmunitario y tiene una mala capacidad de supervivencia.

En mamíferos, se han identificado cinco isotipos de PAD, cada uno codificado por un gen distinto, [60]. Todas estas enzimas dependen fuertemente de la presencia de Ca^{2+} para su actividad. Todos los isotipos de PAD presentan homologías de secuencia mutuas amplias. La diferencia más notable entre los isotipos es su expresión específica de

tejido. Todos los isotipos pueden citrulinar la mayoría de las proteínas con argininas accesibles *in vitro* [62], aunque determinadas proteínas se citrulinan más rápidamente que otras por PAD individuales [63]. Los estudios de péptidos indican que determinados aminoácidos que flanquean los restos de arginina influyen en su susceptibilidad a la citrulinación [20].

Todas estas enzimas dependen fuertemente de la presencia de Ca^{2+} para su actividad. Todos los isotipos de PAD presentan homologías de secuencia mutuas amplias. La diferencia más notable entre los isotipos es su expresión específica de tejido. Todos los isotipos pueden citrulinar la mayoría de las proteínas con argininas accesibles *in vitro* [62], aunque determinadas proteínas se citrulinan más rápidamente que otras por PAD individuales [63]. Los estudios de péptidos indican que determinados aminoácidos que flanquean los restos de arginina influyen en su susceptibilidad a la citrulinación [20].

EL isotipo de PAD más ampliamente expresado, PAD2, está presente en muchos tejidos diferentes, como el músculo esquelético, el cerebro, el bazo, las glándulas de secreción y los macrófagos. A pesar de este amplio patrón de expresión, únicamente la proteína de unión a mielina (MBP) en el sistema nervioso central, donde la citrulinación fisiológica es importante para asegurar el aislamiento eléctrico de las vainas de mielina, y la vimentina se han identificado como sustratos naturales. En esclerosis múltiple (EM), un trastorno inflamatorio crónico del SNC, la vaina de mielina se destruye y los pacientes generan respuestas autoinmunitarias contra MBP citrulinada. En adultos sanos, un 18 % de MBP está citrulinada mientras que en EM más de un 45 % está citrulinada, lo que da lugar a desplegamiento aumentado y degradación.

PAD1 se expresa principalmente en la epidermis y el útero y, durante la diferenciación terminal de los queratinocitos, queratinas (K1 y K10) y la proteína asociada a queratina filagrina se citrulinan. En general, la citrulinación disminuye la carga en las proteínas, lo que da lugar a desplegamiento auricular, flexibilidad reducida y cornificación de la epidermis. La psoriasis está causada por citrulinación aberrante en epidermis psoriásica por PAD1. PAD3 está restringida a folículos capilares/lanosos donde su sustrato natural es la tricolialina que es una proteína estructural principal en las células de la vaina de la raíz interior de los folículos capilares. PAD6 se expresa por células del óvulo y el embrión.

Los leucocitos inflamatorios incluyendo linfocitos T y B sinoviales, los macrófagos, los neutrófilos, así como los sinoviocitos de tipo fibroblasto expresan dos isoformas de PAD, 2 y 4 [27, 64]. A diferencia de otras PAD, que están principalmente localizadas todas en el citoplasma de las células, PAD4 está ubicada en el núcleo. La señal de localización nuclear de PAD4 se encontró en la región del extremo N de la proteína. PAD4 se expresa principalmente en granulocitos de sangre periférica y monocitos. PAD4 también se expresa por muchos tejidos tumorales, incluyendo adenocarcinomas [65]. La inmunohistoquímica también detectó la colocación de PAD4 con la citoqueratina y la transferencia de Western detectó señales de citrulina en citoqueratina extraída de tumores. Además, la citoqueratina 8, la citoqueratina 18, la citoqueratina 19 después de la citrulinación *in vitro* resistió la digestión por caspasas. Esto podría conferir una ventaja de crecimiento a los tumores. La proteína que contiene citrulina no era detectable en leucocitos periféricos aunque estas células mostraban fuerte expresión de PAD4. Se ha sugerido que la concentración de calcio es un factor clave en la activación de PAD4 y la consecuente citrulinación. Además, la citrulinación de la cápsula sinovial en artritis reumatoide (AR) se producía principalmente en sus depósitos extracelulares, mientras que la proteína citrulinada se ha ubicado dentro de las células tumorales. La citrulinación de las histonas puede alterar la expresión génica dentro de los tumores y la citrulinación de ING4 inhibe su asociación con p53, lo que da lugar a inactivación de este potente gen supresor tumoral [66].

En este documento se divulgan polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos expuesta anteriormente y/o en la tabla 3, 8, 9 o 10 y secuencias que tienen identidad sustancial con las mismas, por ejemplo, un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 99 % de identidad con las mismas, así como su uso en medicina y en particular en un método de tratamiento del cáncer. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico se determina en general alineando las secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la primera secuencia para la mejor alineación con la segunda secuencia) y comparando los restos de aminoácido o de nucleótidos en las posiciones correspondientes. La "mejor alineación" es una alineación de dos secuencias que provoca el porcentaje de identidad más elevado. EL porcentaje de identidad se determina comparando la cantidad de restos de aminoácido o nucleótidos idénticos dentro de las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático conocido para los expertos en la materia. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul modificado como en [67]. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* han incorporado dicho algoritmo [68]. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, valor = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico divulgada en este documento. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, valor = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula proteínica divulgada en este documento. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en [69]. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los

programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller [70]. El programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete del programa informático de alineación de secuencias GCG ha incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para el análisis de secuencia conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en [71] y FASTA descrito en [72]. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda.

Como se usa en este documento, el término "tratamiento" incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un ser humano o animal no humano. El polipéptido o ácido nucleico puede emplearse en combinación con un vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichos vehículos pueden incluir, aunque sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, liposomas, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

Los péptidos útiles en este documento pueden sintetizarse usando química de Fmoc u otras técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia.

Se prevé que las inyecciones serán la vía principal para la administración terapéutica de las composiciones divulgadas en este documento, aunque también puede usarse el suministro a través de un catéter u otros tubos quirúrgicos. Algunas vías adecuadas de administración incluyen administración intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal e intramuscular. Pueden utilizarse formulaciones líquidas después de su reconstitución a partir de formulaciones en polvo.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio afectado, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que es apirógena, tiene pH adecuado, es isotónica y mantiene la estabilidad. Los expertos en la materia serán muy capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como solución de cloruro de sodio, solución de Ringer o solución de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según lo necesario.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando la formulación es un líquido puede ser, por ejemplo, una solución salina fisiológica que contiene tampón que no es fosfato a pH 6,8-7,6, o un polvo liofilizado.

La composición puede administrarse de una manera localizada a un sitio tumoral u otro sitio deseado o puede suministrarse de una manera que aborde el tumor u otras células.

Las composiciones se administran preferiblemente a un individuo a una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es suficiente para mostrar un beneficio al individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y la línea temporal de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., pertenecen a la responsabilidad de los médicos de familia y otros facultativos, y normalmente se tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Las composiciones divulgadas en este documento son particularmente pertinentes para el tratamiento del cáncer, y en la prevención de la reaparición de dichas afecciones después del tratamiento inicial o la cirugía. Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences [73]. Una composición puede administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o secuencial dependiendo de la afección a tratar. Otros tratamientos contra el cáncer incluyen otros anticuerpos monoclonales, otros agentes quimioterapéuticos, otras técnicas radioterapéuticas u otra inmunoterapia conocida en la técnica. Una aplicación particular de las composiciones divulgadas en este documento es como un complemento a la cirugía, es decir, para ayudar a reducir el riesgo de la reaparición del cáncer después de eliminar un tumor. Las composiciones divulgadas en este documento pueden generarse total o parcialmente por síntesis química. La composición puede prepararse fácilmente de acuerdo con métodos convencionales y bien establecidos de síntesis de péptidos en fase líquida o, preferiblemente, fase sólida, cuyas descripciones generales están ampliamente disponibles (véase, por ejemplo, en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición [74], en The Practice of Peptide Synthesis [75] y Applied Biosystems 430A Users Manual, ABI Inc., o pueden prepararse en solución, por el método en fase líquida o por cualquier combinación de química en fase sólida, fase líquida y en solución, por ejemplo, completando en primer lugar la parte peptídica respectiva y, después, si se desea y es apropiado, después de la eliminación de cualquier grupo protector que esté presente, por la introducción del resto X por reacción del ácido carbónico o sulfónico respectivo o un derivado reactivo del mismo.

Otra manera conveniente de producir una composición divulgada en este documento, es expresar el ácido nucleico que la codifica, mediante el uso de ácido nucleico en un sistema de expresión.

En este documento se divulga un ácido nucleico aislado que codifica una composición como se divulga en este documento. En este documento se divulga un ácido nucleico que codifica una composición como se divulga en este documento. Los expertos en la materia serán capaces de determinar sustituciones, eliminaciones y/o adiciones a dichos ácidos nucleicos que aún proporcionarán una composición de la presente invención. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc o ARN tal como ARNm obtenido por clonación o producido por síntesis química. Para uso terapéutico, el ácido nucleico está preferiblemente en una forma que puede expresarse en el sujeto a tratar. El polipéptido útil en este documento o el ácido nucleico divulgado en este documento, puede proporcionarse como un aislado, en forma aislada y/o purificada, o libre o sustancialmente libre de material con el que está asociado de forma natural. En el caso de un ácido nucleico, puede estar libre o sustancialmente libre de ácido nucleico que flanquea el gen en el genoma humano, excepto posiblemente una o más secuencias reguladoras para la expresión. El ácido nucleico puede ser completa o parcialmente sintético y puede incluir ADN genómico, ADNc o ARN. Cuando el ácido nucleico divulgado en este documento incluye ARN, una referencia a la secuencia mostrada debe interpretarse como una referencia al equivalente de ARN, con U sustituyendo T.

Un experto en la materia puede preparar fácilmente secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido útil en este documento, por ejemplo, usando la información y las referencias contenidas en este documento y las técnicas conocidas en el campo técnico (por ejemplo, véase [76, 77]), dadas las secuencias de ácido nucleico y los clones disponibles. Estas técnicas incluyen (i) el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar muestras de dicho ácido nucleico, por ejemplo, de fuentes genómicas, (ii) síntesis química o (iii) preparación de secuencias de ADNc. El ADN que codifica el polipéptido puede generarse y usarse de cualquier manera adecuada conocida para los expertos en la materia, incluyendo recoger ADN codificante, identificar sitios adecuados de reconocimiento de enzimas de restricción a cualquier lado de la parte a expresar, y cortar dicha parte del ADN. La parte puede unirse entonces de forma funcional a un promotor adecuado en un sistema convencional de expresión disponible en el mercado. Otra estrategia recombinante es amplificar la parte pertinente del ADN con cebadores adecuados de PCR. Pueden hacerse modificaciones a las secuencias, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio, para dar lugar a la expresión de un péptido modificado o para tener en cuenta las preferencias de codones en las células hospedadoras usadas para expresar el ácido nucleico.

En este documento se divulgan construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un ácido nucleico como se describe anteriormente. En este documento se divulga una célula hospedadora recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. En este documento se divulga un método de producción de la composición, cuyo método comprende la expresión a partir de ácido nucleico codificante. La expresión puede conseguirse convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, puede aislarse la composición y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, después usarse según lo apropiado.

Los sistemas para la clonación y la expresión de un polipéptido en una diversidad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, sistemas de levaduras y baculovirus. Las células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un hospedador bacteriano preferido habitual es *E. coli*. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas, tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo, [78]. La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia como una opción en la producción de un miembro de unión específico, véase para una reciente revisión, por ejemplo, [79, 80].

Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según lo apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virus, por ejemplo, fagos o fagómidos, según lo apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [76]. Se describen muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y el análisis de proteínas, en detalle en Short Protocols in Molecular Biology [77].

En este documento se divulga una célula hospedadora, que puede estar aislada, que contiene el ácido nucleico como se divulga en este documento. En este documento se divulga un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus y otros virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos. La introducción puede estar seguida por la provocación o concesión de la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen.

El ácido nucleico puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración

puede promoverse por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

En este documento se divulga un método que comprende usar una construcción como se indica anteriormente en un sistema de expresión para expresar un polipéptido como se describe anteriormente.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos y los dibujos adjuntos.

Figura 1: La conversión enzimática de arginina en citrulina dentro de las proteínas está catalizada por PAD.

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de vimentina humana.

Figura 3: Cambios fenotípicos pertinentes que definen la transición epitelial a mesenquimatososa (EMT) y su proceso inverso, la transición mesenquimatososa a epitelial (MET). Figura tomada de [81].

Figura 4: Subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺. Las poblaciones principales de linfocitos T CD4⁺ que son Th1, Th2 y Th17, así como iTreg. Los Treg controlan las respuestas de las células efectoras inmunitarias. Figura tomada de Kaufmann [61].

Figura 5. Respuestas de linfocitos T CD4 contra epítomos auxiliares codificados dentro del ADN de anticuerpo. Se inmunizaron ratones transgénicos para HLA-DR4 o HLA-DR1 con una construcción de ADN de anticuerpo que contenía los epítomos auxiliares en CDRL1 o CDRH3 mediante pistola génica. Todos los ratones se inmunizaron tres veces en los días 0, 7 y 14.

Las respuestas específicas para el epítomo auxiliar se analizaron *ex vivo* en el día 20 por ensayo Elispot de IFN γ contra el péptido auxiliar pertinente y un control irrelevante. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 6. El epítomo auxiliar de vimentina 28-49 insertado en el sitio CDRH3 del vector de expresión doble de ADN de anticuerpo hulgG1 se procesa, citrulina y presenta *in vivo*.

Se inmunizaron ratones transgénicos para HLA-DR4 con la construcción de ADN de anticuerpo mediante pistola génica una vez a la semana durante 3 semanas consecutivas. En el día 19, se analizaron los esplenocitos *in vitro* contra vimentina 28-49 de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 μ M por elispot (i) IFN gamma, (ii) IL-17 y (iii) IL-2.

Figura 7. El epítomo auxiliar de vimentina 415-433 insertado en el sitio CDRH3 del vector de expresión doble de ADN de anticuerpo hulgG1 se procesa, citrulina y presenta *in vivo*.

Se inmunizaron ratones transgénicos para HLA-DR4 con la construcción de ADN de anticuerpo mediante pistola génica una vez a la semana durante 3 semanas consecutivas. En el día 19, se analizaron los esplenocitos *in vitro* contra vimentina humana 415-433 de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 μ M por elispot (i) IFN gamma, (ii) IL-17 y (iii) IL-2.

Figura 8. Respuestas CD4 en ratones DR1 provocadas por inmunización con una construcción de ADN de anticuerpo que codifica el epítomo auxiliar MMP-7.

Los ratones transgénicos para HLA-DR1 se inmunizaron con una construcción de ADN de anticuerpo hulgG1 que contenía el epítomo auxiliar MMP-7 247 en CDRL1 mediante pistola génica. Todos los ratones se inmunizaron tres veces en los días 0, 7 y 14. Las respuestas específicas para el epítomo auxiliar se analizaron *ex vivo* en el día 20 contra MMP7 humano 247 de tipo silvestre y péptidos citrulinados por ensayos elispot de (i) IFN γ (n=14), (ii) IL-17 (n=14). Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 9. El epítomo NYESO1 119-143 CD4 codificado dentro de un ADN de anticuerpo estimula respuestas CD4 que están acompañadas por una respuesta antitumoral.

A los ratones transgénicos de HHDII/DR1 se les inyectó en el día 0 2,5 x 10⁴ células B16 HHDII NYESO-1. Los ratones se inmunizaron en el día 3, 10 y 17 con ADN de anticuerpo hulgG1 que contenía el epítomo auxiliar NYESO-1 119-143 en el sitio CDRL1 mediante pistola génica. (i) Las respuestas específicas para el epítomo auxiliar se analizaron *ex vivo* en el día 20 por ensayo Elispot de IFN γ contra los péptidos auxiliares NYESO-1 119-143 citrulinados de tipo silvestre y un control irrelevante. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos. (ii) Supervivencia de los animales inmunizados con ADN de anticuerpo NYESO-1 en solitario o con adyuvante homspera o con homspera en solitario.

Figura 10. Los epítomos de vimentina 28-49 y 415-433 se procesan, citrulinan y presenta *in vivo* a partir de una

construcción de ADN antigénico completo.

Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizan con una construcción de AND que codifica vimentina murina mediante pistola génica o péptidos Vim 28-49 y 415-433 citrulinados en CpG/MPLA s.c. una vez a la semana durante 3 semanas consecutivas. En el día 19, los esplenocitos se analizan *in vitro* contra vimentina 28-49 y 415-433 de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 µM por ensayo elispot de IFN.

Figura 11. Comparación de respuestas CD4 en ratones transgénicos de HLA-DR4 provocadas por inmunización con los péptidos de vimentina 28-49 de tipo silvestre y citrulinados humanos.

Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron con 25 µg de vimentina 28-49 humana de tipo silvestre o péptidos citrulinados en el día 0. En el día 14, los esplenocitos se analizaron *in vitro* contra (a) vimentina humana 28-49 de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 µM por ensayos elispot (i) IFN γ , (ii) IL-17, (iii) IL-2, (iv) IL-10, (b) avidéz de las respuestas específicas del epítipo cit midiendo respuestas contra una concentración creciente de péptido en ensayos elispot de IFN γ e IL-17, (c) péptidos de vimentina 28-49 de citrulinación triple, doble y simple a concentración 5 µM por ensayo elispot de IFN γ . Las respuestas se miden como promedio de manchas/millón de esplenocitos.

Figura 12. Unión de péptidos vim 28-49, 415-433, vim 415-433 cit y vim 28-49 cit a HLA-DR0401 en un ensayo de unión competitiva. Los péptidos se mezclan con una concentración predeterminada de péptido biotinilado de gripe (HA₃₀₆₋₃₁₈) y después se ensayan para la unión a HLA-DR0401 purificado. El péptido HA₃₀₆₋₃₁₈ sin marcar se usó control positivo.

Figura 13. Comparación de respuestas CD4 en ratones transgénicos de HLA-DR4 provocadas por inmunización con los péptidos de vimentina 415 humanos de tipo silvestre y citrulinados.

Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron con 25 µg de vimentina 415 humana de tipo silvestre o péptidos citrulinados en el día 0. En el día 14, los esplenocitos se analizaron *in vitro* (a) contra vimentina humana 415 de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 µM por ensayos elispot (i) IFN γ , (ii) IL-17, (iii) IL-2, (iv) IL-10. (b) avidéz de las respuestas específicas de epítipo midiendo las respuestas contra una concentración creciente de péptido en ensayos elispot de IFN γ e IL-17. Las respuestas se miden como promedio de manchas/millón de esplenocitos.

Figura 14. Respuestas CD4 en ratones transgénicos de HLA-DR4 provocadas por inmunización con péptido de vimentina 415 humano citrulinado y reactividad cruzada con el equivalente de péptido citrulinado murino. Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron con 25 µg de péptido citrulinado de vimentina 415-433 humana en el día 0. En el día 14, los esplenocitos se analizaron *in vitro* contra péptidos de vimentina 415 citrulinada humanos y murinos a concentración 5 µM por ensayos elispot (i) IFN γ , (ii) IL-17. Las respuestas se miden como promedio de manchas/millón de esplenocitos.

Figura 15. Se confirma que las respuestas de linfocitos T provocadas en ratones transgénicos de HLA-DR4 por inmunización con el péptido de vimentina 415 citrulinada humana (a) y péptido de vimentina 28 citrulinada (b) son respuestas CD4. Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron con 25 µg de péptido citrulinado de vimentina 415-433 humana en el día 0. En el día 14, se analizaron esplenocitos completos o esplenocitos con CD4 reducida *in vitro* contra péptidos de vimentina 415 o 28 citrulinada humana a concentración 5 µM en presencia o en ausencia de anticuerpo de bloqueo de HLA-DR L243 por ensayos elispot de IFN γ . Las respuestas se miden como promedio de manchas/millón de esplenocitos.

Figura 16. Respuestas CD4 en ratones transgénicos de HLA-DR4 y HLA-A2/DR1 provocadas por inmunización con péptido de vimentina 65 citrulinada.

Los ratones transgénicos de HLA-DR4 (a) o HLA-A2/DR1 (b) se inmunizaron con 25 µg de péptidos de vimentina 65 citrulinada en el día 0. En el día 14, los esplenocitos se analizaron *in vitro* contra vimentina 65 humana de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 µM por ensayo elispot de IFN γ , IL-17 o IL-10. c) En el día 14, se analizaron los esplenocitos completos *in vitro* contra péptidos de vimentina 65 humana citrulinada a concentración 5 µM en presencia o en ausencia de anticuerpo de bloqueo de HLA-DR L243 por ensayos elispot de IFN γ . Las respuestas se miden como promedio de manchas/millón de esplenocitos. d) Tinción inmunofluorescente y análisis FACS de esplenocitos coteñidos para CD8, IFN γ y TNF α . e) En el día 14, los esplenocitos se estimularon *in vitro* con blastos LPS pulsados con péptido de vimentina 65 humana citrulinada. Seis después de la estimulación, se evaluaron las líneas CTL por ensayo de liberación de cromo para la capacidad de lisar células tumorales T2 o B16HHD pulsadas con péptido de vimentina 65 humana citrulinada y células T2 o B16HHD en solitario. Las respuestas se miden como el % de citotoxicidad. Los valores P indicados en el gráfico son para la relación de diana a efector (100:1). Los esplenocitos de los ratones inmunizados se analizaron *in vitro* contra los péptidos de unión a HLA-A2 de tipo silvestre y citrulinados predichos mínimos de vimentina 68 y 65 cortos, así como vimentina 65 humana de tipo silvestre y péptidos citrulinados a concentración 5 µM por ensayo elispot de IFN γ . g) Los esplenocitos de los ratones inmunizados se analizaron para las respuestas contra Vim 65 y Vim 68 cit y péptidos de tipo silvestre y células diana tumorales EL4 HHD y B16 por ensayo elispot de IFN γ .

Figura 17. Respuestas auxiliares generadas contra péptido citrulinado de vimentina 415-433 murina en presencia

o en ausencia de linfocitos T reguladores naturales.

Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron con 25 µg de péptido citrulinado de vimentina 415-433 murina en el día 0. Se realizó reducción de linfocitos T reguladores usando un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (PC61) tres días antes de la inmunización. En el día 14, los esplenocitos se analizaron por ensayo elispot de IFN γ contra concentraciones de valoración de péptido de vimentina 415 murina citrulinada.

Figura 18. Influencia de los adyuvantes en el equilibrio Th1/Th17 en respuesta a epítomos de vimentina 415 y 28 citrulinada.

Se administraron péptidos de vimentina 415-433 y 28-49 citrulinada humana (25 µg) en alumbre, IFA, GMCSF, MPLA y CpG o adyuvante TMX201 s.c. Catorce días después de la inmunización, los esplenocitos se analizaron para respuestas específicas al epítomo auxiliar por ensayos elispot de (i) IFN γ , (ii) IL-17 y (iii) IL-10 contra péptidos de tipo silvestre y citrulinados y un control irrelevante. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 19. El mab Anti-CTLA-4 aumenta la avidez de la respuesta al péptido de vimentina 415 citrulinada. Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron con 25 µg de péptido de vimentina 415 citrulinada humana en el día 0, 7 y 14. La mitad de los ratones también recibió mab anti-CTLA-4 en los días 7 y 14. En el día 21, los esplenocitos se analizaron *in vitro* contra (i) vimentina 415 citrulinada a concentración 5 µM por ensayo elispot de IFN γ . (ii) La avidez de las respuestas específicas de epítomo se midieron contra una concentración creciente de péptido en ensayo elispot de IFN γ . Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 20. Respuestas proliferativas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de pacientes con cáncer contra péptidos de tipo silvestre y citrulinados.

Las PBMC de los pacientes se estimularon con 10 µg/ml de (i) péptidos de vimentina 415-433 humana de tipo silvestre y citrulinada, (ii) vimentina 28-49 humana de tipo silvestre y citrulinada, (iii) vimentina 65-77 humana de tipo silvestre y citrulinada, (iv) péptidos NYESO-1 119-143 cultivados durante 4, 7 y 11 días. La proliferación de linfocitos se evaluó por incorporación de ³[H]-timidina. Las respuestas proliferativas se representan como el índice de estimulación (SI). El SI se calculó como la relación de la media de cpm del péptido estimulado a la media de cpm de cultivos no estimulados.

Figura 21. a) Supervivencia de Kaplan Meier de pacientes con cáncer de ovario cuyo tumor expresa PAD2. b) Supervivencia de Kaplan Meier de pacientes con cáncer de ovario cuyos tumores expresan HMGB1 c) Supervivencia de Kaplan Meier de pacientes con cáncer de ovario cuyos tumores expresan PAD2 y HMGB1 d) Supervivencia de Kaplan Meier de pacientes con cáncer colorrectal cuyos tumores expresan PAD4

Figura 22. Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron en los días 0, 7 y 14 con péptido de vimentina 415-433 humana citrulinada (b) o péptido vim 28-48 citrulinado (c) o ambos (a, d y e) en CPG y MPLA. A, en el día 14, los esplenocitos se analizaron *in vitro* contra vimentina humana citrulinada y los péptidos 415 y 28 no citrulinados a concentración 5 µM y las células tumorales diana B16DR4 inducidas por autofagia por privación de suero en presencia o en ausencia de 3-MA o Cl-amidina por ensayo elispot de IFN γ . B-E, El sobrenadante del ensayo elispot de IFN γ *ex vivo* se analizó para la presencia de granzimaB por ELISA.

Figura 23. Eliminación *In vitro* de células tumorales

(ai) Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron en los días 0, 7 y 14 con péptido de vimentina 415-433 humana citrulinada en CPG y MPLA. En el día 19, los esplenocitos se estimularon *in vitro* con blastos pulsados con péptido de vimentina 415-433 humana citrulinada. Seis días después de la estimulación, las líneas CTL se evaluaron por ensayo de liberación de cromo para la capacidad de lisar los esplenocitos DR4 pulsados con péptido de vimentina 415-433 humana citrulinada, células tumorales T2 DR4 pulsadas con péptido de vimentina 415-433 humana citrulinada y células T2 DR4 en solitario. Las respuestas se miden como el % de citotoxicidad. Los valores P indicados en el gráfico son para la relación de diana a efector 10:1. Los valores P para 20:1 y 40:1 son todos altamente significativos P < 0,0001.

(aii) Los ratones transgénicos de HHD/DR1 se inmunizaron en los días 0, 7 y 14 con péptido de vimentina 28-49 humana citrulinada en CPG y MPLA. En el día 19, los esplenocitos se estimularon *in vitro* con blastos pulsados con péptido de vimentina 28-49 humana citrulinada. Seis días después de la estimulación, las líneas CTL se evaluaron por ensayo de liberación de cromo para la capacidad de lisar las células tumorales T2 DR1 pulsadas con péptido de vimentina 28-49 humana citrulinada, células T2 DR1 en solitario y células T2 en solitario. Las respuestas se miden como el % de citotoxicidad. Los valores P indicados en el gráfico son significativos y para la relación de diana a efector 12,5:1. Los valores P para 25:1 (T2DR1 P=0,0017, T2 DR1 + vim28 cit P< 0,0001) y 50:1 (T2DR1 P=0,0008, T2 DR1 + vim28 cit P=0,0005) son todos altamente significativos.

Figura 24. Las respuestas CD4 contra vimentina 415-433 y vim 28-49 citrulinada influye en las respuestas inmunitarias antitumorales. A los ratones transgénicos de HLA-DR4 se les inyectó en el día 0 con 2,5 x 10⁴ células B16F1-DR4. (a) Los ratones se inmunizaron mediante pistola génica en los días 4, 11 y 18 con ADN de anticuerpo de control o la vacuna de ADN de anticuerpo que codifica el epítomo auxiliar vim415 restringido a

HLA-DR4 en CDRH3 o con péptido de vimentina 415-433 citrulinada murina (25 µg) en CpG y adyuvante MPLA administrado s.c. (a) Los ratones se inmunizaron mediante pistola génica en los días 4, 11 y 18 con ADN de anticuerpo de control o la vacuna de ADN de anticuerpo que codifica el epítipo auxiliar vim28 restringido a HLA-DR4 en CDRH3 o con péptido de vimentina 28-49 citrulinada de tipo silvestre (25 µg) en CpG y adyuvante MPLA administrado s.c. (c) Los ratones se inmunizaron con péptido de vimentina 415-433 citrulinada (25 µg) o péptido de vimentina 28-49 (25 µg) o ambos en CpG y adyuvante MPLA administrado s.c. (d) Los ratones se inmunizaron con péptido de vimentina 415-433 citrulinada (25 µg) en CpG y adyuvante MPLA administrado s.c. en combinación con anticuerpo anti-CD4 (clon GK1.5). (e) Los ratones se inmunizaron con péptido de vimentina 28-49 citrulinada (25 µg) en CpG y adyuvante MPLA administrado s.c. en combinación con anticuerpo anti-CD4 (clon GK1.5).

Figura 25. Las respuestas inmunitarias antitumorales contra vimentina 415-433 y vimentina 28-49 citrulinada están mediadas en parte por IFN γ e IL-17.

A los ratones transgénicos de HLA-DR4 se les inyectó en el día 0 con $2,5 \times 10^4$ células B16F1-DR4. Los ratones se inmunizaron s.c. con (a y c) péptido de vimentina 415-433 citrulinada (25 µg) o (b y d) péptido de vimentina 28-49 citrulinada (25 µg) en CpG y adyuvante MPLA en presencia o en ausencia de anticuerpo monoclonal neutralizante de IFN γ (a y b) o anticuerpo neutralizante de IL-17 (c y d).

Figura 26. Las respuestas inmunitarias antitumorales contra vimentina 415-433 citrulinada, pero no contra vimentina 28-49 están mediadas en parte por el reconocimiento directo de HLA-DR0401 en las células tumorales.

A los ratones transgénicos de HLA-DR4 se les inyectó en el día 0 con $2,5 \times 10^4$ células B16F1 (a) o células B16F1-DR4 (b). Los ratones se inmunizaron s.c. con (a) péptido de vimentina 415-433 citrulinada (25 µg) o péptido de vimentina 28-49 (25 µg) o ambos en CpG y adyuvante MPLA. (b) Péptido de vimentina 415-433 (25 µg) en CpG y adyuvante MPLA en presencia y en ausencia de anticuerpo monoclonal neutralizante de HLA-DR0401.

Figura 27. Homología de vimentina en diferentes especies.

Figura 28. Cribado de vimentina para epítipos novedosos que estimulen respuestas de linfocitos T.

Se administraron péptidos de vimentina citrulinada humana (3×10^6 µg) en adyuvante MPLA y CPG s.c. Catorce días después de la inmunización, los esplenocitos se analizaron para respuestas específicas contra los epítipos auxiliares por ensayos elisot de (i) IFN γ , y (ii) IL-17 contra el péptido auxiliar y un control irrelevante en ratones a) HLA-A2/DR1 y b) C57/BL. C) el péptido vim 14 citrulinado en adyuvante MPLA y CpG se administró s.c. Catorce días después de la inmunización, los esplenocitos se analizaron para respuestas específicas contra el epítipo auxiliar por elisot de IFN γ . Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 29. Cribado de citoqueratina 8 para epítipos novedosos que estimulan respuestas de linfocitos T.

Se administraron péptidos de citoqueratina citrulinada humana (3×10^6 µg) en adyuvante MPLA y CPG s.c. Catorce días después de la inmunización, los esplenocitos se analizaron para respuestas específicas contra los epítipos auxiliares por ensayos elisot de (i) IFN γ , y (ii) IL-17 contra el péptido auxiliar y un control irrelevante en ratones a) HLA-A2/DR1 y b) C57/BL. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 30. La vimentina de tipo silvestre estimula respuestas de linfocitos iTreg que secretan IL-10.

Se administró péptido de vimentina 415 humana (25 µg) en adyuvante MPLA y CPG s.c. Catorce días después de la inmunización, los esplenocitos se analizaron para respuestas específicas al epítipo auxiliar por ensayos elisot de (i) IFN γ , (ii) IL-17 y (iii) IL-10 contra el péptido auxiliar y un control irrelevante en ratones HLA-DR4. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 31. ING4 citrulinado estimula respuestas CD4.

El péptido 158-174 del péptido ING4 citrulinado (25 µg) en adyuvante MPLA y CPG se administró s.c en los días 0, 7 y 14. Siete días después de la última inmunización, los esplenocitos se analizaron para respuestas específicas contra los epítipos auxiliares por ensayos elisot de IFN γ contra el péptido auxiliar en presencia o en ausencia de un anticuerpo monoclonal de bloqueo de HLA-DR en ratones de HLA-A2/DR1. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 32: Referencias Uniprot para proteínas de las que pueden obtenerse epítipos útiles en la presente invención.

Figura 33. El ADN de vimentina antigénica induce respuestas de linfocitos T específicas de vimentina citrulinada. Los ratones transgénicos de HLA-DR4 (a) o ratones transgénicos de HLA-A2/DR1 (b) se inmunizaron con 1 µg de ADN que codifica la secuencia de vimentina murina completa mediante pistola génica en los días 0, 7 y 14. En el día 20, los esplenocitos se analizaron para las respuestas de IFN γ contra un panel de péptidos de vimentina citrulinados que abarcan la proteína completa por ensayo elisot. Las respuestas se miden como manchas/millón de esplenocitos.

Figura 34. Cribado de péptidos predichos para respuestas inmunitarias específicas de citrulina.

Los péptidos citrulinados predichos (25 ug) de BiP, HSP90 y ING4 se administraron s.c. en adyuvante CpG y MPLA en los días 0 o 0, 7 y 14 en ratones transgénicos de HLA-DR4. Los esplenocitos se analizaron para las respuestas inmunitarias en el día 14 o 20 por ensayo elispot de IFN γ contra péptidos citrulinados y no modificados pertinentes (5 uM) y el control de fondo. Las respuestas se miden como promedio de manchas/millón de esplenocitos.

Métodos

2.1. mAb comerciales

Los anticuerpos de conejo primario anti-vimentina humana (clon EPR3776), de conejo anti-PAD2 humano (clon pab0197), de conejo anti-citrulina humana (clon ab6464) se adquirieron todos de Abcam. El anticuerpo de conejo primario anti-PAD-4 humano (clon pab 0199) se obtuvo de Covalab y el anticuerpo anti-HLA-DR conjugado con PE-Cy7 (clon L243) de eBioscience. El anticuerpo anti-CD25 (clon PC61), el anticuerpo anti-IFN γ (clon XMG1.2), el anticuerpo anti-IL-17 (clon 17F3) y el anticuerpo anti-CD4 (clon GK1.5) se obtuvieron de BioXcell. El anticuerpo anti-CTLA4 se purificó de sobrenadante de cultivo de células de hibridoma HB304 (ATCC, EE. UU.) por cromatografía de afinidad por proteína G en sefarose. El anticuerpo anti-HLA-DR (clon L243) se purificó de sobrenadante de cultivo de células de hibridoma HB-55 (ATCC, EE. UU.) por cromatografía de afinidad por proteína G en sefarose. El mAb de conejo anti-HMGB1 (clon D3E5) se obtuvo de Cell Signaling Technology.

2.2. Líneas celulares

La línea celular híbrida de linfocitos T/linfocitos B T2 [80] transfectada de forma estable con DR4 de clase II funcional (DRB1*0401; T2 DR4) o DR1 (DRB1*0101;T2DR1) se ha descrito [82, 83] y se proporcionó amablemente por el doctor Dr. Janice Blum y el Profesor Lawrence Stern. Las líneas celulares de melanoma murino B16F1 y B16F10 se obtuvieron de la ATCC. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO/BRL) complementado con FCS al 10 %, L-glutamina (2 mM) y bicarbonato de sodio tamponados salvo que se indique lo contrario. Las células de hibridoma HB304 se cultivaron en Hybridoma SFM (Invitrogen, R.U.).

Para generar dianas tumorales que presenten epítomos citrulinados para ensayos *in vitro* las células se trataron con ácido cítrico 0,1 M (pH 3,0) que contenía BSA al 1 % a 4 °C durante 2 minutos. Las células se lavaron posteriormente con medio y se cultivaron en ausencia de suero durante 20 horas a 37 °C. Se añadieron inhibidores de autofagia y PAD, 3-metiladenina (Sigma) y Cl-amidina (Calbiochem), para el cultivo de 20 horas en medio sin suero a concentraciones finales de 10 mM y 50 μ g/ml respectivamente.

2.3. Inmunógenos

2.3.1. Péptidos

Se sintetizaron péptidos > 90 % de pureza por Peptide Synthetics (Fareham, R.U.). Se almacenaron liofilizados en alícuotas de 0,2 mg a -80 °C. En el día de su uso se reconstituyeron a la concentración apropiada en dimetil formamida al 10 %.

2.4. Plásmidos

La generación de construcciones de ADN de anticuerpo se ha descrito en detalle en otra parte [84]. En resumen, para generar las construcciones de ADN de anticuerpo, se incorporaron epítomos en regiones determinantes de complementariedad de las regiones variables de cadena pesada y ligera de las cadenas de anticuerpo usando técnicas convencionales de biología molecular. Los epítomos CD4 auxiliares restringidos a HLA-DR4 de los epítomos tirosinasa 448-462 (DYSYLQDSDPDSFQD), el epítomo gp100 44-59 murino y humano (WNRQLYPEWTEVQGSN/WNRQLYPEWTEAQRDL) y el epítomo restringido a I-Ab de nucleoproteína HepB 128-140 (TPPAYRPPNAPIL) se insertaron en remplazo de la CDRL1 de la cadena kappa. Asimismo, los epítomos CD4 auxiliares restringidos a HLA-DR1 de los epítomos MMP7 247-262 (SQDDIKGQKLYGKRS), SSX2 33-48 (KEEWKMKKASEKIFY), NYESO-1 87-111 (LLEFYLPMPFATPMEAEARRSLAQ) y 119-143 (PGVLLKFTVSGNILTIRLTAAADHR) se incorporaron en CDRL1 mientras que el epítomo modificado del epítomo triosafosfato isomerasa 23-37 (GELIGILNAAKVPAD) se insertó en remplazo de la CDRL3 de la cadena kappa. Los epítomos CD4 restringidos a HLA-DR4 vimentina 415-433 (LPNFSSSLNLRNLDLPL) y a HLA-DR1 28-49 (RSYVTTSTRYSLGSALRPSTS) se incorporaron ambos en CDRH3. La DR1 CD4 NYESO-1 87-111(LLEFYLPMPFATPMEAEARRSLAQ) también estaba codificada dentro de la secuencia ampliada 83-111 clonada en el sitio CDRH3 del vector de expresión doble de ADN de anticuerpo. También se generaron los vectores ImmunoBody de IgG1 humana e IgG2a murina que contenían los tres epítomos de vimentina. Los epítomos CD4 humanos restringidos a HLA-DR1 de vimentina 28-49(RSYVTTSTRYSLGSALRPSTS), 65-77 (SAVRLRSSVPGVR) y a HLA-DR4 415-433(LPINFSSSLNLRNLDLPL) se incorporaron en los sitios CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente.

Se generó el plásmido de vimentina murina de longitud completa pVax1 por amplificación de la secuencia de

longitud completa usando como molde ADNc de ARNm que se había aislado de la línea celular B16F1. Los cebadores directo e inverso utilizados se diseñaron para incorporar un sitio HindIII y BamHI, respectivamente. Tras la amplificación y confirmación de la secuencia de tipo silvestre, la vimentina murina de longitud completa se incorporó en los sitios HindIII/BamHI del sitio de clonación múltiple dentro del vector de expresión de mamífero pVax1 (Invitrogen).

Para generar el plásmido pVtro 2, se generó el ADNc de HLA-DR401 quimérico a partir del ARNm aislado de los esplenocitos de ratones HLA-DR4 transgénicos. También se usó como molde para amplificar las cadenas alfa y beta quiméricas por separado usando cebadores directos e inversos que incorporaban sitios fspI/EcoRI y BamHI/Sall, respectivamente. Tras la confirmación de la secuencia, la cadena alfa quimérica de longitud completa que comprende H2-Ea murina con el dominio alfa 1 de HLA-DRA humano se ligó en el fspI/EcoRI mcs2 del vector pVITRO2-hygro-mcs (Invivogen). La cadena beta que comprende H2-Eb murina con el dominio Beta 1 de DRB1*0401 humano se insertó entonces en el BamHI/Sall mcs1 del vector a lo largo de la cadena alfa quimérica.

Para generar el plásmido HHD, se sintetizó el ADNc del ARN total aislado de células EL4-HHD. Esto se usó como molde para amplificar HHD usando los cebadores directo e inverso y se subclonó en pCR2.1. La cadena HHD, que comprende el líder HLA-A2 humano, la molécula de microglobulina B2 humana unida covalentemente mediante un conector de glicina y serina a los dominios α 1 y 2 de la molécula MHC de clase 1 HLA-0201 humana y los dominios α 3, transmembranario y citoplasmático de la molécula H-2Db de clase 1 murina, se insertó después en los sitios EcoRV/HindIII del vector de expresión de mamífero pCDNA3.1 obtenido de Invitrogen.

Para construir el plásmido de expresión doble de mamífero que codifica Tap2 murino y las cadenas de longitud completa de NYESO-1, se amplificó NYESO-1 de los clones IMAGE 40146393 obtenidos del Geneservice con cebadores directos e inversos que incorporaban un sitio BamHI/XhoI, respectivamente. Tras la confirmación de la secuencia, se ligó NYESO-1 de longitud completa en el sitio de clonación múltiple BamHI/XhoI del vector de expresión doble de ADN de anticuerpo en remplazo de la cadena ligera. Se amplificó Tap2 murino del clon Image 6530488 después de la eliminación de un sitio HindIII de la secuencia codificante y la incorporación de este sitio antes del codón de inicio, y se clonó en el vector de expresión pOrigHIB usando HindIII/EcoRV. Después se transfirió Tap2 murino en remplazo de la cadena pesada usando HindIII/AvrII en el vector de expresión doble a lo largo de NYESO-1 de longitud completa.

Para atenuar la expresión de microglobulina B2 murina y MHC de clase II murina en la línea celular B16F10, se utilizó interferencia de ARN. Se hibridaron oligos complementarios que abordan la secuencia 266 de microglobulina B2 murina y 159 de MHC de clase II murina y se insertaron por separado en pCDNA6.2 GW miR (Invitrogen). El casete de expresión de pre-miARN que contiene el miARN 266 se escindió usando BamHI/XhoI y se ligó en el sitio XhoI/BglII de pCDNA6.2 GW miR 159 para encadenar los dos miARN y expresarlos en un transcrito primario dentro del mismo vector.

Se generó ADN plasmídico sin endotoxinas usando el kit endofree Qiagen maxiprep (Qiagen, Crawley)

2.5. Transfección

Las células B16F10 se transfectaron sucesivamente usando reactivo de transfección Lipofectamine con vectores de expresión que codifican NY-ESO-1 de longitud completa y Tap2 murino, HHDII y un ARNip para atenuar la expresión de MHC de clase II murina y microglobulina β 2 murina. Las células transfectadas se seleccionaron por el crecimiento en presencia de zeocina (300 μ g/ml), G418 (500 μ g/ml) y blasticidina (4 μ g/ml), respectivamente. Las líneas se clonaron por dilución limitante y la expresión se confirmó por citometría de flujo.

Las células B16F1 se transfectaron usando el reactivo de transfección Lipofectamine (Invitrogen) con 4 μ g del plásmido pVtro 2 quimérico de HLA-DR401 que codifica tanto la cadena alfa como la cadena beta quiméricas de longitud completa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células transfectadas se seleccionaron por crecimiento en presencia de higromicina B (200 μ g/ml). Las líneas se clonaron por dilución limitante y la expresión se confirmó por citometría de flujo usando el anticuerpo anti-HLA-DR humano conjugado con PE-Cy7 (clon L243) de eBioscience.

2.6 Estudios de unión de HLADR0401

En resumen, los péptidos de interés se mezclaron con una concentración predeterminada del péptido de referencia HA₃₀₆₋₃₁₈ biotinilado a concentraciones crecientes y se añadieron a HLA DR0401 unido a la placa. Se cuantificaron las cantidades de péptido de referencia biotinilado que se une a HLA DR0401 usando una etapa de enzima ligada a estreptavidina seguida por detección con sustrato cromógeno. La unión máxima se acepta como el valor conseguido por el péptido HA₃₀₆₋₃₁₈ biotinilado en solitario. Como control positivo, se usó el péptido HA₃₀₆₋₃₁₈ sin marcar para que compitiera con la versión biotinilada.

2.7. Inmunizaciones

2.7.1. Protocolo de inmunización

Se usaron ratones C57BL/6 (Charles River, R.U.), ratones HLA-DR4 (Taconic, EE. UU.), ratones HHDII (instituto Pasteur, Francia) y ratones HHDII/DR1 (instituto Pasteur, Francia), con edades entre 8 y 12 semanas, y se cuidaron por el personal en la Nottingham Trent University. Todo el trabajo se realizó bajo una licencia de proyecto del Ministerio del Interior. Los péptidos se disolvieron en dimetilformamida al 10 % hasta 1 mg/ml y después se emulsionaron (una serie de diluciones) con diferentes adyuvantes: CpG y MPLA, 6 µg/ratón de cada uno (Invivogen, R.U.), adyuvante incompleto de Freund 50 µl/ratón (Sigma, R.U.), y GMCSF 10 µg/ratón (Peprotech, R.U.). Los péptidos (25 µg/ratón) se inyectaron por vía subcutánea en la base de la cola. El ADN (1 µg/ratón) se recubrió sobre partículas de oro de 1,0 µm (BioRad, Hemel Hempstead, R.U.) usando las instrucciones del fabricante y se administró por vía intradérmica por pistola génica (BioRad). Se inyectó Homspera (10 nM/ratón) (PeptideSynthetics, R.U.) por vía intradérmica con inmunización con pistola génica. Los ratones se inmunizaron en el día 0 para inmunización peptídica o en los días 0, 7 y 14 para inmunización peptídica y con pistola génica. Los bazos se retiraron para el análisis en el día 14 para la inmunización con péptido y en el día 20 para la inmunización peptídica o con pistola génica salvo que se indique lo contrario. Se administraron 400 µg de anticuerpo anti-CD25 (PC61) i.p. en solución salina 3 días antes de la inmunización. Se administraron 200 µg de anticuerpo anti-CTLA-4 (UC10-4F10-11) i.p. en solución salina en el día 7 y 14 con inmunización con pistola génica o peptídica.

Para experimentos de exposición tumoral, los ratones se expusieron con $2,5 \times 10^4$ células B16 HHDII NYESO/TAP2 siβ2m 1F10 o células B16 DR4 2E7 por vía subcutánea en el flanco derecho 3 días antes de la inmunización primaria y después se inmunizaron como anteriormente. Se administraron los anticuerpos anti-IFNγ (300 µg/dosis), anti-IL-17 (200 µg/dosis) y anti-HLA-DR (300 µg/dosis) i.p. en solución salina los días 2, 7, 11 y 14 después del implante del tumor. El anticuerpo anti-CD4 (500 µg/dosis) se administró i.p. en solución salina en los días 2 y 8 después del implante del tumor. El crecimiento del tumor se controló a intervalos de 3-4 días y los ratones se sacrificaron una vez que el tumor alcanzó ≥ 10 mm de diámetro.

2.8. Análisis de la respuesta inmunitaria

2.8.1. Ensayo Elispot *Ex vivo*

Se realizaron ensayos Elispot usando IFNγ, IL-17 e IL-10 murinas de captura y reactivos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mabtech, Suecia). En resumen, los anticuerpos anti-IFNγ, IL-17 e IL-10 se recubrieron sobre pocillos de placa Immobiline-P de 96 pocillos. Los péptidos sintéticos (a una diversidad de concentraciones) y 5×10^5 esplenocitos por pocillo se añadieron a los pocillos de la placa por triplicado. Se añadieron células diana tumorales cuando fue pertinente a 5×10^4 /pocillo por triplicado y las placas se incubaron durante 40 horas a 37 °C. Después de la incubación, el IFNγ, IL-2, IL-17 e IL-10 capturados se detectaron por anticuerpos anti-IFNγ, IL-17 e IL-10 biotinilados y se revelaron con una fosfatasa alcalina con estreptavidina y sustrato cromógeno. Se analizaron las manchas y se contaron usando un lector de placa automatizado (Cellular Technologies Ltd). Se calculó la avidéz funcional como la concentración efectora máxima del 50 % usando un gráfico de función efectora frente a la concentración de péptido.

2.8.2 Reducción *ex vivo* de células CD8 y CD4 de cultivos de esplenocitos

Los esplenocitos se sometieron a aislamiento positivo de células CD4 o CD8 usando microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpo (Miltenyi Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para estudios de bloqueo de MHC de clase II se añadió anticuerpo anti-HLA-DR (clon L243) a 20 µg/ml a los ensayos Elispot.

2.8.3 Elisa de granzima B

El sobrenadante de los ensayos Elispot de IFNγ *ex vivo* en los esplenocitos se retiró después de 40 horas y se evaluó para granzima B por ensayo Elisa (R&D systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.8.4 Ensayo combinado Luminex

Se usó un procedimiento indirecto de tres etapas para el ensayo combinado Luminex (Invitrogen) para anticuerpos IgG contra IL-10, IL-17, IFNγ, TNFα, IL-2 e IL-4. Se diluyeron sueros convencional, de control y desconocido 1:2 en tampón diluyente de ensayo al 50 % (Invitrogen) y RPMI sin suero al 50 %. Se incluyeron diluciones convencionales en serie en cada ensayo. Cada dilución de suero convencional, de control y desconocido se mezcló con un conjunto de microesferas Luminex acopladas en placas de filtración de 96 pocillos (Millipore Multiscreen; Millipore Corporation, Bedford, Mass.) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las microesferas se recogieron por filtración al vacío y se lavaron con PBST. Se añadió anticuerpo detector biotinilado a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las microesferas se recogieron por filtración al vacío y se lavaron con PBST. Se añadió R-ficoeritrina conjugada con estreptavidina a cada pocillo. Después de 30 min de incubación y una etapa de lavado, las microesferas se resuspendieron en PBST y se leyeron en un analizador Biorad BioPlex Luminex equipado con una plataforma XY. La adquisición de datos y el análisis se realizaron con el programa informático Luminex (BioPlex Systems).

2.8.5 Ensayo de proliferación

Se aislaron las PBMC de sangre heparinizada recién extraída por centrifugación en gradiente de Ficol-Hypaque (Sigma). Las PBMC ($1,5 \times 10^6$ células/pocillo) se estimularon con péptidos individuales (concentración final 10 µg/ml) en RPMI que contenía suero humano autólogo combinado al 5 %, glutamina 2 mM, HEPES 20 mM y penicilina-estreptomicina (1 %) en un volumen final de 2 ml. La estimulación con derivado proteínico purificado, PPD (concentración final 10 µg/ml) sirvió como control positivo para la capacidad proliferativa de PBMC. Como control negativo, se incubaron PBMC con medio en solitario. Las PBMC se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 4, 7 y 11 días. Para evaluar la proliferación en estos puntos temporales, se formaron alícuotas de 100 µl por triplicado de cada cultivo en un pocillo de fondo redondo de una placa de 96 pocillos y se añadió ³H-timidina (0,0185 MBq/pocillo) y se incubaron a 37 °C durante 8 horas adicionales. Los cultivos se recogieron en placas Unifilter y se determinó la incorporación de ³H-timidina por recuento de centelleo β. Los resultados se evaluaron calculando el índice de estimulación (SI) como la relación de la media de recuentos por minuto (cpm) de cultivos estimulados con epítipo a la media de cultivos no estimulados. El ensayo proliferativo se consideró positivo cuando el SI > 2,5.

2.8.6 Ensayo de liberación de ⁵¹Cr

Las células diana se marcaron durante 1 hora con 1,85 MBq de cromato de sodio (⁵¹Cr) (Amersham, Essex, R.U.) con o sin 10 µg/ml de péptido. Después de la incubación, se lavaron 3 veces en RPMI. Se establecieron 5×10^3 dianas/pocillo en placas de fondo en V de 96 pocillos y se incubaron con diferentes densidades de células efectoras en un volumen final de 200 µl de RPMI, FCS al 10 % (Sigma), tampón HEPES 20 mM, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Después de 20 horas a 37 °C, se retiraron 50 µl de los sobrenadantes de cada pocillo y se transfirieron a una Lumaplate (Packard, Rigaweg, Países Bajos). Las placas se leyeron en un contador de centelleo de microplaca Topcount (Packard). El porcentaje de lisis específica se calculó usando la siguiente fórmula: lisis específica = $100 \times [(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea}) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})]$

2.9 Análisis inmunohistoquímico

En primer lugar, se desparafinizaron secciones de micromatriz tisular con xileno, se rehidrataron mediante alcohol graduado y se sumergieron en metanol que contenía peróxido de hidrógeno al 0,3 % durante 20 min para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Para recuperar la antigenicidad, las secciones se sumergieron en 500 ml de tampón citrato pH 6,0 y se calentaron durante 20 min en el 6.º ajuste de un microondas. Se bloqueó la unión endógena de avidina/biotina usando un kit de bloqueo de avidina/biotina (Vector Labs). Para bloquear la unión no específica del anticuerpo primario, todas las secciones se trataron después con 100 µl de suero de caballo normal 1/5 (NHS) en PBS durante 15 min. Las secciones de ensayo se incubaron con 100 µl de anticuerpo primario diluido en PBS durante 1 hora a 22 °C o durante una noche a 4 °C. El tejido de control positivo comprendía secciones completas de tejido de cáncer colorrectal teñido con β2-microglobulina a dilución 1/1000 (en PBS; Dako). El anticuerpo primario se omitió del control negativo, que se dejó incubando en NHS. Después de lavar con PBS, todas las secciones se incubaron con 100 µl de inmunoglobulina de cabra biotinilada anti-ratón/conejo (Dako) diluido 1:100 en NHS, durante 30 min. Las secciones se lavaron de nuevo en PBS y se incubaron con 100 ml de complejo preformado de estreptavidina-biotina/HRP (Dako) durante 60 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la visualización de la expresión del epítipo se consiguió usando DAB. Finalmente, las secciones se contratiñeron ligeramente con hematoxilina (Dako), se deshidrataron en alcohol, se lavaron en xileno (GentaMedica, York, R.U.) y se montaron con distireno, plastificante y xileno (DPX; BDH).

Evaluación de tinción: Para permitir el almacenamiento permanente de los portaobjetos, se tomaron imágenes a x20 usando un sistema de imágenes de portaobjetos NanoZoomer 2.0 (Hamamatsu, Higashi-ku, Japón). La expresión de los marcadores en el tejido se analizó usando las imágenes en el visor virtual de portaobjetos de patología digital NanoZoomer (Hamamatsu). EL cribado de la expresión de marcadores se realizó simultáneamente por dos investigadores con experiencia previa de valoración, enmascarados a la información clínica. Para el valor H, los núcleos se analizaron brevemente y los núcleos representativos de núcleos negativos, débiles, moderados y fuertes se usaron como guías para la micromatriz tisular completa (TMA). Así como la intensidad de la tinción, se estimó el porcentaje de células tumorales teñidas positivamente. Los dos valores entonces se combinaron para formar el valor H, donde H = porcentaje de células teñidas X intensidad (intervalo = 0-300). Usando el visor de portaobjetos NanoZoomer, se midió el área de tumor y de estroma y el número de células positivas en cada área contada. Entonces se calculó un valor de células positivas por mm².

2.9.1. TMA de tumor colorrectal

Se cribaron antisueros para la unión al tumor en un TMA de cáncer gástrico.

Estudio de pacientes y diseño: La población de estudio comprendía una serie de 462 pacientes consecutivos que experimentan resección quirúrgica electiva de un cáncer colorrectal primario que ha demostrado ser esporádico histológicamente en el University Hospital, Nottingham, R.U. (Tabla 1). Estos pacientes se trataron entre el 1 de

enero de 1994 y el 31 de diciembre de 2000; este periodo de tiempo permitió una evaluación significativa de los marcadores pronósticos estudiados. Todos los pacientes tratados durante este tramo de tiempo se consideraron elegibles para su inclusión en el estudio. Los tumores se clasificaron como carcinoma mucinoso, cuando más de un 50 % del volumen del tumor consistía en mucina.

5

Tabla 1: Variables clinicopatológicas para la cohorte de pacientes de TMA colorrectal (n = 462)

Variable	Categorías	Frecuencia de cohorte total (%)
Género	Hombre	266 (58)
	Mujer	199 (42)
Edad (años)	Media	72
	Intervalo	58-93
Estado	Vivo	169(37)
	Muerto	293(63)
Grado del tumor	Bien diferenciado	29 (6)
	Moderadamente diferenciado	353 (77)
	Mal diferenciado	71 (15)
	Desconocido	8 (2)
Sitio del tumor	Colon	238 (52)
	Recto	181 (39)
	Desconocido	43 (9)
Fase de TNM	0 (T _{is})	3 (1)
	1	39 (15)
	2	174 (28)
	3	155 (33)
	4	54 (12)
	Desconocido	7 (2)
Invasión vascular extramural	Negativa	224 (48)
	Positiva	128 (28)
	Desconocida	110 (24)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	392 (85)
	Carcinoma mucinoso	51 (11)
	Carcinoma columnar	4 (1)
	Carcinoma en anillo de sello	7 (1)
	Desconocido	8 (2)

Clinicopatología: Únicamente en los casos donde no estaba disponible material patológico pertinente se excluyeron del estudio. El seguimiento se calculó desde el momento de resección del tumor original con todos los casos supervivientes censurados para el análisis de datos el 31 de diciembre de 2003, esto produjo un seguimiento medio de 37 meses (intervalo 0-116) para todos los pacientes y de 75 meses (intervalo 36-116) para los supervivientes.

10

Se usó una base de datos mantenida de forma prospectiva para registrar los datos clinicopatológicos pertinentes, con datos proporcionados de la Oficina Nacional de Estadística de Reino Unido; esto estuvo disponible en más de un 99 % de los casos. La información recogida se validó independientemente a través de una revisión de las notas del caso de los pacientes fallecidos. Se usó supervivencia específica de enfermedad como criterio de valoración principal; sin embargo, también se recogieron datos sobre otros diversos parámetros clínicos e histopatológicos pertinentes, esto se resumen en la tabla 2.3. La quimioterapia adyuvante que consistía en FOLFOX se reservó para aquellos pacientes con ganglios linfáticos positivos, aunque el tratamiento adyuvante y quirúrgico fue según el criterio del médico supervisor.

15

20

Anteriormente se realizó una revisión ética del estudio por el Comité de Investigación y Ética de Nottingham, que concedió la aprobación para el estudio.

25

La construcción de los bloques de micromatriz incorporaron un amplio espectro de tumores colorrectales resecados de forma electiva y se descubrió que eran ampliamente representativos de la población de cáncer colorrectal en R.U. 266 (58 %) pacientes eran hombres y 196 (42 %) mujeres. La edad media en el momento de la cirugía fue de 72 años, coherente con una edad media de diagnóstico de cáncer colorrectal de 70-74 años en R.U. [85]. 69 (15 %)

tumores dispuestos en micromatriz eran metástasis ganglionar (TNM) en fase 1, 174 (38 %) en fase 2, 155 (34 %) en fase 3 y 54 (11 %) en fase 4; hubo 3 casos de enfermedad en el sitio. Estas cifras son comparables con las cifras nacionales para la distribución de la fase 1-4 en el diagnóstico de un 11, 35, 26 y 29 %, respectivamente [85]. La mayoría de los tumores (392, 85 %) eran adenocarcinomas, y eran muy frecuentemente de un grado histológico moderado (353, 77 %). 128 (28 %) tumores se indicaron con evidencias histológicas de invasión vascular extramural, 224 (48 %) no tenían evidencias de invasión vascular y esta información no estuvo disponible en 110 (24 %) casos. En el momento de la censura para el análisis de datos, 228 (49 %) pacientes habían muerto por su enfermedad, 64 (14 %) habían muerto por otras causas y 169 (37 %) estaban vivos. La supervivencia específica de enfermedad de cinco años para la cohorte fue de 58 meses, comparable con el promedio nacional de aproximadamente un 45 % de supervivencia de cinco años para cáncer colorrectal en R.U. [86].

2.9.2. TMA de cáncer de ovario

Se cribaron antisueros para la unión al tumor en un TMA de cáncer de ovario. El TMA de cáncer de ovario representa una cohorte de 362 pacientes con cáncer de ovario primario tratado en el Nottingham University Hospitals entre 2000 y 2007. La estadificación de los cánceres se realizó usando los criterios de la International Federation of Obstetrics and Gynaecology (FIGO). Todos los pacientes incluidos en este estudio se trataron de acuerdo con los regímenes quimioterapéuticos convencionales actuales con carboplatino como único agente en 65 pacientes (41,4 %) o quimioterapia de combinación basada en platino en 89 pacientes (56,7 %), con 3 pacientes que rechazaron la quimioterapia. Los casos resistentes a platino se definieron como pacientes que progresaban en quimioterapia en platino con primera línea durante el tratamiento o que sufrieron recidiva en 6 meses después del tratamiento. Todos los pacientes experimentaron cirugía; más de un 44 % de los casos (n=69) se consideraron citorreducidos de forma subóptima (tumor restante < 1 cm) después de la cirugía inicial. Se hizo un seguimiento de los pacientes por examen físico, tomografía computarizada y niveles de CA-125. Se revisaron secciones teñidas con hematoxilina y eosina de los tumores de estos pacientes por un anatomopatólogo ginecólogo desconocedor de los datos clínicos y del diagnóstico patológico. Para cada tumor, también se realizó una revisión de este tipo y la diferenciación por SD. Los datos clínicos asociados con cada caso se recogieron y registraron a partir de las notas del paciente o mediante los registros electrónicos del hospital (NotIS). Dicha información incluía: edad del paciente en el diagnóstico, fase FIGO, grado de citorreducción quirúrgica y tipo, duración y respuesta a quimioterapia. Los detalles del tratamiento adyuvante, la supervivencia específica de enfermedad (DSS) y la supervivencia global (OS) se documentaron para todos los pacientes. La supervivencia se calculó a partir de la fecha de la operación hasta el 30 de mayo de 2008 cuando se censuró cualquier superviviente restante. La media de seguimiento fue de 36 meses. La aprobación ética para recoger las muestras y los datos relevantes para el estudio se concedió por el Nottinghamshire Local Research Ethics Committee.

2.9.3. TMA de tejido normal

El TMA de tejido normal contenía 59 núcleos que representan 38 órganos normales. Cada núcleo se clasificó de acuerdo con el origen de la muestra; tejido normal de un paciente sin cáncer, tejido normal de un paciente con cáncer, pero el cáncer implica un órgano no relacionado, tejido normal adyacente al cáncer. El tipo de tejido y la categoría se detallan en la tabla 2.

Tabla 2: Detalles de TMA de tejido normal y tipo de tejido

Tipo de tejido	Edad	Género
Placenta	29	F
Esófago	23	M
Recto	24	F
Vesícula biliar	24	M
Piel	83	F
Tejido adiposo	26	M
Corazón	27	M
Músculo esquelético	26	M
Vejiga	36	F
Íleon	62	M
Bazo	30	M
Cerebro	68	M
Yeyuno	56	M
Estómago	66	M
Mama	27	F
Riñón	56	M
Testículo	32	M
Cerebelo	73	F
Hígado	30	M
Timo	28	M

(continuación)

Tipo de tejido	Edad	Género
Cuello uterino	30	F
Pulmón	24	M
Músculo liso	23	M
Colon	28	M
Ovario	50	F
Amígdala	28	F
Diafragma	26	M
Páncreas	50	M
Útero	40	F
Duodeno	24	M
Tiroides	26	M

Ejemplo 1. Respuestas CD4 en ratones de tipo silvestre a autoepítopos y epítopos exógenos

- 5 Las respuestas de linfocitos T contra epítopos asociados a tumor a menudo son débiles o no existentes debido a la tolerancia y la eliminación de linfocitos T dentro del timo. No obstante, se cribó una diversidad de autoepítopos CD4 y epítopos CD4 exógenos para su capacidad de estimular respuestas auxiliares. Como los estudios previos han demostrado que las construcciones de ADN de anticuerpo daban las respuestas inmunitarias más fuertes [84], se incorporó una diversidad de epítopos CD4 exógenos y autoepítopos en construcciones diferentes y se cribaron en
- 10 ratones de tipo silvestre. La tabla 3 enumera las secuencias de todos los epítopos y sus homólogos de ratón, cuando sea apropiado.

Tabla 3: Epitopos CD4

	SECUENCIA	COORDENADA	NÚCLEO	VALOR SYMPATHEI	HLA
Propio					
gp100 murino	WNRQLYPEWTEVQGSN	44-59	LYPEWTEVQ	26	DR4
Vimentina 65-77	SAVRLRSSVPGVR	65-77	VRLRSSVPG	23	DR1
Vimentina 28-49	RSYVTTSTRTYSLGSALRP STS	28-49	TYSLSALR YVTTSTRTY	27/20	DR1 DR4
Propio en regiones centrales					
Vimentina 415-433	LPWFSSNLRETNLDSLPL	415-433	FSSNLRET	26	DR4
ING4 158-174	AQKKLKLVRTSPEYGMPP	158-174	QKKLKLVRT LKLVRTSPE KKLKLVRTS	22 20	DR1 DR4
Exógeno en regiones centrales					
gp100 humana	WNRQLYPEWTEAQR _{LD}	44-59	LYPEWTEAQ	26	DR4
MMP-7 247-262	SQDDIKGIQKLYGKRS	247-262	IQKLYGKRS	35	DR1
Tirosinasa	DYSYLQSDSDPDSFQD	448-462	YLQSDPDS	22	DR4
mTPI	GELIGILNAAKVPAD	23-37	IGILNAAKV	36	DR1
NYESO-1 87-111	LLEFYLPMPFATPMEAE _{LA} RRSLAQ	87-111	FYLAMPFAT	26/22	DR1
NYESO-1 119-143	PGVLLKEFTVSGNILTIR _{LT} AADHR	119-143	ILTIRLTAA NILTIRLTA	23/22	DR1 DR4
SSX2 34-48	KEEWEKMKASEKIFY	34-48	WEKMKASE K	26	DR1

(continuación)

Exógeno en regiones centrales				
Nucleoproteína de hepatitis B	<i>TPPAYRPPNAPIL</i>	128-140	<i>YRPPNAPIL</i>	I-Ab (auxiliar)
Los restos de arginina están subrayados				
Los restos no homólogos están en cursiva				

La figura 5 muestra buenas respuestas CD4 a la mayoría de los epítomos CD4 exógenos pero no a los autoepítomos. La nucleoproteína 128-140 de hepatitis B, el epítomo auxiliar CD4 I-Ab mostró una respuesta por ELISPOT de 50-1000/millones de esplenocitos (media de 382/millón de esplenocito) en ratones C57Bl. Los epítomos NYESO-1 y SSX2 de testículo canceroso son epítomos exógenos en ratones y los epítomos DR1 NYESO-1 (87-111) y SSX2 (34-48) estimularon buenas respuestas en ratones transgénicos de HLA-DR1; NYESO-1 (87-111) 250-900/millón de esplenocitos (media de 567/millón de esplenocitos) y SSX2 (34-48) 500-1200/millón de esplenocitos (media de 765/millón de esplenocitos). Los epítomos TPI mutados de HLA-DR1 que únicamente difieren del tipo silvestre en un aminoácido, muestran una respuesta de 300-1300/millón de esplenocitos. El epítomo gp100 HLA-DR4 humano 44-59 tiene un cambio de aminoácido del epítomo de ratón homólogo y muestra respuestas de 263-1521/millón de esplenocitos (media de 745/millón de esplenocitos). Por el contrario, el autoepítomo de ratón homólogo no logró estimular una respuesta en ratones transgénicos de HLA-DR4. El epítomo tirosinasa de HLA-DR4 humano tiene 6 cambios de aminoácido del epítomo de ratón homólogo y muestra respuestas de 405-832/millón de esplenocitos (media de 555/millón de esplenocitos). El epítomo de HLA-DR1 MMP7 247-262 tiene 4 cambios de aminoácido entre ratones y seres humanos, uno de los cuales se predice que está en la región central de unión a MHC/reconocimiento de TCR (tabla 3). Este epítomo no logró estimular una respuesta por encima del fondo en ratones transgénicos de HLA-DR1. El epítomo vimentina 415-433 de HLA-DR4 tiene dos diferencias de aminoácido entre seres humanos y ratones, pero no se predice que estas estén en la región central de unión a MHC/reconocimiento de TCR (tabla 3). No logró estimular una respuesta en ratones transgénicos de HLA-DR4 de tipo silvestre. Por el contrario, la vimentina 28-49, es homóloga en ratones y en seres humanos y es un verdadero autoepítomo que estimula una respuesta de 200-500/millón de esplenocitos (media de 390/millón de esplenocitos) en ratones transgénicos de HLA-DR4. Esta respuesta fue intrigante y nos condujo a intentar y a explicar la causa de que no hubiera eliminación/tolerancia para este epítomo.

Ejemplo 2. Resultado de inmunización con ADN en respuestas a vim 28, vim 415, MMP7 y NY-ESO-1 citrulinadas.

Los pacientes con AR han demostrado generar respuestas de linfocitos T contra epítomos de vimentina citrulinada. Como las APC pueden citrulinar de forma constitutiva los epítomos, fue posible que las construcciones de ADN de anticuerpo se citrulinaran y que esto estimulara la respuesta. Los ratones transgénicos de HLA-DR4, por lo tanto, se inmunizaron con una construcción de ADN de anticuerpo que codifica el autoepítomo vim 28. Los linfocitos T estimulados de estos ratones se cribaron *in vitro* para respuestas de IFN γ , IL-17 e IL-2 contra el péptido vim 28 tanto citrulinado como no citrulinado. La figura 6 muestra que aunque los ratones respondieron como en el ensayo por ELISPOT al péptido de tipo silvestre por la producción de las tres citocinas (media: IFN γ 400, IL-17 120 e IL-2 150/millón esplenocitos), las respuestas al péptido citrulinado fueron significativamente mayores para IFN γ e IL-17 (media: IFN γ 1250/millón esplenocitos; $p=0,0046$, IL-17 250/millón esplenocitos; $p=0,0392$ pero no para IL-2 250/millón de esplenocitos. Para observar si se generaban respuestas similares para el anticuerpo de epítomo vim 415, se usaron construcciones de ADN para inmunizar los ratones (figura 7). En contraste con vim 28-49 y de acuerdo con nuestra observación original, no hubo respuestas contra vim 415-433 de tipo silvestre, pero las fuertes respuestas contra el péptido citrulinado y las respuestas contra IL-17 fueron tan fuertes como las respuestas de IFN γ (media: IFN γ 400/millón esplenocitos; $p=0,0067$, IL-17 350/millón esplenocitos; $p=0,002$ e IL-2 250/millón esplenocitos; $p=0,0056$). Esto confirma que cuando el ADN de anticuerpo se traduce, se citrulina.

En contraste, cuando se incorporaba MMP7 247-262 en una vacuna de ADN (figura 8), no se observaban respuestas de IFN γ contra el péptido de tipo silvestre o citrulinado, pero se observaban respuestas de IL-17 significativas tanto contra los péptidos de tipo silvestre (media: 312/millón esplenocitos; $p=0,0061$) como contra los péptidos citrulinados (media: 309/millón esplenocitos; $p=0,0267$).

Cuando a los ratones se les inyectaba células tumorales B16 HHDII NYESO-1 y después se inmunizaban con NYESO-1 119 incorporado en una vacuna de ADN de anticuerpo (figura 9) con o sin el adyuvante homspera, únicamente se observaban respuestas de IFN γ contra el péptido citrulinado, pero no el de tipo silvestre y esto estaba acompañado por una respuesta antitumoral.

Como las células presentadoras de antígeno pueden citrulinar de forma constitutiva los epítomos, fue interesante observar si las respuestas específicas de autoepítomo citrulinado podían inducirse usando antígeno de longitud completa suministrado como vacuna de ADN. Los ratones transgénicos de HLA-DR4, por lo tanto, se inmunizaron con la construcción de ADN que codificaba el antígeno vimentina murino completo. Los linfocitos T estimulados de estos ratones se cribaron *in vitro* para respuestas de IFN γ tanto contra péptidos citrulinados y no citrulinados vim 28-49 y 415-433. La figura 10 muestra que los ratones inmunizados con la construcción de ADN demuestran respuestas de IFN γ contra ambos péptidos citrulinados, pero no contra las versiones de tipo silvestre. Esto confirma que cuando el ADN se traduce se citrulina.

Estos resultados siguieron que los epítomos de las construcciones de ADN de anticuerpo se están citrulinando y que los linfocitos T que reconocen estos péptidos modificados aún no se han eliminado/anergizado.

Ejemplo 3. Resultados de inmunización peptídica en respuestas a vim 28, vim 415 y vim 65 citrulinadas.

Para determinar si esto estaba restringido a vacunas de ADN o si los péptidos citrulinados también podían estimular este repertorio, los ratones se inmunizaron con péptidos vim 28-49 de tipo silvestre y citrulinado y vim 415-433

citrulinado en combinación con adyuvantes CpG y MPLA. La figura 11 muestra que vim 28-49 citrulinada estimulaba fuertes respuestas de IFN γ (media 600/millón de esplenocitos; $p=0,0037$) contra el péptido citrulinado y respuestas más débiles contra el péptido de tipo silvestre (media de 250/millón de esplenocitos; $p=0,0175$). El péptido de tipo silvestre estimuló respuestas de IFN γ similares contra el péptido no citrulinado (media de 700/millón de esplenocitos; $p=0,003$) y péptido citrulinado (media de 1100/millones de esplenocitos; $p=0,0182$) y respuestas débiles de IL-17 e IL-2. No se observaron respuestas significativas de IL-10. La avidez de las respuestas tanto para IFN γ como para IL-17 fue de 10^{-6} M. Las respuestas en los ratones contra vim 28-49 es contra la propia ya que la secuencia de aminoácidos es idéntica en ratones y seres humanos, lo que sugiere que el repertorio de linfocitos T contra este epítipo no se ha eliminado. La respuesta contra vim 28-49 citrulinada es como la propia modificada, pero los ratones también pueden reconocer el péptido de tipo silvestre. Los estudios previos han demostrado que el péptido 30-49 citrulinado en las posiciones 36 y 45 puede estimular respuestas de linfocitos T en ratones transgénicos de HLA-DR4. Se apreció que había una arginina adicional en la posición 28 de modo que se amplió este péptido para proporcionar 28-49 y se citrulinó en las posiciones 28, 36 y 45 (figura 11c). Los péptidos vim 28-49 citrulinados tres veces nos dieron una respuesta significativamente más fuerte que el péptido vim28-49 citrulinado en las posiciones 36, 45 del péptido ($p=0,02$ y $p=0,0007$ respectivamente). Vim 28-49 únicamente citrulinada en la posición 28 dio una respuesta al péptido tricitrulinado y el péptido vim45 citrulinado. El péptido vim 28 y 36 citrulinado también respondió al triple. Estos datos demuestran que la posición de la citrulina hace una diferencia en la magnitud de la respuesta inmunitaria generada para esta secuencia y sugiere que la posición 28 es la más importante. Sin embargo, el péptido triple cit induce respuestas con mayor reactividad cruzada a otras versiones citrulinadas. El péptido vim 28-49 tricitrulinado muestra mejor unión a HLA-DR0401 en comparación con la versión de tipo silvestre como se indica por la mejor competición con el péptido de referencia HA₃₀₆₋₃₁₈ en el ensayo de unión de HLA-DR0401 (figura 12). La figura 13 muestra que vim 415 citrulinada estimulaba fuertes respuestas de IFN γ (media de 1000/millón de esplenocitos; $p<0,0001$) contra el péptido citrulinado y sin respuestas contra el péptido de tipo silvestre. También estimulaba fuertes respuestas de IL-17 (media de 530/millón de esplenocitos; $p<0,0001$) contra el péptido citrulinado y una débil respuestas contra el péptido de tipo silvestre (media de 140/millón de esplenocitos; $p=0,04$). La avidez de las respuestas tanto para IFN γ como para IL-17 fue de 10^{-6} M. Las respuestas de IL-2 contra el péptido citrulinado fueron más variables (media de 350/millón de esplenocitos; $p=0,046$) pero no hubo respuesta contra el péptido de tipo silvestre. El péptido vim 415-433 de tipo silvestre estimuló una débil respuesta de IL-2 contra los péptidos citrulinados. No se observaron respuestas de IL-10 significativas. El epítipo vim 415-433 humano difiere del epítipo de ratón homólogo en dos aminoácidos que no se predice que estén en la región central de unión a MHC/reconocimiento de TCR. Para ensayar esta hipótesis, los ratones se inmunizaron con péptido vim 415 cit humano y después se cribaron contra vim 415 cit de ratón. Los linfocitos T mostraron respuestas iguales contra ambos péptidos (figura 14). Se demostró que las respuestas de vim 415-433 cit y 28-49 cit estaban mediadas por CD4 por reducción de las células CD4 antes del ensayo elispot *ex vivo* o de la adición de anticuerpo de bloqueo de MHC de clase II en el cultivo de elispot (figura 15). Tanto vim 28cit como vim 415 cit se usaron para inmunizar ratones C57Bl y ratones HHD1/DR1, pero no lograron generar una respuesta contra ninguno de estos antígenos, lo que sugiere que los epítopos no se presentan ni en I-Ab ni en HLA-DR0101.

La figura 16a muestra que el péptido vim 65 citrulinado estimulaba respuestas de IFN γ (media de 550/millón de esplenocitos; $p=0,0046$) en ratones de HLA-DR4 contra el péptido citrulinado y sin respuestas contra el péptido de tipo silvestre. También estimuló respuestas de IL-17 (media de 550/millón de esplenocitos) contra el péptido citrulinado y sin respuestas contra el péptido de tipo silvestre. El péptido vim 65-77 de tipo silvestre estimuló una débil respuesta de IFN γ e IL-17 contra los péptidos de tipo silvestre y citrulinados. El péptido vim 65-77 también se ensayó en ratones HLA-A2/DR1 y mostró una alta frecuencia de respuestas de IFN γ contra el péptido citrulinado que demostró algo de reactividad cruzada contra el péptido de tipo silvestre (figura 16b).

También se observaron respuestas de IL-10 de baja frecuencia contra el péptido citrulinado. El bloqueo de MHC de clase II no elimina la respuesta específica de péptido citrulinado, indicando, por tanto, que la respuesta específica de vim 65-77 está restringida a MHC de clase I (figura 16c). Esto se confirma además por la tinción de citocinas intracelulares que demuestra que las células que producen IFN γ y TNF α en respuesta a la estimulación con el péptido vim 65-77 citrulinado son CD8 positivas (figura 16d). La respuesta específica de vim 65-77 cit también demuestra citotoxicidad de células diana HLA-A2 positivas pulsadas con péptido (figura 16e), lo que indica restricción a través de HLA-A2. Los intentos por cartografiar el epítipo restringido HLA-A2 mínimo dentro de la secuencia de vim 65-77 usando dos péptidos de 9 monómeros con alta unión de HLA-A2 predicha revela la secuencia óptima que está en la región de 68-76 (figura 16f). Las respuestas específicas para el péptido de 9 monómeros citrulinado no reaccionan de forma cruzada con las versiones de tipo silvestre. El análisis de las respuestas contra las células diana tumorales revela un buen reconocimiento de la línea celular EL4 genomanipulada de HLA-A2 transgénica (EL4 HHD) sobre el de las células B16 de HLA no coincidente por las respuestas inducidas por péptido Vim 65-77cit *ex vivo* (figura 16g).

Ejemplo 4. Determinación de si las respuestas CD4 a autoepítopos son una respuesta virgen, de memoria o de Treg

Los ratones generaron una potente respuesta de IFN γ e IL-17 contra una única inmunización de vim 415 cit humana, lo que sugiere que era un refuerzo de una respuesta de memoria o Treg. Para determinar si esta era una respuesta Treg natural que se estaba convirtiendo en una respuesta de IFN γ / IL-17, los ratones se redujeron de Treg naturales con mAb anti-CD25 y se inmunizaron con vim 415 cit de ratón. La reducción de Treg naturales no tuvo influencia

sobre la frecuencia o la avidez de la respuesta, lo que sugiere que los Treg naturales no eran la población de respuesta (figura 17). Para determinar si esta respuesta también se inducía con otros adyuvantes, los ratones se inmunizaron con vim 415-433 cit y 28-49 cit en alumbre, adyuvante incompleto de Freund (IFA), GMCSF, MPLA, TMX201, MPLA/TMX201 o CpG/MPLA y se cribaron para la producción de IFN γ , IL-17 o IL-10 (figura 18). Se

indujeron potentes respuestas de IFN γ / IL-17 contra los epítomos vim 415-433 cit y 28-49 cit con los adyuvantes CpG/MPLA, GMCSF y TMX201, sin embargo, no se observó ninguna respuesta cuando los péptidos se administraron en alumbre o IFA. La inmunización con péptido en IFA indujo respuestas de IL-10 de alta frecuencia contra los péptidos citrulinados.

Los mAb anti-CTLA-4 pueden bloquear la interacción de CTLA-4 con su receptor afín CD80/86, evitando de este modo la inhibición de linfocitos T inducidos por este ligando. La inmunización de los ratones con péptido vim 415 cit en presencia de un mAb anti-CTLA-4 aumentó significativamente la avidez de la respuesta de linfocitos T de 10^{-6} M a 10^{-8} M (figura 19).

Ejemplo 5. Los pacientes con cáncer responden a autopéptidos.

Se cribaron nueve pacientes con melanoma para sus respuestas a una serie de autopéptidos (figura 20). Cinco de ocho pacientes mostraron una respuesta a vim 415 cit en el día 4 (1), día 7 (1) o >día 11 (3). Seis de once pacientes respondieron a vim 415 no modificada en > día 10. Únicamente cuatro de estos pacientes respondieron tanto al péptido modificado como al péptido no modificado. Dos de ocho pacientes mostraron una respuesta contra vim 28 en el día 11 mientras que cinco pacientes respondieron a vim 28 cit. Los dos pacientes que respondieron al péptido no modificado también reconocieron el péptido modificado. Cuatro de los ocho pacientes respondieron a vim 65 y tres de ocho a vim 65 cit. Únicamente dos de estos pacientes respondieron tanto al péptido modificado como al péptido no modificado. Ocho pacientes también mostraron una respuesta contra NYESO-1 119-143 citrulinado; seis de estas respuestas tuvieron su máximo en el día 4-7, lo que sugiere una respuesta fuerte o de memoria. Ocho pacientes mostraron una respuesta contra NYESO-1 119-143 no modificado. Estos pacientes tenían una gama de tipos de HLA (tabla 4). Únicamente uno era HLA-DR4, lo que sugiere que otros haplotipos HLA pueden responder a estos péptidos.

Tabla 4. Haplotipos de pacientes con cáncer

Pt019	A2	A3	B7	B55	DR7	DR16
Pt020	A2		B27	B40	DR3	DR13
Pt021	A3	A25	B44	B35	DR1	DR13
Pt023	A2	A3	B7	B35	DR1	DR15
Pt028	A2	A24	B7	B35	DR1	DR13
Pt029	A2	A25	B15		DR15	
Pt032	A1	A11	B51	B18	DR15	
Pt033			B7		DR11	DR15
Pt034	A11		B7	B35	DR1	DR4
Pt035	A29	A30	B50		DR1	DR7

Ejemplo 6. Expresión de enzimas PAD, vimentina y citrulina.

La citrulinación se realiza por enzimas PAD y en particular las enzimas PAD2 y PAD4. Estas requieren altos niveles de calcio y se activan habitualmente en células muertas o que están muriendo. Por lo tanto, se considera improbable que las células tumorales o sanas expresen proteínas citrulinadas. Los tumores colorrectal y de ovario y los tejidos normales, por lo tanto, se tiñeron para vimentina, citrulinación y expresión de las enzimas PAD2 y PAD4.

Tejidos normales

La expresión de vimentina, PAD2, PAD4 y citrulina se muestra para tejidos normales en la tabla 5.

Las células mesenquimatosas tales como células de tejido conectivo, células sanguíneas y células neuronales expresan todas vimentina como proteína del citoesqueleto. La mayoría de las células dentro del bazo, la tiroides, los testículos, el cuello del útero, el ovario, las amígdalas, el útero, el pulmón, el timo y la mama se tiñen fuertemente para vimentina. Se observó una débil tinción de menos de un 50 % de las células en placenta, recto, colon, páncreas y el duodeno, músculo esquelético y liso, vesícula biliar, esófago, riñón, hígado, vejiga, íleon, yeyuno, estómago. No se observó tinción en piel, tejido adiposo, músculo esquelético, recto, cerebro, cerebelo, diafragma o corazón.

La mayoría de las células hepáticas se tiñeron fuertemente con mAb anti-PAD2. La mayoría de las células de músculo liso y células de cerebro se tiñeron débilmente. Más de la mitad de las células dentro del cerebelo, el páncreas y los testículos se tiñeron fuertemente con PAD2. Menos de un 50 % de las células dentro de la vesícula

biliar, el íleon, el yeyuno, el estómago y el colon se tiñeron fuertemente para PAD2. Mientras que las células del esófago, recto, músculo esquelético, vejiga, mama, riñón, placenta, corazón, diafragma, duodeno, tiroides y pulmón se tiñeron débilmente menos de un 50 % de sus células. La piel, el tejido adiposo, el bazo, las amígdalas, el timo, el ovario y el útero fueron negativos.

5

Tabla 5. Expresión de vimentina, PAD2, PAD4 y proteínas citrulinadas en tejidos normales

	Vimentina		PAD-2		PAD-4		Anti-citrulina		HMGB1	
	Intensidad	Área	Intensidad	Área	Intensidad	Área	Intensidad	Área	Intensidad	Área
Placenta	+	25-50 %	+	25-50 %	+	25-50 %	-	0 %	+	75-100 %
Esófago	+	1-25 %	+	25-50 %	+	25-50 %	+/-	1-25 %	+	50-75 %
Recto	-	-	+	25-50 %	-	-	+/-	1-25 %	-/+	25-50 %
Vesícula biliar	+	1-25 %	++	1-25 %	+	1-25 %	+/-	1-25 %	+	75-100 %
Piel	-	-	-	-	-	-	+/-	75-100 %	-/+	1-25 %
Tejido adiposo	-	-	-	-	-	-	-	0 %	-	0 %
Corazón	-	-	+	25-50 %	+	50-75 %	+/-	75-100 %	-/+	1-25 %
Músculo esquelético	+	1-25 %	+	1-25 %	-	-	+/-	1-25 %	+	75-100 %
Vejiga	+	1-25 %	+	1-25 %	-	-	+/-	1-25 %	+	50-75 %
Íleon	+	25-50 %	++	1-25 %	+	1-25 %	+/-	1-25 %	+	50-75 %
Bazo	++	75-100 %	-	-	-	-	-	-	+	75-100 %
Cerebro	-	-	+	75-100 %	+	75-100 %	+/-	75-100 %	-/+	25-50 %
Yeyuno	+	1-25 %	++	1-25 %	-	-	+/-	25-50 %	-/+	25-50 %
Estómago	+	1-25 %	++	25-50 %	++	1-25 %	-	-	-/+	0-25 %
Mama	++	50-75 %	+	1-25 %	+	25-50 %	+	50-75 %	+	25-50 %
Riñón	+	1-25 %	+	1-25 %	-	-	+/-	75-100 %	-/+	1-25 %
Testículo	++	75-100 %	++	50-75 %	+	50-75 %	+	75-100 %	-/+	25-50 %
Cerebelo	-	0 %	++	50-75 %	++	75-100 %	++	75-100 %	++	75-100 %
Hígado	+	1-25 %	++	75-100 %	++	75-100 %	++	75-100 %	+	75-100 %
Timo	++	50-75 %	50-75 %	-	-	-	+	1-25 %	+	50-75 %
Cuello uterino	+	75-100 %	+	1-25 %	-	-	-	-	-/+	0-25 %
Pulmón	+	50-75 %	+	25-50 %	-	-	+	75-100 %	+	25-50 %
Músculo liso	+	1-25 %	+	75-100 %	-	-	+	75-100 %	-/+	0-25 %
Colon	++	25-50 %	++	50-75 %	++	25-50 %	+	25-50 %	+	50-75 %
Ovario	+	75-100 %	-	-	-	-	-	-	-/+	0-25 %
Amígdala	++	75-100 %	-	-	-	-	-	-	+	50-75 %
Diafragma	-	-	+	1-25 %	+	1-25 %	+	1-25 %	-/+	0-25 %
Páncreas	+	1-25 %	++	50-75 %	-	-	+	75-100 %	+	50-75 %
Útero	++	75-100 %	-	-	-	-	+	1-25 %	-/+	0-25 %

(continuación)

	Vimentina		PAD-2		PAD-4		Anti-citrulina		HMGB1	
	Intensidad	Área	Intensidad	Área	Intensidad	Área	Intensidad	Área	Intensidad	Área
Duodeno	++	25-50 %	+	25-50 %	+	25-50 %	++	50-75 %	+	50-75 %
Tiroides	++	75-100 %	+	25-50 %	+	1-25 %	++	25-50 %	-/+	25-50 %

La mayoría de las células de hígado y cerebelo se tiñeron fuertemente con mab anti-PAD4. La mayoría de las células de cerebro y corazón se tiñeron débilmente. Menos de un 50 % de las células dentro del colon y del estómago se tiñeron fuertemente para PAD4, mientras que menos de un 50 % de las células dentro del íleon, del diafragma, del duodeno, la tiroides, los testículos, la mama, la vejiga urinaria, el esófago se tiñeron débilmente. La piel, el músculo esquelético y liso, la vejiga, el bazo, el yeyuno, el riñón, el hígado, el cuello del útero, el pulmón, el ovario, las amígdalas, el páncreas, el útero, el recto, el tejido adiposo, el timo y el útero fueron negativos.

El cerebelo y el hígado se tiñeron fuertemente con mab anti-citrulina. La mayoría de las células de la piel, el corazón, el riñón, el pulmón, el páncreas y el cerebro se tiñeron débilmente. Más de un 50 % del duodeno se tiñó fuertemente y más de un 50 % de las células de mama y testículo se tiñeron débilmente. Menos de un 50 % de las células dentro del timo y del colon y del yeyuno se tiñeron débilmente. Menos de un 25 % de las células dentro del timo se tiñeron fuertemente y más de un 25 % dentro del esófago, el recto, la vesícula biliar, el músculo esquelético, la vejiga, el íleon, el timo, la amígdala, el diafragma y el útero se tiñeron débilmente. El bazo, la piel, el estómago, el ovario, la amígdala, el tejido adiposo, la placenta y el cuello uterino fueron negativos para citrulina.

Tumores de ovario

Los tumores de ovario son de origen mesenquimatoso y, por lo tanto, se esperaría que expresaran vimentina. PAD4 se expresa débilmente por ovario normal. Se tiñeron 219 tumores de ovario con un mAb específico de vimentina. Únicamente 9/219 (4 %) de los tumores no lograron teñirse, unos 16/219 (7 %) adicionales se tiñeron débilmente, mientras que 194/219 (89 %) se tiñeron fuertemente. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que no había una correlación con la expresión de vimentina y la supervivencia. Hubo una débil correlación entre la expresión de vimentina y la proteína relacionada con sobrecarga ULBP1 ($p=0,017$), PAD4 ($p=0,018$) y CEA-CAM4 ($p=0,033$).

Se tiñeron 219 tumores de ovario con un mAb específico de PAD4 (figura 23). Únicamente 9/219 (4 %) de los tumores no lograron teñirse, unos 126/219 (58 %) adicionales se tiñeron débilmente mientras que 84/219 (38 %) se tiñeron fuertemente. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que no había una correlación con la expresión de PAD4 y la supervivencia. Hubo una débil correlación entre la expresión de PAD4 y las proteínas relacionadas con sobrecarga RAET1E ($p=0,036$) y ULBP1 ($p=0,016$) y una fuerte correlación con la expresión de vimentina ($p=0,001$) y Lewis^x ($p=0,006$).

Aunque los tumores expresan PAD4, deben activarse únicamente en células que están muriendo. Para evaluar si esto es cierto, se tiñeron tumores de ovario con un mAb específico de péptido anti-citrulina. Únicamente 7/228 (3%) de los tumores no lograron teñirse, unos 34/228 (15%) adicionales se tiñeron débilmente mientras que 187/228 (82%) se tiñeron fuertemente. Sin embargo, no todas las células dentro de un tumor se tiñeron. En 69/228 (30 %), menos de un 25 % de las células se tiñeron. En 83/228 (36 %) se tiñeron entre un 25-50 % de las células y, como previamente, estos eran principalmente de origen estromal. En 53/228 (23 %), un 50-75 % de las células se tiñeron incluyendo algunas células epiteliales y en 16/228 (7 %) tumores más de un 75 % de las células se tiñeron. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que no había una correlación con la expresión de citrulina y la supervivencia. Hubo una correlación entre la intensidad de la expresión de citrulina y CEA-CAM5 ($p=0,037$), BCL2 ($p=0,011$) y Lewis^x ($p=0,053$). Hubo una correlación entre el porcentaje de células que expresan citrulina y el grado ($p=0,034$), BCL2 ($p=0,035$), CD59 ($p=0,049$) y ULBP1 ($p=0,044$).

Se tiñeron 360 tumores de ovario para PAD2. Un 9 % no pudo evaluarse debido a la ausencia de suficiente tejido central o por ausencia de células tumorales evaluables (es decir, todas del estroma) en el núcleo. De los 329 tumores de ovario evaluables teñidos con un mAb específico de PAD2, todos los tumores expresaron PAD2. Unos 277/329 (84 %) adicionales se tiñeron débilmente, 52/329 (16 %) se tiñeron fuertemente. El análisis de Kaplan Meier (figura 21a) demostró que había una correlación con la expresión de PAD2 y la supervivencia con alta expresión de PAD2 que es protectora ($p=0,033$). Hubo una correlación entre la expresión de PAD2 con la expresión de MHC ($p=0,038$) y la expresión de HMGB1 ($P=0,008$). Después del análisis de múltiples variables, PAD2 siguió siendo un factor pronóstico independiente ($p=0,002$).

Se tiñeron 360 tumores de ovario para HMGB1. Un 10 % no pudo evaluarse debido a la ausencia de suficiente tejido central o por ausencia de células tumorales evaluables (es decir, todas del estroma) en el núcleo. De los 316 tumores de ovario evaluables teñidos con un mAb específico de HMGB-1, únicamente 23/360 (7 %) de los tumores no lograron teñirse. Unos 42/316 (13 %) adicionales se tiñeron débilmente, 52/329 (87 %) se tiñeron fuertemente. El análisis de Kaplan Meier (figura 21b) demostró que había una correlación con la expresión de HMGB1 y la supervivencia con baja expresión de HMGB1 que es protectora ($p=0,002$). Hubo una débil correlación entre la expresión de HMGB1 y vimentina ($p=0,034$). Después del análisis de múltiples variables, HMGB1 siguió siendo un factor pronóstico independiente ($p=0,02$). La fase tumoral, el tipo de tumor y la respuesta a quimioterapia también se correlacionan con la supervivencia del paciente. En un modelo de múltiples variables, la fase de TNM ($p<0,0001$), el tipo de tumor ($p<0,031$), la respuesta a quimioterapia ($p<0,0001$) y la expresión de HMGB1 ($p=0,002$) fueron indicadores independientes de la supervivencia del paciente.

Cuando la expresión en células tumorales de alta y baja expresión de PAD2 se comparó con la alta y baja elevada

de HMGB1 (figura 21c) en pacientes que mostraban alta expresión de HMGB1 y baja expresión de PAD2, 219 de 310 pacientes (70 %) obtuvieron la peor supervivencia media de 50 meses, y los pacientes con expresión baja de HMGB1 y baja de PAD2 presentaron la mejor supervivencia, con 41 de 310 pacientes (13 %) que tienen un tiempo de supervivencia medio de 101 meses.

Tumores colorrectales

Los tumores colorrectales son de origen epitelial y no se espera que expresen vimentina salvo que estén experimentando transición epitelial a mesenquimatosas. Se observó expresión de PAD2 y PAD4 en colon normal.

Se tiñeron 282 tumores colorrectales con un mAb específico de vimentina. Únicamente 25/282 (9 %) de los tumores no lograron teñirse, unos 4/282 (1 %) adicionales se tiñeron débilmente mientras que 253/282 (90%) se tiñeron fuertemente. Sin embargo, no todas las células dentro de un tumor se tiñeron. En 114/282 (40 %), menos de un 25 % de las células se tiñeron y estas eran todas células estromales. En 68/282 (24 %), entre un 25-50 % de las células se tiñeron y de nuevo estas fueron principalmente de origen estromal. En 42/282 (15 %), un 50-75 % de las células se tiñeron, incluyendo algunas células epiteliales y en 33/282 (12 %) de los tumores más de un 75 % de las células se tiñeron. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que no había una correlación con la intensidad de vimentina o el porcentaje de células teñidas y la supervivencia. No hubo una correlación entre la expresión de vimentina y TRAIL R2 ($p=0,003$), IL-17 en tumores ($p=0,021$), MUC1 ($p=0,001$), PAD2 ($p=0,025$) y PAD4 ($p<0,0001$).

Se tiñeron 296 tumores colorrectales con un mAb específico de PAD2 (figura 26). Únicamente 45/296 (15 %) de los tumores no lograron teñirse, unos 60/296 (20 %) adicionales se tiñeron débilmente mientras que 191/296 (65%) se tiñeron fuertemente. Sin embargo, no todas las células dentro de un tumor se tiñeron. En 99/296 (33 %), menos de un 25 % de las células se tiñeron. En 82/296 (28 %), entre un 25-50 % de las células se tiñeron y de nuevo estas fueron principalmente de origen estromal. En 55/296 (19 %), un 50-75 % de las células se tiñeron y en 15/296 (5 %) de los tumores más de un 75 % de las células se tiñeron. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que no había una correlación con la intensidad de PAD2 o el porcentaje de células teñidas y la supervivencia. Hubo una correlación entre la expresión de PAD2 y CD59 ($p=0,006$), β -catenina ($p=0,005$), el número de linfocitos T CD8 ($p=0,009$), MUC1 ($p=0,012$), vimentina ($p=0,038$) y PAD4 ($p=0,000$).

Se tiñeron 291 tumores colorrectales con un mAb específico de PAD4 (figura 26). Únicamente 18/291 (6 %) de los tumores no lograron teñirse, unos 158/291 (54 %) adicionales se tiñeron débilmente mientras que 115/291 (40%) se tiñeron fuertemente. Sin embargo, no todas las células dentro de un tumor se tiñeron. En 65/291 (22 %), menos de un 25 % de las células se tiñeron. En 68/291 (23 %), entre un 25-50 % de las células se tiñeron y de nuevo estas fueron principalmente de origen estromal. En 98/291 (34 %), un 50-75 % de las células se tiñeron y en 42/291 (14 %) de los tumores más de un 75 % de las células se tiñeron. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que hay una correlación con intensidad de PAD4 y supervivencia (figura 21d, tabla 6; $p=0,032$).

Tabla 6. Medias para el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal que expresan PAD4.

Intensidad de tinción para PAD4	Media (a)			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza del 95 %	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
0,00	44,813	10,483	24,267	65,358
1,00	74,140	4,262	35,786	82,494
2,00	78,125	4,632	59,047	87,203
Global	74,391	3,104	38,307	80,475

La estimación está limitada al tiempo de supervivencia máximo si se censura

El estadio del tumor y la invasión vascular también se correlacionan con la supervivencia del paciente. En un modelo de múltiples variables, la fase de TNM ($p<0,0001$), la invasión vascular ($p<0,0001$) y la expresión de PAD4 ($p=0,017$) fueron indicadores independientes de la supervivencia del paciente.

Hubo una correlación entre la expresión de PAD4 y BCL2 ($p=0,01$), β -catenina ($p=0,001$), el número de linfocitos T CD8 ($p=0,006$), MUC1 ($p=0,000$), CEA.CAM5 ($p=0,000$), CD59 ($p=0,038$), vimentina ($p=0,000$) y PAD2 ($p=0,000$).

Aunque los tumores expresan PAD4, deben activarse únicamente en células que están muriendo. Para evaluar si esto es cierto, se tiñeron tumores colorrectales con un mAb específico de péptido anti-citrulina. De todos los tumores teñidos, 41/316 (13 %) se tiñeron débilmente, mientras que 275/316 (87 %) se tiñeron fuertemente. El análisis de supervivencia de Kaplan Meier demostró que había una débil correlación con la expresión de citrulina y la supervivencia ($p=0,078$). Hubo una correlación entre la expresión de citrulina y la radioterapia ($p=0,001$).

Ejemplo 7. Respuestas antitumorales contra péptidos citrulinados.

Tanto los ratones como los seres humanos muestran respuestas contra autopéptidos citrulinados y vacunas de ADN.

Sin embargo, si estos epítomos no se citrulinan en los tumores, entonces los linfocitos T no tendrán ninguna actividad antitumoral.

Como los tumores humanos expresan vimentina, PAD2/4 y citrulina, se evaluó la respuesta antitumoral de vimentina citrulinada en un modelo de ratón. Se evaluaron esplenocitos de ratones inmunizados con ambos péptidos citrulinados vimentina 415-433 y 28-49 para la capacidad de responder a células tumorales B16 *in vitro*. La figura 22a muestra la liberación de IFN γ específica para células tumorales B16 que expresan HLA-DR4 (B16DR4), que se han inducido a experimentar autofagia por privación de suero en comparación con células no tratadas o células de HLA no coincidentes, lo que indica el reconocimiento de las células tumorales ($p < 0,0001$). El reconocimiento de las células B16DR4 inducidas a autofagia disminuye significativamente cuando se tratan en presencia de inhibidor de autofagia 3-metil adenina (3-MA) ($p < 0,0001$) o inhibidor de PAD Cl amidina ($p = 0,0012$). Por tanto, se indica que este reconocimiento es dependiente de autofagia y citrulinación. Los esplenocitos de ratones inmunizados con péptidos citrulinados vim 28-49 o vim 415-433 o ambos demuestran liberación de Granzima B, un marcador de citotoxicidad, tras estimulación con los péptidos citrulinados Vim 415-433 ($p < 0,0001$) y vim 28-49 ($p < 0,0001$), pero no con las versiones de tipo silvestre (figura 22b-d). También se libera granzima B tras la respuesta a células diana tumorales B16DR4 privadas de suero, lo que sugiere citotoxicidad de las dianas tumorales que presentan los epítomos citrulinados ($p = 0,014$) (figura 22e).

Los ratones inmunizados con vim 415 cit o vim 28 cit se evaluaron para su capacidad de eliminar las células tumorales T2 transfectadas con DR4 humano *in vitro*. La figura 23a muestra que ambos péptidos citrulinados podían inducir células CD4 que eliminaban las dianas transfectadas ya estuvieran pulsadas con el péptido apropiado o no. Como las células T2 expresan vimentina, esto implica que estos péptidos se presentan de forma endógena por las células T2. Por el contrario, no hubo eliminación de esplenocitos normales que también expresan vimentina, pero no enzimas PAD.

A ratones transgénicos de HLA/DR4 se les implantó tumores de B16 transfectados con DR4. Se inmunizaron con péptido citrulinado vim 415-433 o con vacuna de ADN que codifica la secuencia de vim 415-433 y se controló el crecimiento del tumor. Los ratones inmunizados con péptido vim 415-433 cit o vim 415-433 codificado dentro de una vacuna de ADN estimulan fuertes respuestas antitumorales (figura 24a). En ratones no inmunizados, el tumor crecía rápidamente y todos los ratones tuvieron que sacrificarse en el día 23. Por el contrario, el 50 % de los ratones inmunizados con el péptido vim 415 cit no tenían tumor en el día 35 y el 30 % se curaron de su tumor. La inmunización de los ratones con péptido citrulinado vim 28-49 o con una vacuna de ADN que codifica la secuencia de vim 28-49 muestra supervivencia significativamente potenciada sobre el control no inmunizado o aquellos inmunizados con el péptido vim 28-49 de tipo silvestre (figura 24b). Los ratones inmunizados con el péptido vim 28-49 de tipo silvestre mostraron una respuesta antitumoral que casi alcanzaba significancia. La inmunización con los péptidos citrulinados vim 415-433 y 28-49 en combinación muestra una protección contra el tumor y una supervivencia global incluso mejores en comparación con el control ($p < 0,0001$) (figura 24c). Estos estudios muestran que los tumores expresan vimentina citrulinada, que entonces es una diana para los linfocitos T citolíticos CD4 citotóxicos. Para demostrar que estas respuestas antitumorales están mediadas por linfocitos T CD4, los ratones se trataron con anticuerpo anti-CD4 para reducir las células CD4 *in vivo*. La vacunación en combinación con reducción de linfocitos T CD4 anula totalmente la respuesta antitumoral mediada tanto por ambos péptidos Vim 415cit ($p = 0,0005$) y Vim 28cit ($p = 0,0001$, figura 24d y e).

Ambos péptidos citrulinados vim 415-433 y vim 28-49 inducen respuestas de IFN γ de alta frecuencia. El bloqueo de IFN γ *in vivo* anula ambas respuestas antitumorales específicas de péptido citrulinado vim 415-433 y vim 28-49 (figura 25a y b). Las respuestas específicas de vim 415-433cit también muestran respuestas de IL-17. El bloqueo de estas *in vivo* tiene una influencia significativa baja sobre los efectos antitumorales *in vivo* (figura 25c). El bloqueo de IL-17 también tuvo una influencia significativa de pequeño efecto sobre la respuesta antitumoral específica de vim 28-49 cit *in vivo* (figura 25d).

Para determinar la importancia del reconocimiento tumoral directo por respuestas específicas de vim 415-433 y vim 28-49 cit, los ratones se expusieron a tumor B16 que carece de expresión de HLA-DR0401 y posteriormente se inmunizaron con péptidos citrulinados Vim 415-433 o vim 28-49. Los ratones inmunizados con péptidos citrulinados vim 28-49 muestran crecimiento retardado del tumor y supervivencia potenciada en comparación con el control (figura 26a), lo que sugiere que el reconocimiento directo de HLA-DR4 y el péptido afín en las células tumorales no era necesario para la respuesta antitumoral, pero que la liberación acompañante de IFN γ en respuesta a las células presentadoras de antígeno que expresan el péptido afín y HLA-DR4 dentro del entorno tumoral eran responsables de la respuesta antitumoral. En contraste, los ratones inmunizados con vim 415-433 citrulinada no lograban mostrar ninguna respuesta tumoral en este modelo, lo que sugiere que el reconocimiento directo de las células tumorales que expresan HLA-DR4 y el péptido afín era esencial para la respuesta antitumoral de este epítomo. Para confirmar que las respuestas específicas de vim 415-433 son dependientes del reconocimiento directo del tumor, los ratones expuestos a tumor B16 que expresa HLA-DR0401, se inmunizaron con péptido citrulinado vim 415-433 en combinación con un anticuerpo de bloqueo anti-HLA-DR. El bloqueo de HLA-DR evita la respuesta antitumoral (figura 26b).

Ejemplo 8. Homología de vimentina entre diferentes especies.

La vimentina está altamente conservada entre pollo, ratón, perro, oveja, vaca, caballo, cerdo y seres humanos (figura 27). Como la vacuna induce respuestas de linfocitos T en seres humanos y ratones y respuestas antitumorales en ratones, puede asumirse que se observarán respuestas similares en otras especies.

Ejemplo 9. Respuestas de vimentina restringidas mediante otros haplotipos de HLA.

Los ratones de HLA-DR4 generaron una potente respuesta de IFN γ e IL-17 contra una única inmunización de péptido vim 415 cit humano. Para determinar si estos epítomos u otros epítomos de vimentina citrulinada podían inducir respuestas inmunitarias en otros haplotipos, se cribó una gama de péptidos de 20 monómeros (tabla 8) que cubren el tramo completo de vimentina y que incorporan cada arginina remplazada con restos de citrulina para las respuestas de IFN γ / IL-17 en ratones de HLA-DR1 y C57/BI (figura 28). Los ratones se inmunizaron con una combinación de 3 péptidos vim citrulinados en combinación con adyuvantes CpG y MPLA y después se cribaron para las respuestas de IFN γ e IL-17 frente a cada péptido individual en la combinación. La figura 28a muestra que los péptidos vim citrulinados 9, 10, 14, 15 y 16 mostraban respuestas de IFN γ significativas (200-350 manchas/millón de esplenocitos, $p < 0,02$) y el péptido 10 mostró una respuesta de IL-17 (350 manchas/millón de esplenocitos) en ratones transgénicos de HLA-DR1. La figura 28b muestra que los péptidos vim citrulinados 16, 17, 18, 19 y 20 mostraban respuestas de IFN γ significativas (300-500 manchas /millón de esplenocitos, $p < 0,02$) y los péptidos 19 y 20 mostraban una respuesta de IL-17 (~400 manchas/millón de esplenocitos, $p < 0,05$) en ratones C57BI/6. La tabla 7 muestra las secuencias de estos péptidos, la posición de los aminoácidos citrulina y la posición dentro de la proteína vimentina.

La figura 28c muestra respuestas en ratones HLA-A2/DR1 inmunizados con péptido citrulinado vim 14.

Tabla 7. Respuestas de IFN γ / IL-17 a vimentina citrulinada

Antígeno	Posición del aminoácido dentro de la secuencia	Péptido	Regiones centrales	Respuesta significativa en ratones HLA-DR1	Respuesta significativa en ratones C57BI
Vimentina 1	1-19	MSTRSVSSSSYRRMFGGPG		-	-
Vimentina 2	3-22	RSVSSSSYRRMFGGPGTAS		-	-
Vimentina 3	14-32	MFGGPGTASRPSSSRSYVT		-	-
Vimentina 4	19-33	GTASRPSSSRSYVTTSTRT		-	-
Vimentina 5	26-44	SSRSYVTTSTRTYSLGSAL		-	-
Vimentina 6	36-54	RTYSLGSALRPSTSRSLYA		-	-
Vimentina 7	41-59	GSALRPSTSRSLYASSPGG		-	-
Vimentina 8	55-66	SSPGGVYATRSSAVRLRSS		-	-
Vimentina 9	61-79	YATRSSAVRLRSSVPGVRL	RSSVPGVRL SAVRLRSSV ATRSSAVRL	+	-
Vimentina 10	69-87	RLRSSVPGVRLQDSVDFS	RSSVPGVRL GVRLLQDSV	+	
Vimentina 11	91-109	AINTEFKNTRTNEKVELQE		-	-
Vimentina 12	103-121	EKVELQELNDRFANYIDKV		-	-
Vimentina 13	113-131	RFANYIDKVRFLQKQNKIL		-	-
Vimentina 14	125-154	EQLKGQGKSRLGDLYEEM	QLKGQGKSR KSRLGDLYE	+	
Vimentina 15	148-166	DLYEEMRELRRQVDQLTN	ELRRQVDQL EMRELRRQV	+	

(continuación)

Antígeno	Posición del aminoácido dentro de la secuencia	Péptido	Regiones centrales	Respuesta significativa en ratones HLA-DR1	Respuesta significativa en ratones C57Bl
Vimentina 16	161-179	VDQLTNDKAR <u>VE</u> VERDNLA	QLTNDKARV	+	+
			VEVERDNLA LTN DKARVE		
Vimentina 17	166-184	NDKAR <u>VE</u> VERDNLAEDIMR	EVERDNLA	-	+
Vimentina 18	176-194	DNLAEDIMRLREKLQE <u>EM</u> L	IMRLREKLQ	-	+
Vimentina 19	187-205	EKLQE <u>EM</u> LQREEAENTLQS	QREEAENTL KLQE <u>EM</u> LQR		+
Vimentina 20	198-216	EAENTLQSFRQDVNDASLA	FRQDVNDAS ENTLQSFRQ		+
Vimentina 21	211-229	DNASLARLDLERKVESLQE		-	-
Vimentina 22	262-280	KPDLTAALRDVRQQYESVA		-	-
Vimentina 23	295-312	FADLSEANRNNDALRQAK		-	-
Vimentina 24	301-319	AANRNNDALRQAKQEST <u>EY</u>		-	-
Vimentina 25	311-329	QAKQEST <u>EY</u> RRQVQSLTCE		-	-
Vimentina 26	334-352	KGTNESLERQMREMEENFA		-	-
Vimentina 27	355-373	AANYQDTIGRLQDEIQNMK		-	-
Vimentina 28	370-388	QNMKEEMARHLREYQDLLN		-	-
Vimentina 29	392-410	ALDIEIATYRKLLGE <u>ES</u> R		-	-
Vimentina 30	401-419	RKLLGE <u>ES</u> SRISLPLNFS		-	-
Vimentina 31	415-433	LPNFSSNLRET <u>N</u> LDLPL		-	-
Vimentina 32	431-449	LPLVDTHSKRTLLIKTVET		-	-
Vimentina 33	441-459	TLLIKTVETRDGQVINETS		-	-

Los restos de arginina sustituidos con citrulina están subrayados

Ejemplo 10. Manera de cribar epítomos de linfocitos T citrulinados

- 5 Cualquier proteína citrulinada que se ha descrito en la bibliografía puede ser una diana potencial para linfocitos T. Sin embargo, en primer lugar debe tener la capacidad de presentarse en antígenos MHC de clase I y/o MHC de clase II y debe reconocerse por un receptor de linfocitos T. Las células presentadoras de antígeno experimentan de forma constitutiva autofagia y es dentro de estos autofagosomas de doble membrana que puede acumularse suficiente Ca^{2+} intracelular para activar las enzimas PAD, los epítomos de citrulinado que después se presentan en los antígenos MHC. Finalmente, para que sea una diana antitumoral, las células tumorales también deben inducir la citrulinación dentro de los autofagosomas y presentar el mismo epítomo modificado en antígenos MHC. Por lo tanto, para identificar los epítomos citrulinados que aún pueden estimular la inmunidad antitumoral, es necesario cribar proteínas diana para la inducción de respuestas de linfocitos T y para el reconocimiento de tumores.
- 10
- 15 a) Proliferación de linfocitos T *in vitro* de sangre periférica humana por péptidos citrulinados.

La sangre periférica humana puede estimularse *in vitro* como se resume en el ejemplo 5. Los péptidos de 20 monómeros citrulinados que abarcan la proteína completa pueden cribarse para la proliferación de linfocitos T. La clasificación de linfocitos T CD4 y CD8 puede identificar epítomos CD4 y CD8 y la restricción HLA puede identificarse

por tipado de HLA del donador.

b) Estimulación de las células de ratones convencionales o transgénicos de HLA *in vitro* o *in vivo* con péptidos citrulinados de 20 monómeros que abarcan la totalidad de una proteína diana.

Para determinar si los epítomos de citoqueratina-8 citrulinados podrían inducir respuestas inmunitarias, se cribó una gama de péptidos de 20 monómeros (tabla 8) que cubren el tramo completo de citoqueratina-8 y que incorporan argininas en la región de unión central predicha remplazadas con restos de citrulina para las respuestas de IFN γ / IL-17 en ratones de HLA-DR1 y C57 Bl (figura 29). Los ratones se inmunizaron con una combinación de 3 péptidos de citoqueratina 8 citrulinados en combinación con adyuvantes CpG y MPLA y después se cribaron para las respuestas de IFN γ e IL-17 contra cada péptido individual en la combinación. La figura 28a muestra que los péptidos de citoqueratina 8 citrulinados 1, 2, 3, 13, 16 y 17 mostraban respuestas de IFN γ significativas (200-300 manchas/millón de esplenocitos, $p < 0,02$) y los péptidos 1, 2, 3, 13 y 14 mostraban una respuesta de IL-17 (250-350 manchas/millón de esplenocitos; $p < 0,02$) en ratones transgénicos de HLA-DR1. La figura 29b muestra que los péptidos de citoqueratina 8 no estimulaban una respuesta en ratones C57Bl.

Tabla 8 Respuestas de IFN γ / IL-17 a citoqueratina citrulinada

Antígeno	Coordenadas	Péptidos	Regiones centrales	Respuesta significativa en ratones HLA-DR1	Respuesta significativa en ratones C57Bl
Citoqueratina 1	229 - 247	EEEIRELQSQISDTSVVLS	EIRELQSQI	+	-
Citoqueratina 2	363 - 382	AKQDMARQLREYQELMNVL	ARQLREYQE AKQDMARQL	+	
Citoqueratina 3	360 - 378	LQRAKQDMARQLREYQELM	AKQDMARQL ARQLREYQE	+	
Citoqueratina 4	324 - 342	LKGQRASLEAAIADAEQRG		-	-
Citoqueratina 5	239 - 257	ISDTSVVLSMDNSRSLDMD		-	-
Citoqueratina 6	137 - 156	DNMFESYINNLRRLQLETLGQ		-	-
Citoqueratina 7	388 - 407	IATYRKLLLEGESRLESGMQ		-	-
Citoqueratina 8	264 - 281	KAQYEDIANRSRAEESM		-	-
Citoqueratina 9	460 - 478	AVVVKKIETRDGKLVSSE		-	-
Citoqueratina 10	99 - 117	NNKFASFIDKVRFLQEQNK		-	-
Citoqueratina 11	202 - 221	EAYMNKVELESRLGLTDEI		-	-
Citoqueratina 12	208 - 226	VELESRLGLTDEINFLRQ		-	-
Citoqueratina 13	29 - 44	PGSRISSSFSRVGSS	ISSSSF SRV	+	-
Citoqueratina 14	13 - 30	STSGPRAFSSRSYTS GPG	GPRAFSSRS	+	-
Citoqueratina 15	174 - 193	DFKNKYEDEINKRTEMENEF		-	-
Citoqueratina 16	355 - 371	ELEAALQRAKQDMARQL	EAALQRAKQ	+	-
Citoqueratina 17	78 - 95	LEVDPNIQAVRTQEKEQI	NIQAVRTQE DPNIQAVRT	+	-
Citoqueratina 18	297 - 316	KHGDDLRRRTKTEISEMNRNI		-	-
Los restos de arginina sustituidos en citrulina están subrayados					

c) Cribado de epítopos citrulinados conocidos para respuestas de linfocitos T

La proteína ING4 se citrulina por PAD4 en la posición 133 en su región NLS. Esto evita su asociación con p53 que es esencial para la activación de p53. La proteína ING4 citrulinada se degrada rápidamente, lo que sugiere que puede expresarse abundantemente en MHC de clase II. El péptido ING4 AQKKLKLVRTSPEYGMMP no logró estimular ninguna respuesta inmunitaria en ratones transgénicos de HLA-DR1, pero AQKKLKLVCitTSPEYGMMP estimuló una respuesta de IFN γ /IL-17 (media de 200 manchas/millón de esplenocitos) contra el péptido citrulinado, pero ninguna respuesta contra el péptido de tipo silvestre. La respuesta a los péptidos citrulinados se bloqueó con un mAb de bloqueo de MHC de clase II (figura 31a). Este es un ejemplo adicional de una proteína que puede estimular respuestas CD4 específicas de citrulinación/tumor.

d) Cribado de cualquier proteína para epítopos de linfocitos T citrulinados.

Como se ha demostrado en el ejemplo 2, la inmunización con ADN que codifica un antígeno completo provoca respuestas contra péptidos citrulinados. En esta ocasión se demuestra que si se inmuniza con ADN que codifica antígeno completo y se criba frente a todos los posibles péptidos de 20 monómeros citrulinados, únicamente las respuestas de linfocitos T a los epítopos citrulinados presentados por las moléculas HLA estimulan una respuesta inmunitaria. El panel de péptidos citrulinados se detalla en la tabla 7. La figura 33a muestra respuestas generadas por la inmunización con ADN de vimentina en ratones transgénicos de HLA-DR4 y la figura 34b muestra respuestas en ratones transgénicos de HLA-A2/DR1. Los ratones transgénicos de HLA-DR4 muestran respuestas de alta frecuencia específicas para los péptidos citrulinados de vimentina 28-49 y 415-433, así como respuestas de menor frecuencia contra los péptidos vimentina 19-33, 26-44 y 36-54. Los ratones transgénicos de HLA-A2/DR1 demuestran respuestas de alta frecuencia específicas para el péptido citrulinado de 65-77. Esto ejemplifica el uso de ADN que codifica antígenos completos para inducir respuestas de linfocitos T contra citrulinación y es un método excelente para cribar epítopos de linfocitos T citrulinados adicionales. Asimismo, las proteínas pueden citrulinarse *ex vivo* incubándolas con enzimas PAD en presencia de altos niveles de calcio. Estas proteínas pueden usarse para inmunizar ratones y los linfocitos T entonces se criban frente a todos los posibles péptidos de 20 monómeros citrulinados.

e) Cribado de péptidos predichos seleccionados basándose en el valor de unión a MHC y los restos de arginina dentro de la región central.

Se ha demostrado que pueden inducirse respuestas contra epítopos citrulinados, pero en esta ocasión también se demuestra que los epítopos peptídicos pueden seleccionarse basándose en los valores de unión a MHC predichos y la presencia de restos de arginina dentro de la región de unión a MHC central. Para este ejemplo, se seleccionaron péptidos de BiP, HSP90, CXCL10, CXCL12 e ING4 que tenían una alta unión predicha a HLA-DR4 usando el algoritmo de predicción SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) y después se restringieron adicionalmente mediante la presencia de argininas en la región de unión central (determinada usando el algoritmo de predicción IEDB (www.iedb.org)) (Tabla 9). Se ensayaron los péptidos que contienen todas las argininas cambiadas a citrulina.

Tabla 9. Péptidos HLA-DR4 predichos

	SECUENCIA	COORDENADA	NÚCLEO	VALOR SYMPATHEI	Respuesta en ratones HLA-DR4
HSP90 346-360	RAPFDLFENRKKNN	346-360	FDLFENRKK	28	+
HSP90 378-392	IPEYLNFIIRGVVDSE	378-392	YLNFIIRGVV, FIRGWDSE	28	-
HSP90 456-477	RKKLSELLRYYTSASGDE MVSL	456-477	LRYYTSASG, LLRYYTSAS, LSELLRYYT	26/22/20	+
HSP90beta 456-470	RRRLSELLRYHTSQS	546-470		26	
	SECUENCIA	COORDENADA	NÚCLEO	VALOR SYMPATHEI	Respuesta en ratones HLA-DR4
BiP 39-53	YSCVGVFKNGRVEII	39-53	VGVFKNR FKNGRVEII	26	+
BiP 172-186	VPAYFNDAQRQATKDA	172-186	YFNDAQRQA	28	+
BiP 522-536	KITITNDQNRLTPEE	522-536	ITNDQNRLT	26	-
ING4 44-58	KLATEYMSSARSLSSEEK	44-58	YMSSARSLS, MSSARSLS, TEYMSSARS	26/22	+
CXCL10 57-71	CPRVEIIATMKKKGE	57-71	VEIIATMKK, RVEIIATMK	26	-
CXCL12 54-68	NCALQIVARLKNNNR	54-68	LQIVARLKN, VARLKNNNR	26	-

Los ratones transgénicos de HLA-DR4 se inmunizaron hasta en tres ocasiones con péptidos citrulinados y se evaluaron *ex vivo* las respuestas por elispot de IFN γ contra péptidos citrulinados y no modificados pertinentes. La figura 34 muestra respuestas significativas a BiP 39-53, BiP 172-186, HSP90 346-360, HSP90 456-477 y ING4 44-58 citrulinados sobre aquellas contra el péptido no modificado o el control de fondo. Esto proporciona otro método eficaz para la selección de epítomos de linfocitos T citrulinados.

Para demostrar que los linfocitos T reconocen los tumores, pueden cribarse para el reconocimiento de células diana tumorales, separarse con ácido para alentar el reciclado de MHC y privarse de suero para inducir autofagia (figura 22a y e). La función de la citrulinación y la autofagia puede confirmarse usando inhibidores de PAD y autofagia (figura 22a). Las respuestas antitumorales *in vivo* pueden medirse iniciando tumores, inmunizando con péptidos citrulinados y controlando el crecimiento del tumor como se muestra en las figuras (24-26).

Ejemplo 11.

Los estudios han demostrado que es posible determinar la diferenciación de células CD4 vírgenes en diferentes fenotipos auxiliares dependiendo de su medio de citocinas presente cuando se estimulan. Por el contrario, se ha demostrado por primera vez en la figura 15 que determinados epítomos pueden determinar la diferenciación de linfocitos T auxiliares a pesar del entorno de citocinas. Vim415 cit estimulaba un fenotipo Th1/IL-17 incluso cuando se inmunizaba en presencia del adyuvante Th2 adyuvante completo de Freund. Esto sugiere que la potencia del acoplamiento del receptor de linfocitos T CD4 con el péptido MHC puede determinar la diferenciación de linfocitos T. En este contexto, se ha demostrado que vim415 de tipo silvestre estimula una respuesta de IL-10 (figura 30; media de 580 manchas/millón de esplenocitos, $p=0.0249$) incluso en presencia de los adyuvantes Th1, CpG/MPLA. Sin embargo, no logró estimular una respuesta de IFN γ o IL-17 significativa.

Referencias

1. Gao, F.G., et al., Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell. *Cancer Res*, 2002. 62(22): págs. 6438-41.
2. Janssen, E.M., et al., CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*, 2003. 421(6925): págs. 852-6.
3. Fearon, E.R., et al., Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*, 1990. 60(3): págs. 397-403.
4. Baxevanis, C.N., et al., Tumor-specific CD4+ T lymphocytes from cancer patients are required for optimal induction of cytotoxic T cells against the autologous tumor. *J Immunol*, 2000. 164(7): págs. 3902-12.
5. Cella, M., et al., Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.*, 1996. 184(2): págs. 747-52.
6. Ridge, J.P., F. Di Rosa y P. Matzinger, A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*, 1998. 393(6684): págs. 474-8.
7. Schoenberger, S.P., et al., T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 1998. 393(6684): págs. 480-3.
8. Ayyoub, M., et al., An immunodominant SSX-2-derived epitope recognized by CD4+ T cells in association with HLA-DR. *J Clin Invest*, 2004. 113(8): págs. 1225-33.
9. Halder, T., et al., Isolation of novel HLA-DR restricted potential tumor-associated antigens from the melanoma cell line FM3. *Cancer Res*, 1997. 57(15): págs. 3238-44.
10. Pardoll, D.M. y S.L. Topalian, The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998. 10(5): págs. 588-94.
11. Topalian, S.L., MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*, 1994. 6(5): págs. 741-5.
12. Muranski, P., et al., Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*, 2008. 112(2): págs. 362-73.
13. Paludan, C., et al., Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*, 2002. 169(3): págs. 1593-603.
14. Quezada, S.A., et al., Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.*, 2010. 207(3): págs. 637-50.
15. Xie, Y., et al., Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated *in vivo* eradicate established melanoma. *Journal of Experimental Medicine*, 2010. 207(3): págs. 651-667.
16. Brandmaier, A.G., et al., High-avidity autoreactive CD4+ T cells induce host CTL, overcome T(regs) and mediate tumor destruction. *J Immunother*, 2009. 32(7): págs. 677-88.
17. Lauwen, M.M., et al., Self-tolerance does not restrict the CD4+ T-helper response against the p53 tumor antigen. *Cancer Res*, 2008. 68(3): págs. 893-900.
18. Touloukian, C.E., et al., Identification of a MHC class II-restricted human gp100 epitope using DR4-IE transgenic mice. *J Immunol*, 2000. 164(7): págs. 3535-42.
19. Mohanan, S., et al., Potential role of peptidylarginine deiminase enzymes and protein citrullination in cancer pathogenesis. *Biochem Res Int*, 2012. 2012: págs. 895343.
20. Nomura, K., Specificity and mode of action of the muscle-type protein-arginine deiminase. *Arch Biochem Biophys*, 1992. 293(2): págs. 362-9.

21. Stensland, M.E., et al., Primary sequence, together with other factors, influence peptide deimination by peptidylarginine deiminase-4. *Biol Chem*, 2009. 390(2): págs. 99-107.
22. Klareskog, L., et al., Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*, 2008. 26: págs. 651-675.
- 5 23. Migliorini, P., et al., The immune response to citrullinated antigens in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 2005. 4(8): págs. 561-564.
24. Nijenhuis, S., et al., Autoantibodies to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: clinical performance and biochemical aspects of an RA-specific marker. *Clinica Chimica Acta*, 2004. 350(1-2): págs. 17-34.
25. Sebbag, M., et al., Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins. *European Journal of Immunology*, 2006. 36(8): págs. 2250-2263.
- 10 26. Vossenaar, E.R., et al., Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther*, 2004. 6(2): págs. R142-50.
27. Vossenaar, E.R., et al., Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004. 63(4): págs. 373-381.
- 15 28. Birnboim, H.C., et al., Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J Immunol*, 2003. 171(2): págs. 528-532.
29. Herzog, J., et al., Activated antigen-presenting cells select and present chemically modified peptides recognized by unique CD4 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(22): págs. 7928-7933.
- 20 30. Bronte, V., et al., Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *Journal of Experimental Medicine*, 2005. 201(8): págs. 1257-1268.
31. Arentz-Hansen, H., et al., The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. Exp. Med.*, 2000. 191(4): págs. 603-12.
- 25 32. Pudney, V.A., et al., DNA vaccination with T-cell epitopes encoded within Ab molecules induces high-avidity anti-tumor CD8(+) T cells. *European Journal of Immunology*, 2010. 40(3): págs. 899-910.
33. DURRANT, L.G.M., Rachael Louise; PUDNEY, Victoria Anne; , *NUCLEIC ACIDS*, 2008.
34. Feitsma, A.L., et al., Identification of Citrullinated Vimentin Peptides as T Cell Epitopes in HLA-DR4-Positive Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2010. 62(1): págs. 117-125.
- 30 35. Kryszke, M.H. y P. Vicart, Regulation of the expression of the human vimentin gene: Application to cellular immortalization. *Pathologie Biologie*, 1998. 46(1): págs. 39-45.
36. Paulin, D., EXPRESSION OF THE GENES-CODING FOR THE HUMAN INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS. *Pathologie Biologie*, 1989. 37(4): págs. 277-282.
37. Ramaekers, F.C., et al., Use of antibodies to intermediate filaments in the characterization of human tumors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1982. 46 Pt 1: págs. 331-9.
- 35 38. Thomas, P.A., et al., Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 1999. 5(10): págs. 2698-2703.
39. Conforti, G., et al., DIFFERENT VIMENTIN EXPRESSION IN 2 CLONES DERIVED FROM A HUMAN COLOCARCINOMA CELL-LINE (LOVO) SHOWING DIFFERENT SENSITIVITY TO DOXORUBICIN. *British Journal of Cancer*, 1995. 71(3): págs. 505-511.
- 40 40. Moran, E., et al., Co-expression of MDR-associated markers, including P-170, MRP and LRP and cytoskeletal proteins, in three resistant variants of the human ovarian carcinoma cell line, OAW42. *European Journal of Cancer*, 1997. 33(4): págs. 652-660.
41. Gilles, C., et al., Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol*, 1996. 180(2): págs. 175-80.
- 45 42. Williams, A.A., et al., CD 9 and vimentin distinguish clear cell from chromophobe renal cell carcinoma. *BMC Clin Pathol*, 2009. 9: págs. 9.
43. Gustmann, C., et al., CYTOKERATIN EXPRESSION AND VIMENTIN CONTENT IN LARGE CELL ANAPLASTIC LYMPHOMAS AND OTHER NON-HODGKINS-LYMPHOMAS. *American Journal of Pathology*, 1991. 138(6): págs. 1413-1422.
- 50 44. Yamamoto, Y., K. Izumi y H. Otsuka, AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF EPITHELIAL MEMBRANE ANTIGEN, CYTOKERATIN, AND VIMENTIN IN PAPILLARY THYROID-CARCINOMA - RECOGNITION OF LETHAL AND FAVORABLE PROGNOSTIC TYPES. *Cancer*, 1992. 70(9): págs. 2326-2333.
45. Coppola, D., et al., Prognostic significance of p53, bcl-2, vimentin, and S100 protein-positive Langerhans cells in endometrial carcinoma. *Human Pathology*, 1998. 29(5): págs. 455-462.
- 55 46. Fuyuhiko, Y., et al., Clinical Significance of Vimentin-positive Gastric Cancer Cells. *Anticancer Research*, 2010. 30(12): págs. 5239-5243.
47. Takemura, K., et al., EXPRESSION OF VIMENTIN IN GASTRIC-CANCER - A POSSIBLE INDICATOR FOR PROGNOSIS. *Pathobiology*, 1994. 62(3): págs. 149-154.
- 60 48. Ivaska, J., Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small Gtpases*, 2011,2(1): págs. 51-53.
49. Vuoriluoto, K., et al., Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 2011,30(12): págs. 1436-1448.
50. Hill, JA, et al., Cutting edge: The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*, 2003. 171(2): págs. 538-541.
- 65 51. Ireland, J., J. Herzog y E.R. Unanue, Cutting edge: Unique T cells that recognize citrullinated peptides are a

feature of protein immunization. *J Immunol*, 2006. 177(3): págs. 1421-1425.

52. Asaga, H., et al., Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 2001,70(1): págs. 46-51.

53. Nagata, S. y T. Senshu, PEPTIDYLARGININE DEIMINASE IN RAT AND MOUSE HEMATOPOIETIC-CELLS. *Experientia*, 1990. 46(1): págs. 72-74.

54. Loos, T., et al., Citrullination of CXCL10 and CXCL11 by peptidylarginine deiminase: a naturally occurring posttranslational modification of chemokines and new dimension of immunoregulation. *Blood*, 2008. 112(7): pág. 2648-2656.

55. Proost, P., et al., Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 2008. 205(9): pág. 2085-2097.

56. Struyf, S., et al., Citrullination of CXCL12 Differentially Reduces CXCR4 and CXCR7 Binding with Loss of Inflammatory and Anti-HIV-1 Activity via CXCR4. *J Immunol*, 2009. 182(1): págs. 666-674.

57. Ireland, J.M. y E.R. Unanue, Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2011,208(13): págs. 2625-2632.

58. Asaga, H., M. Yamada y T. Senshu, Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 243(3): págs. 641-6.

59. Mor-Vaknin, N., et al., Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nature Cell Biology*, 2003. 5(1): págs. 59-63.

60. Vossenaar, E.R., et al., PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 2003. 25(11): págs. 1106-18.

61. Kaufmann, S.H.E., The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nature Reviews Microbiology*, 2007. 5(7): págs. 491-504.

62. Kubilus, J., R.F. Waitkus y H.P. Baden, PARTIAL-PURIFICATION AND SPECIFICITY OF AN ARGININECONVERTING ENZYME FROM BOVINE EPIDERMIS. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1980. 615(1): pág. 246-251.

63. Senshu, T., et al., Studies on specificity of peptidylarginine deiminase reactions using an immunochemical probe that recognizes an enzymatically deiminated partial sequence of mouse keratin K1. *Journal of Dermatological Science*, 1999. 21(2): págs. 113-126.

64. Chang, X., et al., Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2005. 44(1): págs. 40-50.

65. Chang, X. y J. Han, Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog*, 2006. 45(3): págs. 183-96.

66. Guo, Q. y W. Fast, Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *J Biol Chem*, 2011,286(19): págs. 17069-78.

67. Karlin, S. y S.F. Altschul, Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): págs. 5873-7.

68. Altschul, S.F., et al., Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990. 215(3): págs. 403-10.

69. Altschul, S.F., et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(17): págs. 3389-402.

70. Myers, E.W. y W. Miller, Approximate matching of regular expressions. *Bull Math Biol*, 1989. 51(1): pág. 5-37.

71. Torelli, A. y C.A. Robotti, ADVANCE and ADAM: two algorithms for the analysis of global similarity between homologous informational sequences. *Comput Appl Biosci*, 1994. 10(1): págs. 3-5.

72. Pearson, W.R. y D.J. Lipman, Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(8): págs. 2444-8.

73. Remington, R., Remington's pharmaceutical sciences. 16ª ed. 1980: Mack Pub. Co.

74. Stewart, Solid phase peptide synthesis. 2ª ed. 1984, Rockford: Illinois Pierce Chemical Company.

75. Bodanzsky, B., The practice of peptide synthesis. 1984, Nueva York: Springer Verlag.

76. Sambrook, J., Fritsch y Maniatis, Molecular cloning: A laboratory manual. 2ª ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

77. Ausubel, J., Short protocols in molecular biology. 1992: John Wiley y Sons

78. Pluckthun, A., Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology (N Y)*, 1991,9(6): págs. 545-51.

79. Reff, M.E., High-level production of recombinant immunoglobulins in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1993. 4(5): pág. 573-6.

80. Trill, J.J., A.R. Shatzman y S. Ganguly, Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1995. 6(5): págs. 553-60.

81. Palena, C., et al., Strategies to target molecules that control the acquisition of a mesenchymal-like phenotype by carcinoma cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011,236(5): págs. 537-45.

82. Denzin, L.K., et al., Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigenprocessing defect in T2 cells. *Immunity*, 1994. 1(7): págs. 595-606.

83. Kovats, S., et al., Presentation of abundant endogenous class II DR-restricted antigens by DM-negative B cell lines. *Eur J Immunol*, 1997. 27(4): págs. 1014-21.

84. Metheringham, R.L., et al., Antibodies designed as effective cancer vaccines. *MAbs*, 2009. 1(1): págs. 71-85.

85. Quinn MJ BP, B.A., Kirby EA, Jones J, Cancer trends in england and wales, 1950-1999, en Londres: Stationery Office 2001. pág. 206-207.

86. NICE, Improving outcomes in colorectal cancers: Manual update, 2004: Londres: National Institute for Clinical

Excellence.

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado *in vitro* para identificar un epítipo de linfocitos T citrulinados de un péptido diana que estimula la inmunidad antitumoral, que comprende:
 - 5 el cribado del péptido diana para la inducción de una respuesta de linfocitos T específica contra un epítipo citrulinado; y
 - el cribado de linfocitos T específicos para el epítipo citrulinado para el reconocimiento de tumores.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el cribado para la inducción de una respuesta de linfocitos T contra un epítipo citrulinado comprende la clasificación de linfocitos T CD4 y CD8 para identificar si el epítipo citrulinado es un epítipo de CD4 o CD8.

Figura 1

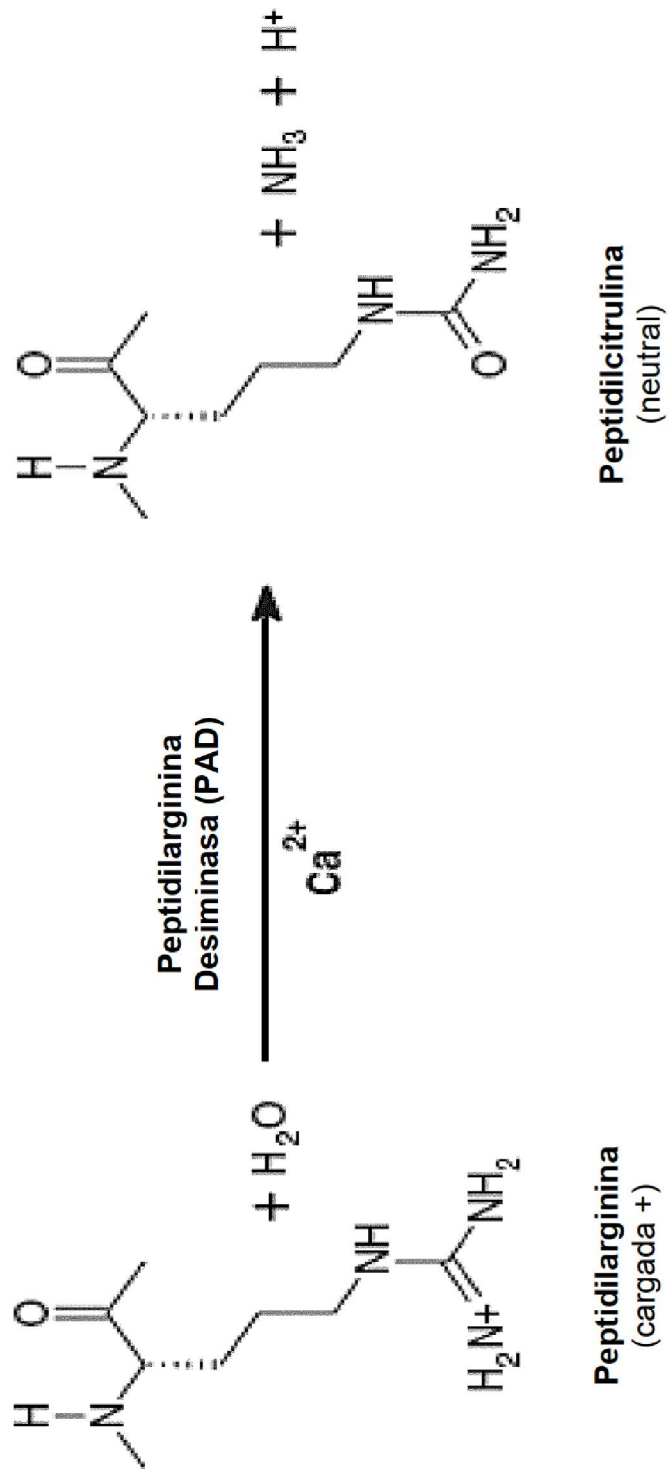


Figura 2

10	20	30	40	50	60
MSTRSVSSSS	YRRMFGPGT	ASRPSSRSY	VTTSTRYSL	GSALRPSTSR	SLYASSPGGV
70	80	90	100	110	120
YATRSSAVPL	RSSVEGVRLL	QDSVDFSLAD	AINTEFKNTR	TNEKVELQEL	NDRFANYIDK
130	140	150	160	170	180
VRFLEQQNKI	LLAELEQLKG	QGKSRLGDLY	EEEMRELRRQ	VDQLTNDKAR	VEVERDNLAE
190	200	210	220	230	240
DIMRLREKLQ	EEMLQREAAE	NTLQSFRODV	DNASLARLDL	ERKVESLQEE	IAFLKKLHEE
250	260	270	280	290	300
EIQELQAQIQ	EQHVQIDVDV	SKPDILTAALR	DVRQQYESVA	AKNLQEAEEW	YKSKFADLSE
310	320	330	340	350	360
AAANRNNDALR	QAKQESTEYR	RQVQSILTCEV	DALKGTNESL	ERQMREMEEN	FAVEAANYQD
370	380	390	400	410	420
TIGRLQDEIQ	NMKEEMARHL	REYQDLLNVK	MALDIETATY	RKLLEGEESR	ISLPLPNFSS
430	440	450	460		
LNLRETNLDS	LPLVDTHSKR	TLLIKTVETR	DGQVINETSQ	HHDDLE	

Figura 3

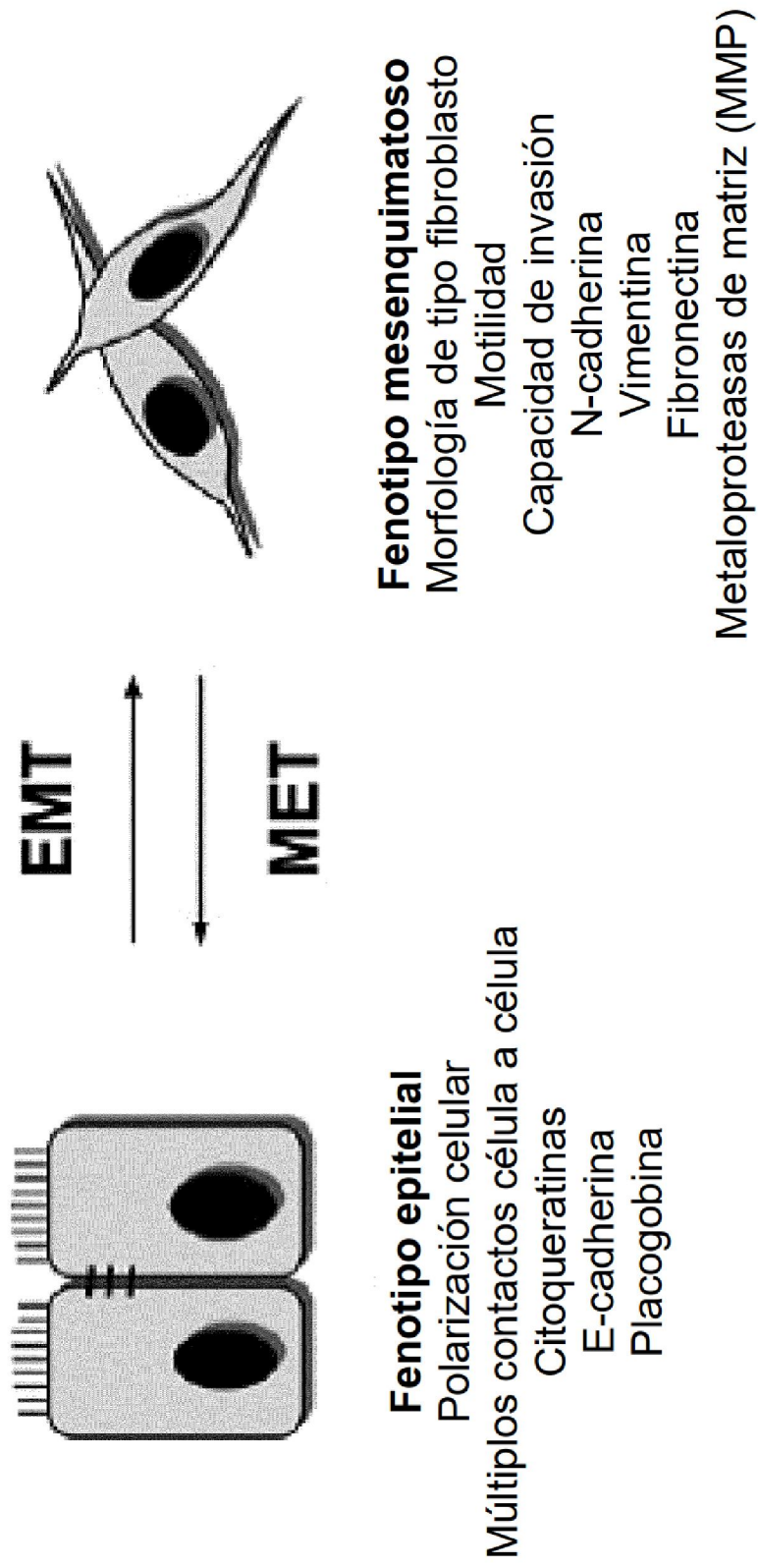


Figura 4

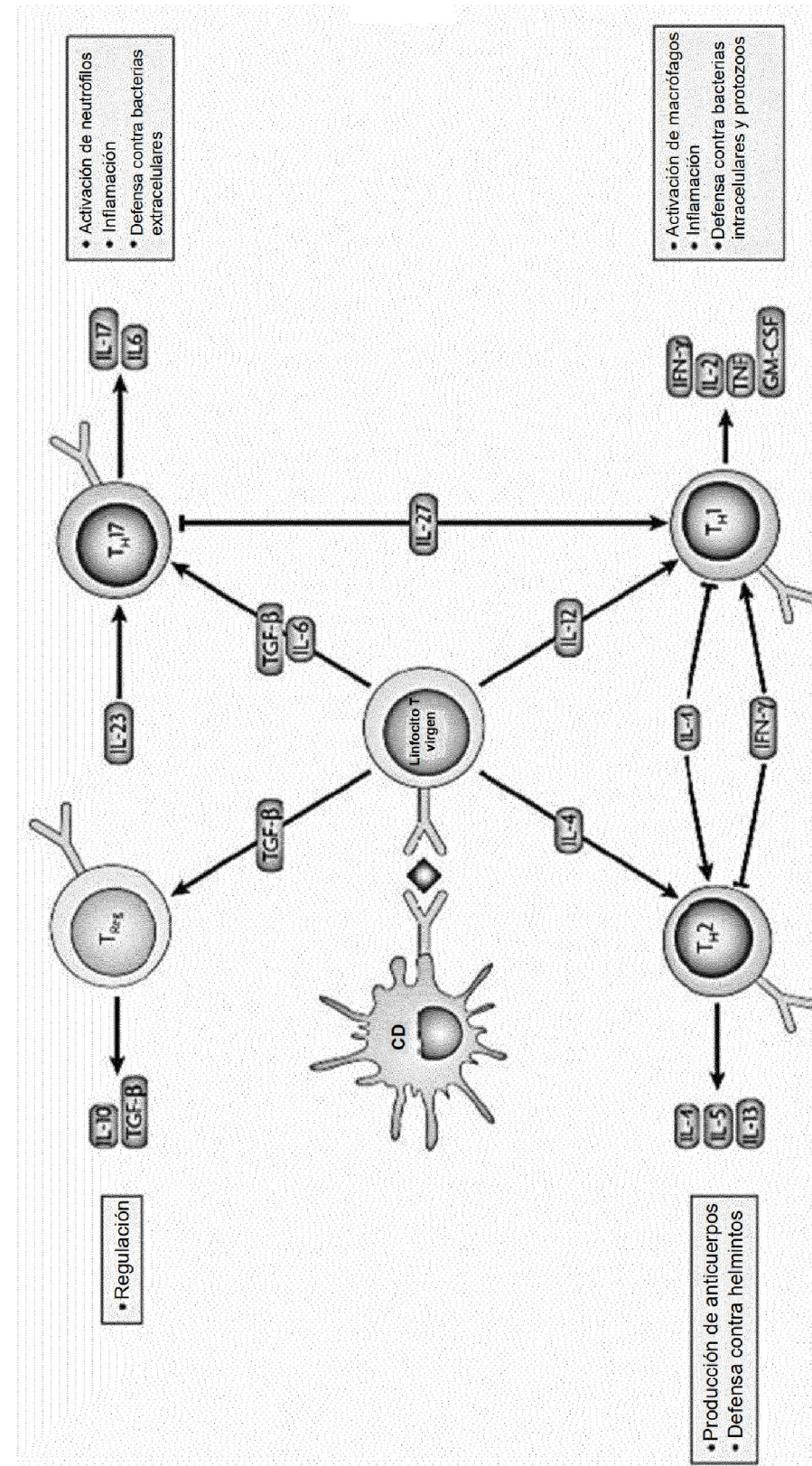


Figura 5

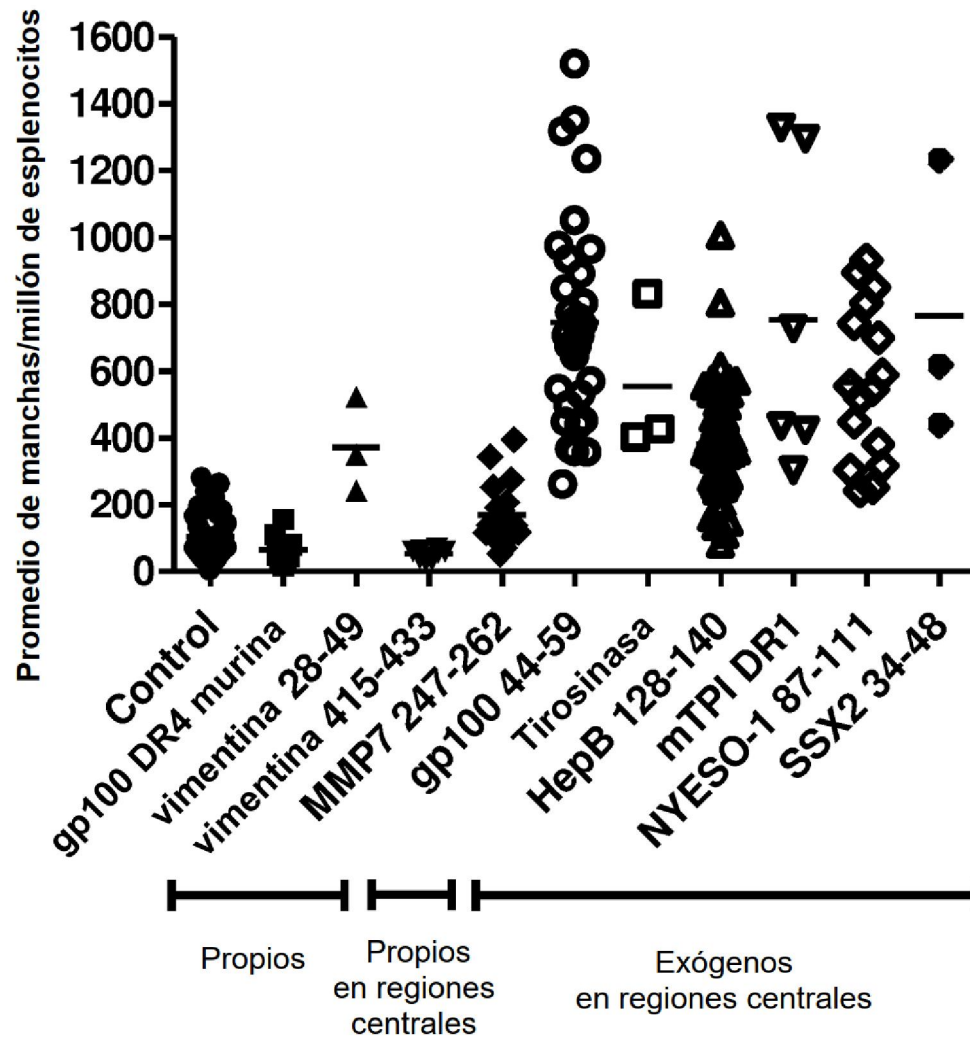
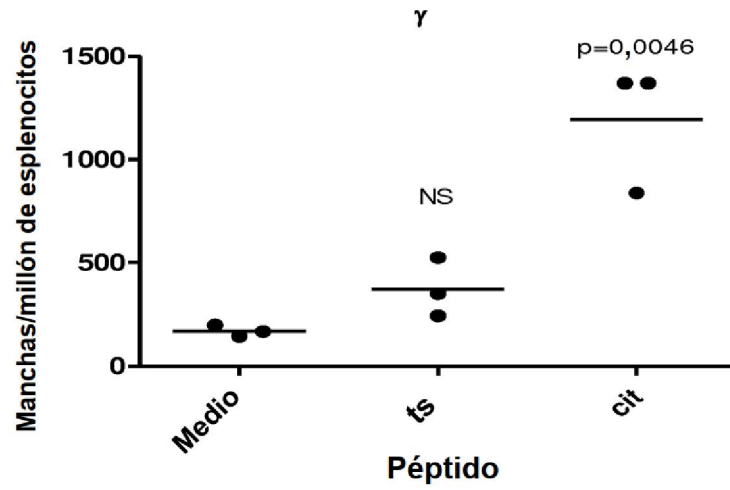
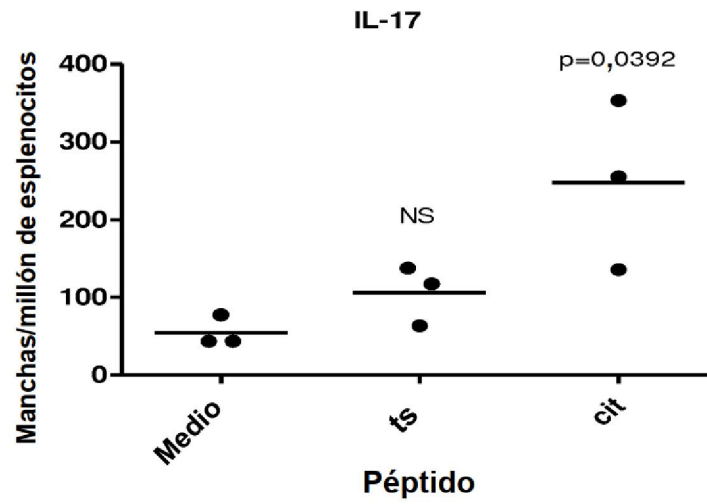


Figura 6

(i)



(ii)



(iii)

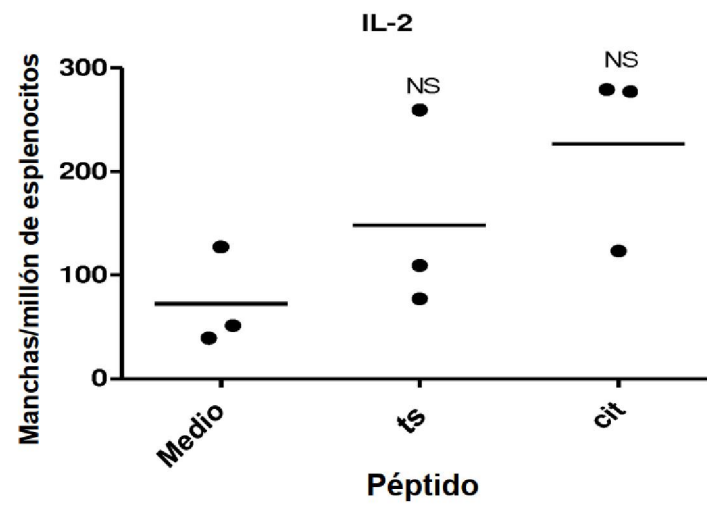
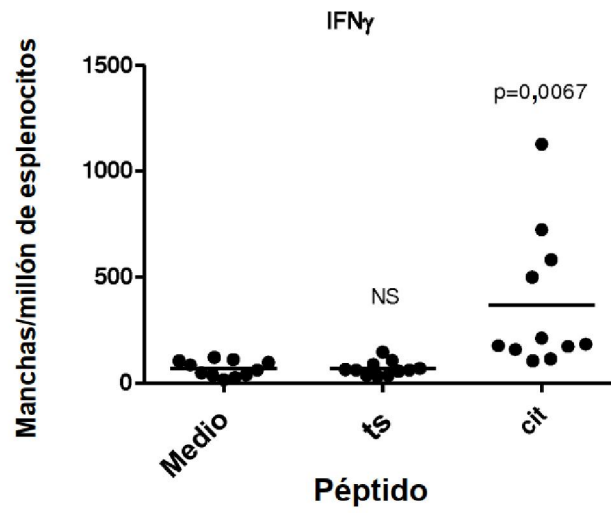
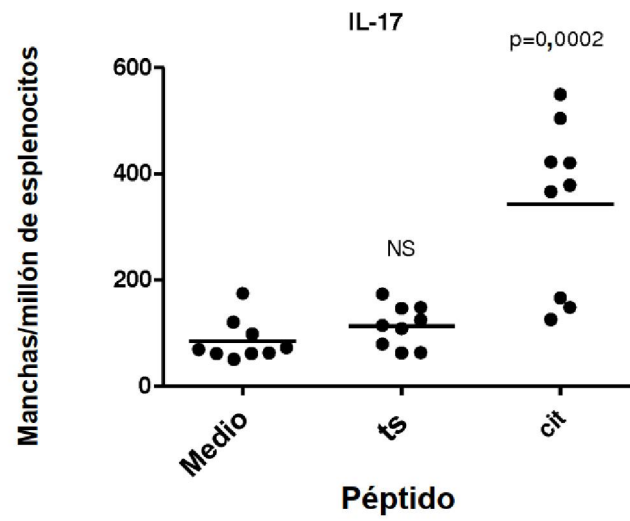


Figura 7

(i)



(ii)



(iii)

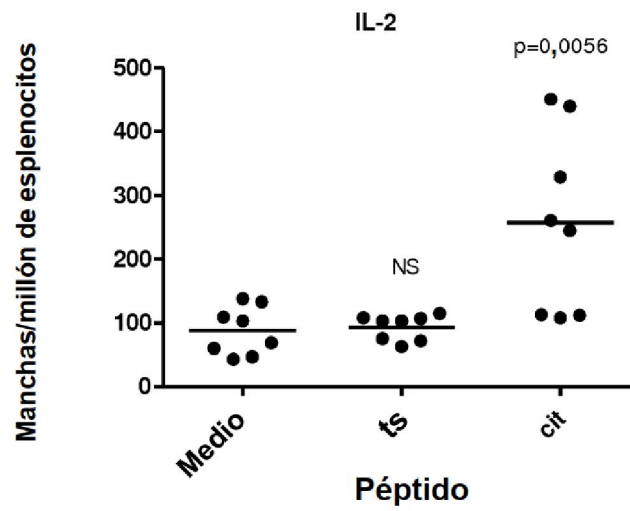


Figura 8

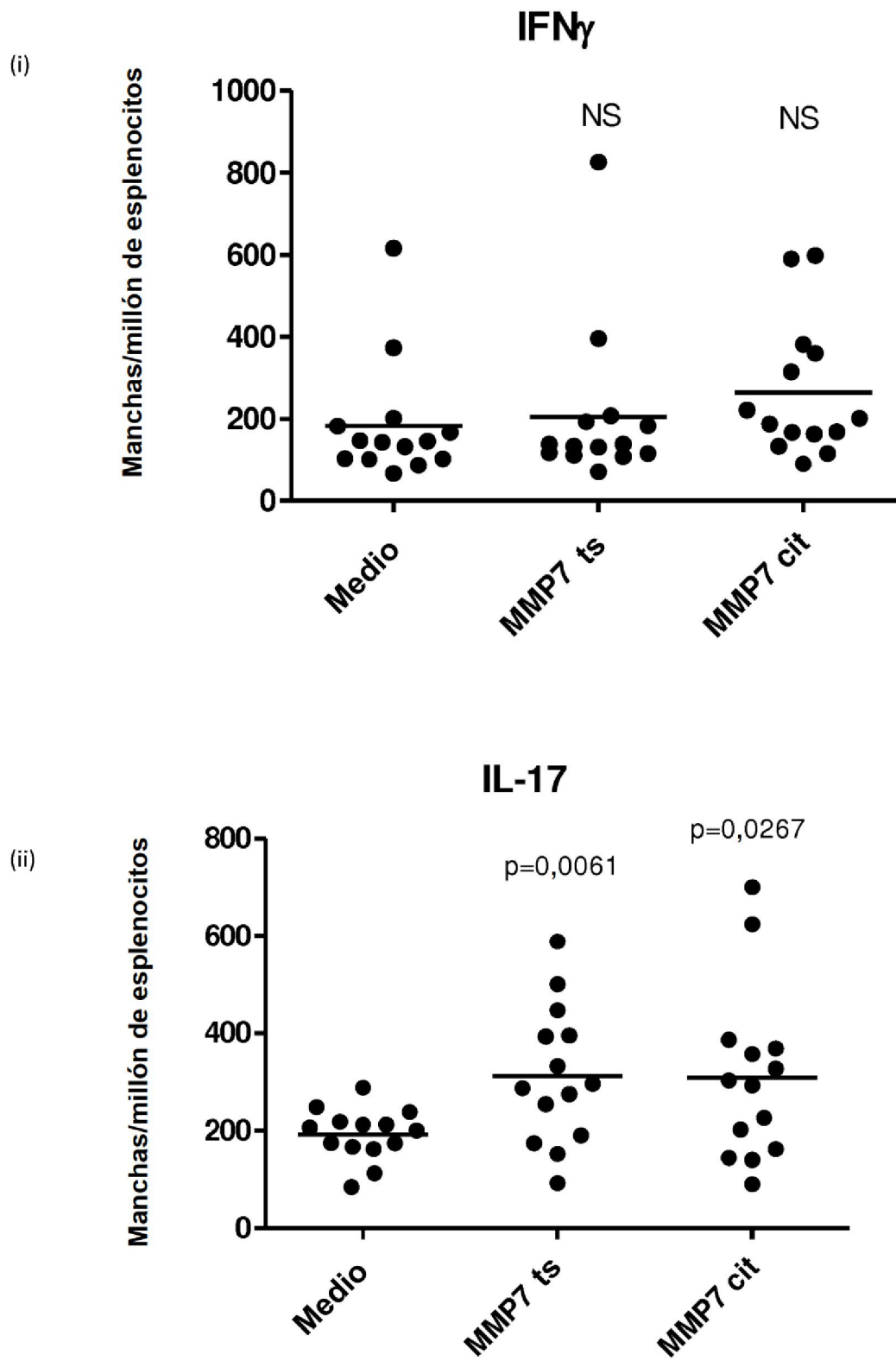
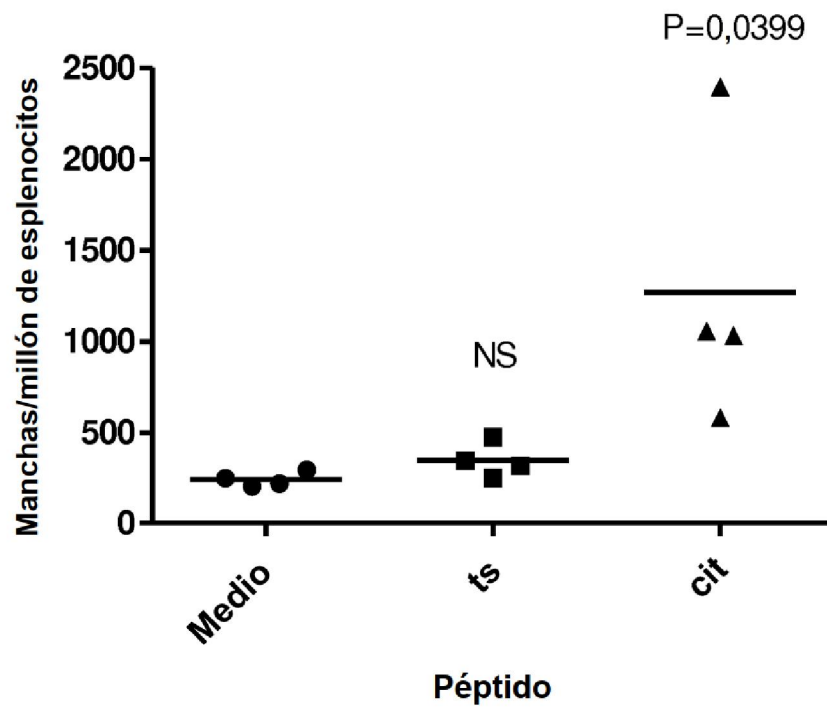


Figura 9

IFN γ

(i)



(ii)

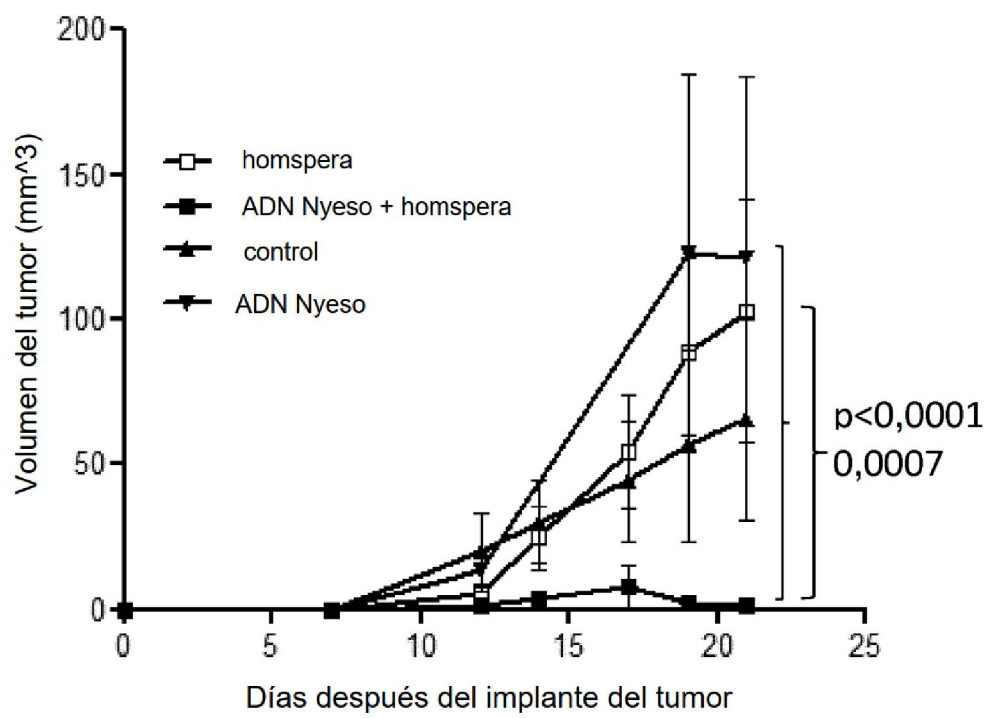


Figura 10

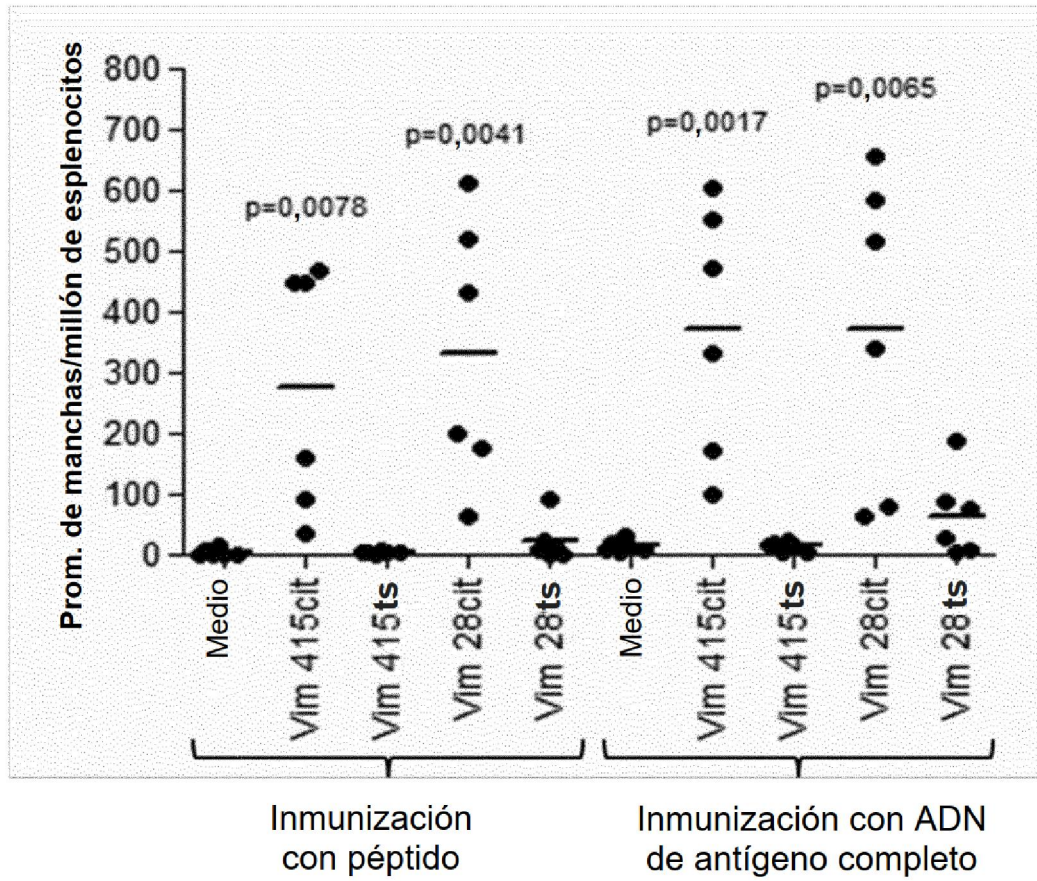


Figura 11

(a)

(ii)

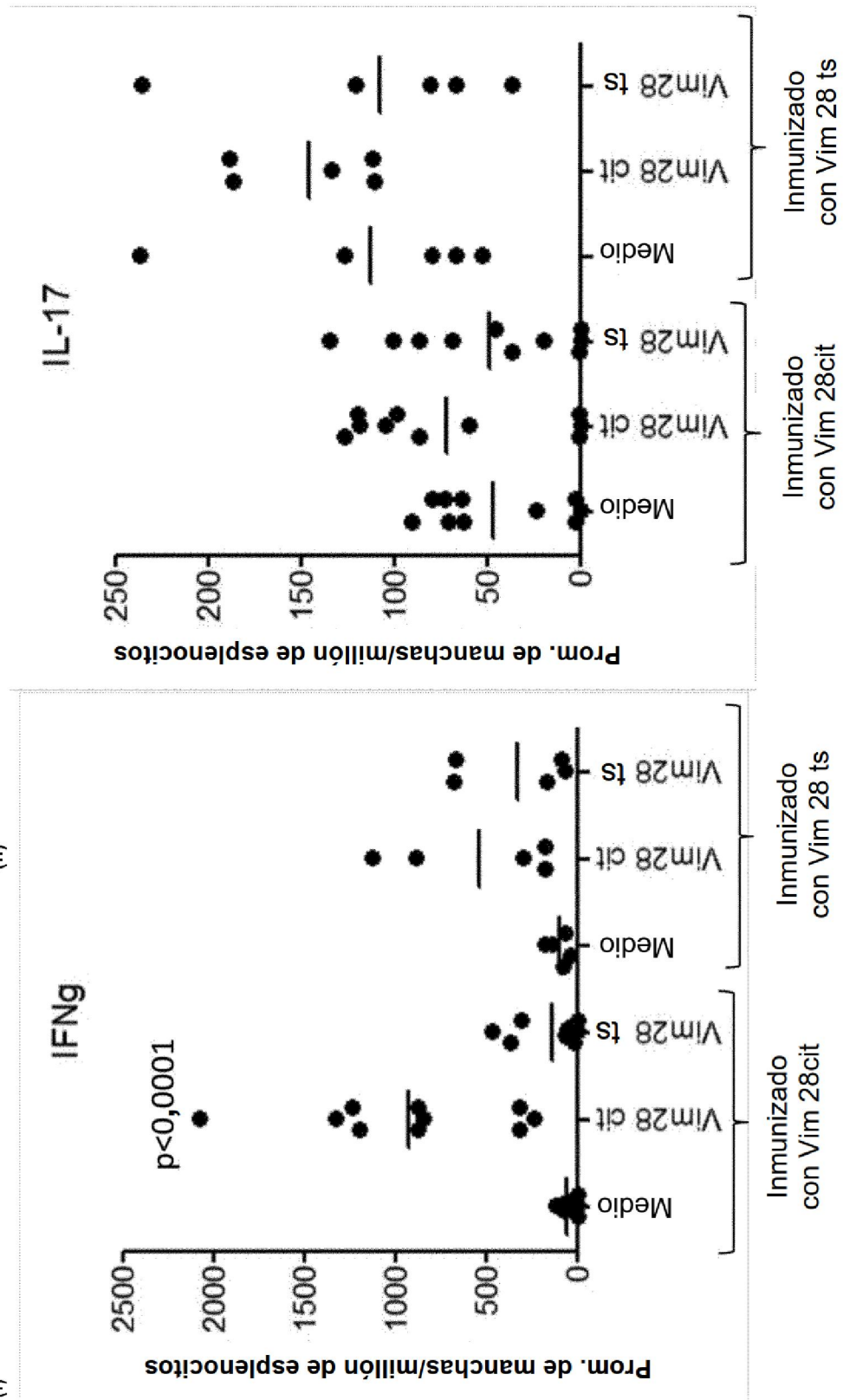


Figura 11 continuación

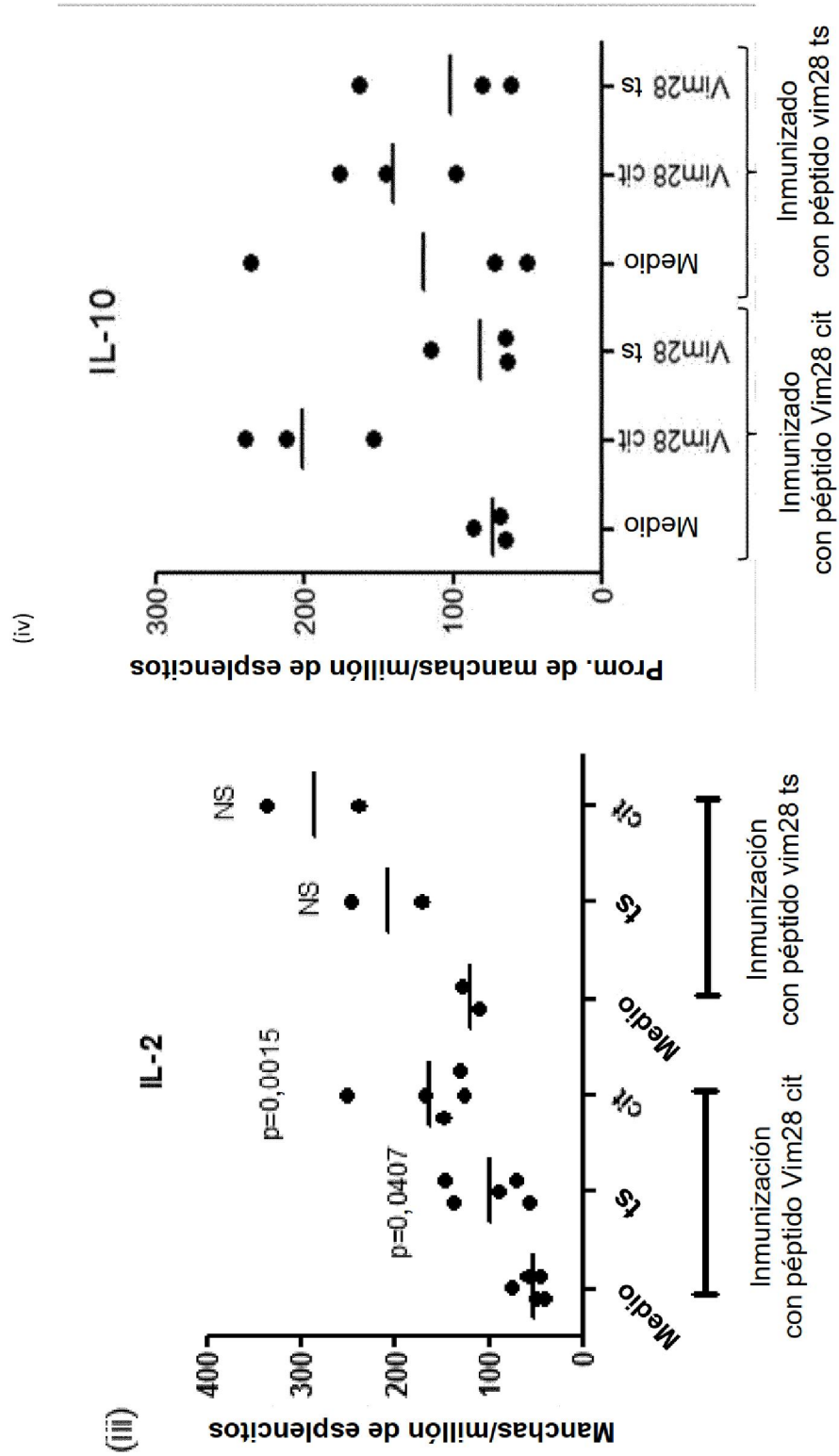


Figura 11 continuación
(b)

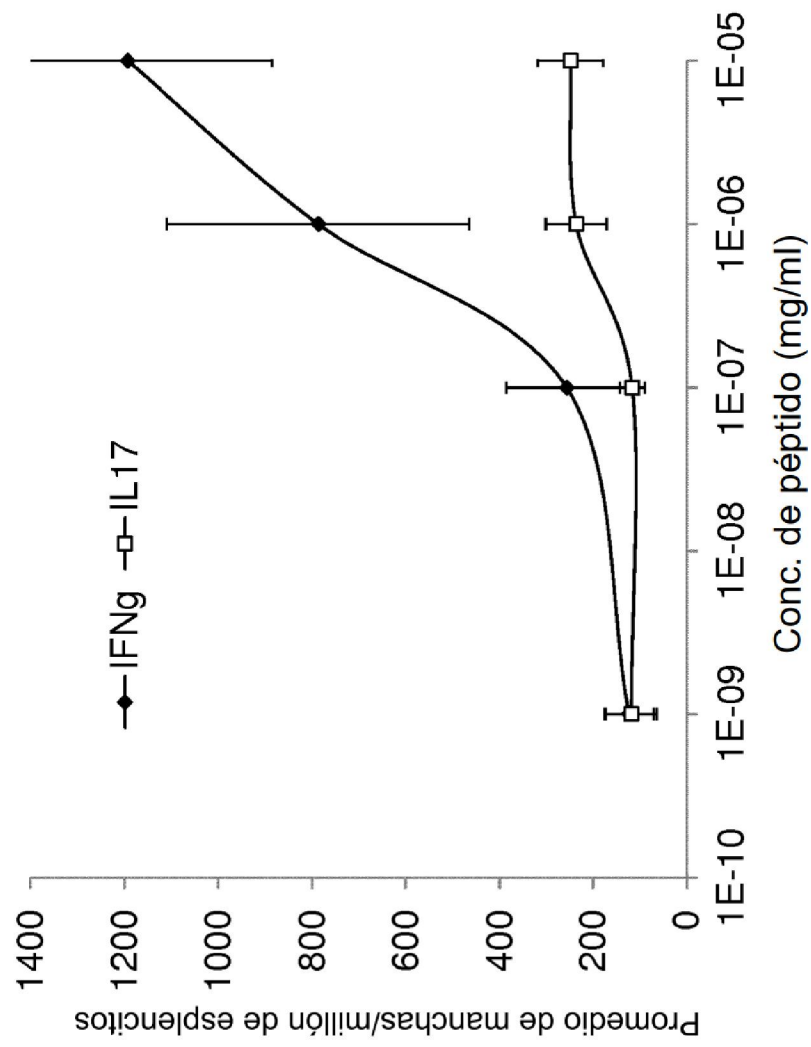


Figura 11 continuación

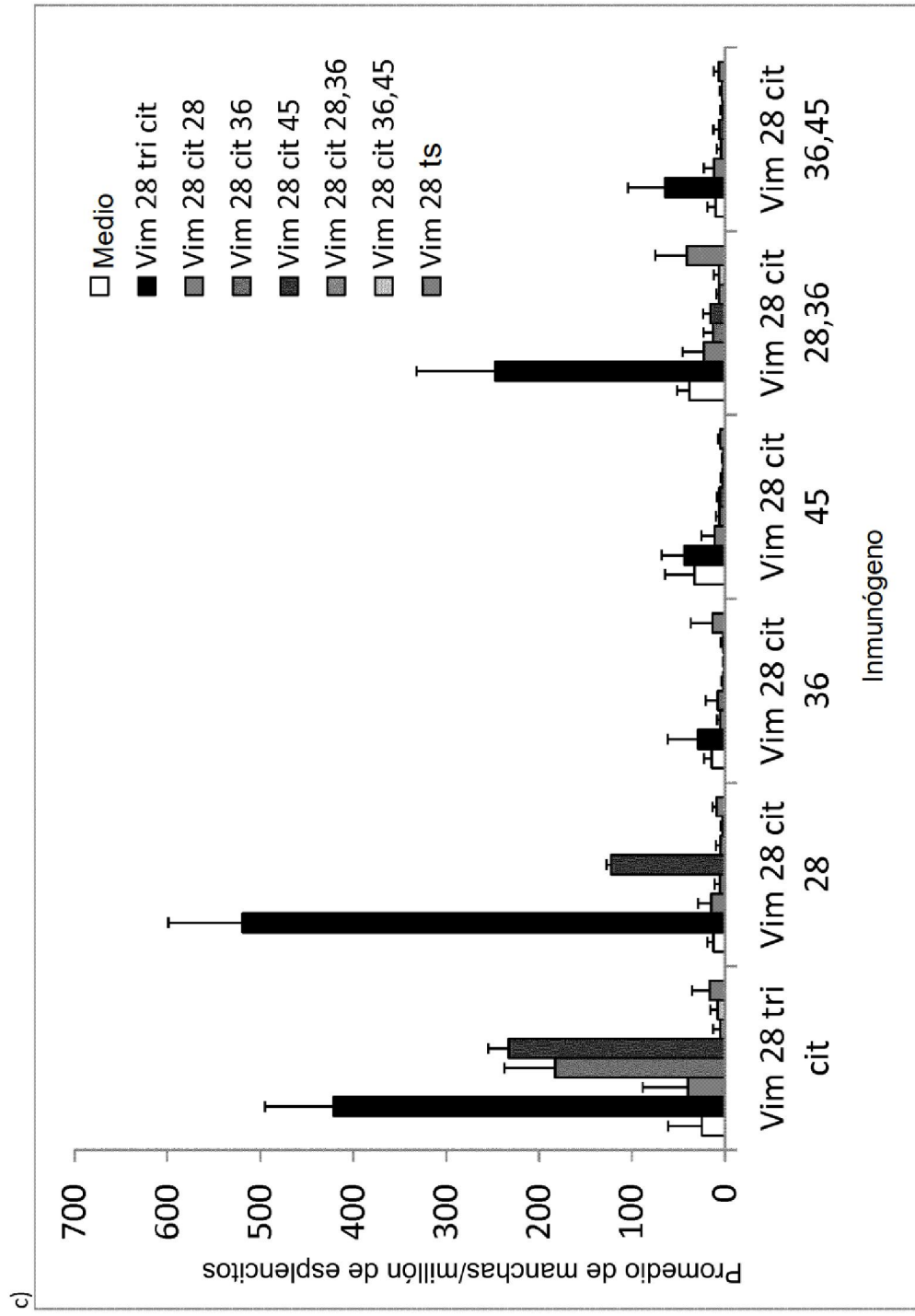


Figura 12

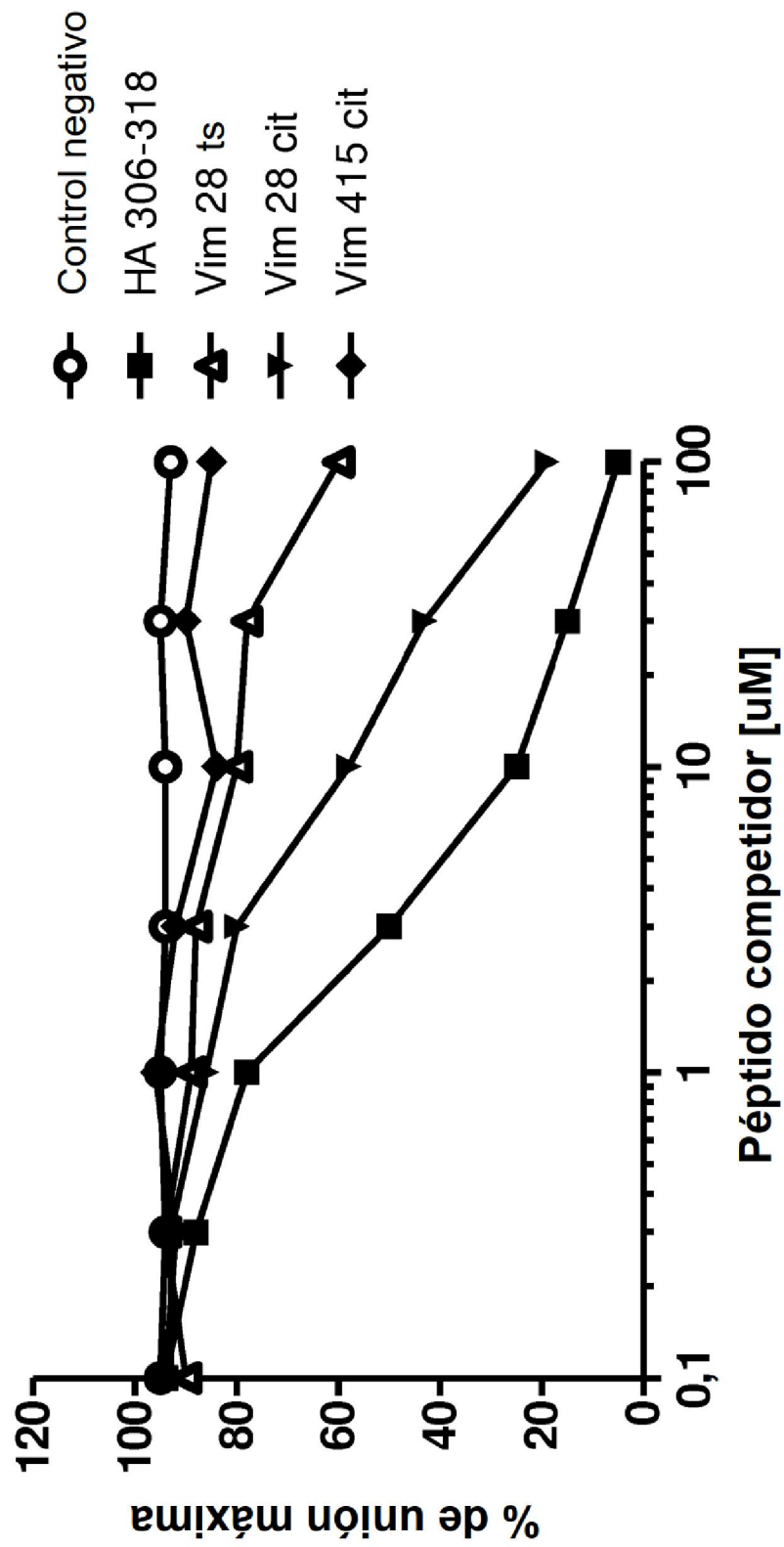


Figura 13

(a)

(i)

(ii)

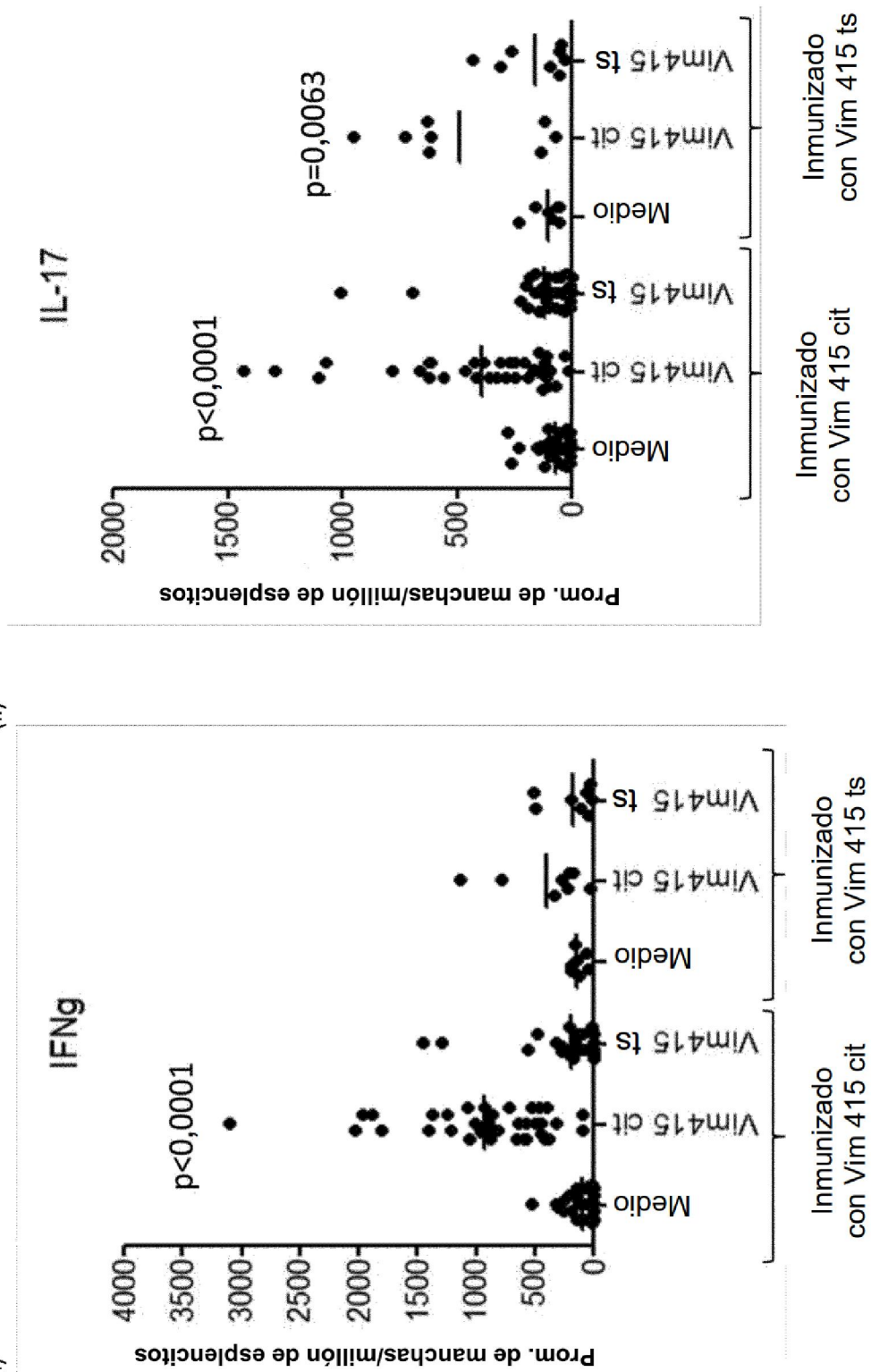


Figura 13 continuación

(iii)

(iv)

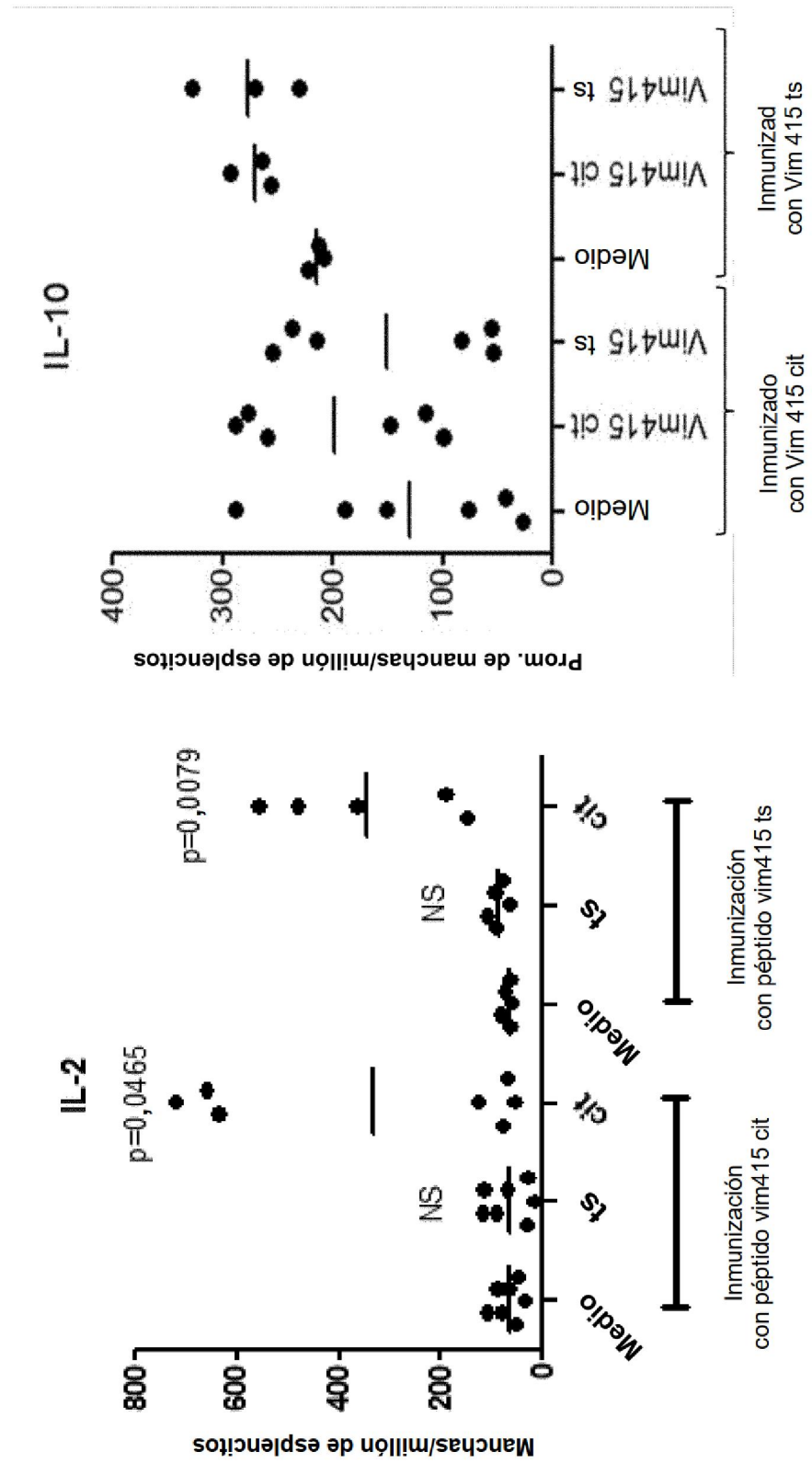


Figura 13 continuación

(b)

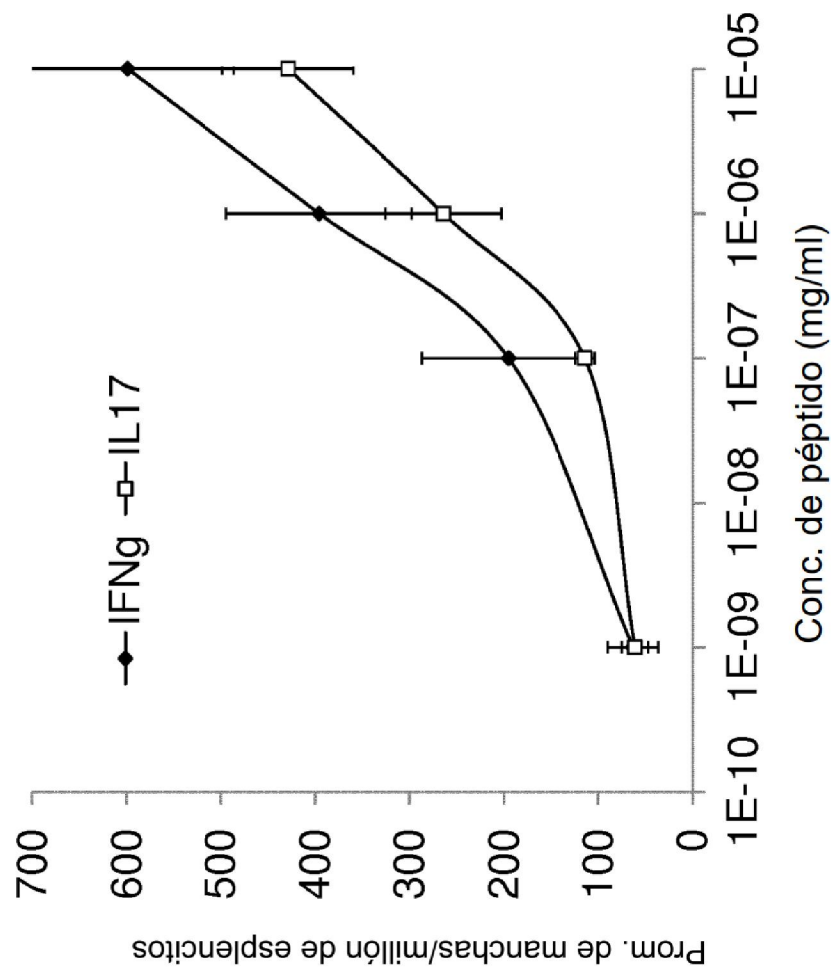
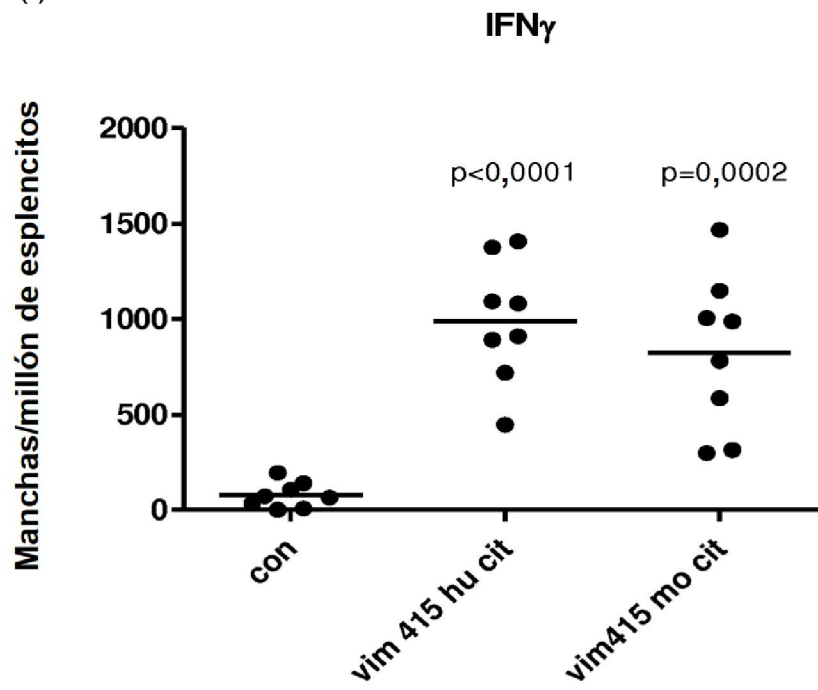


Figura 14

(i)



(ii)

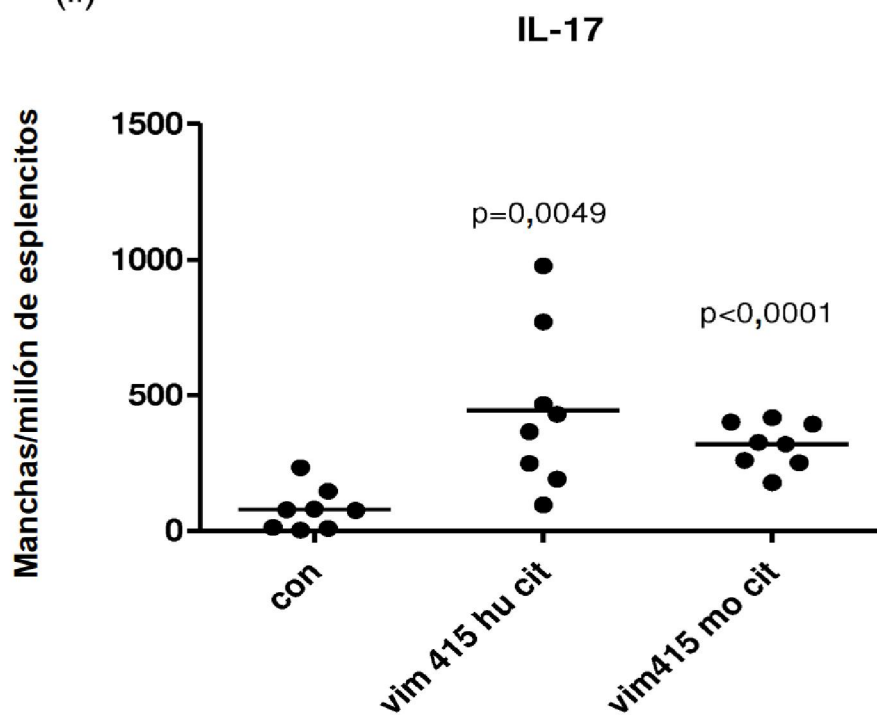
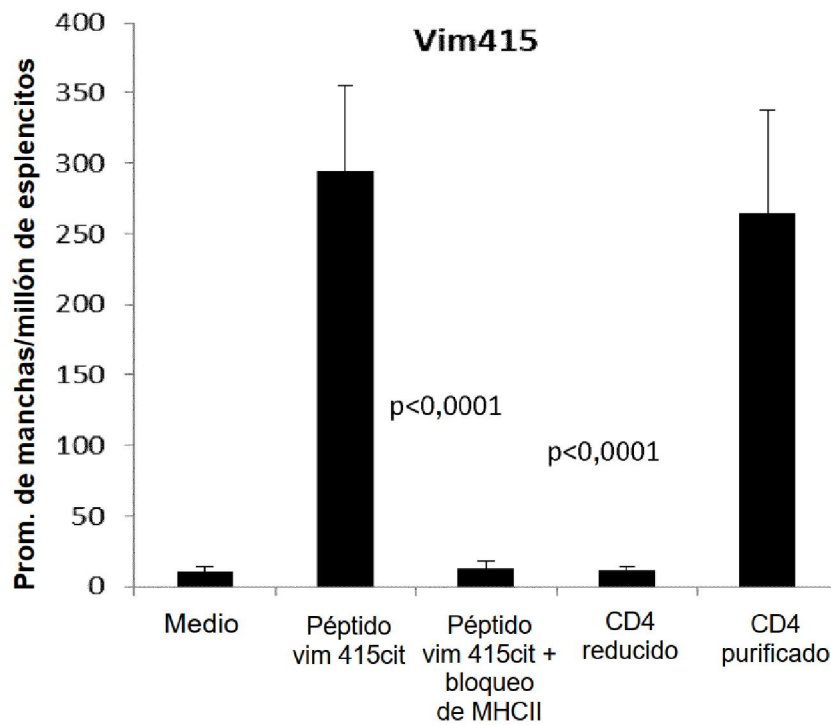


Figura 15

a)



b)

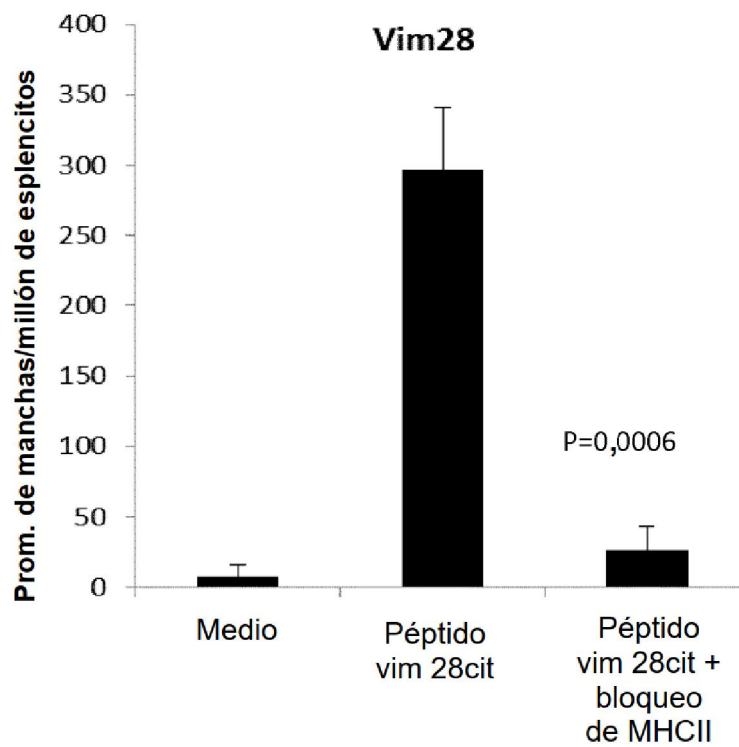
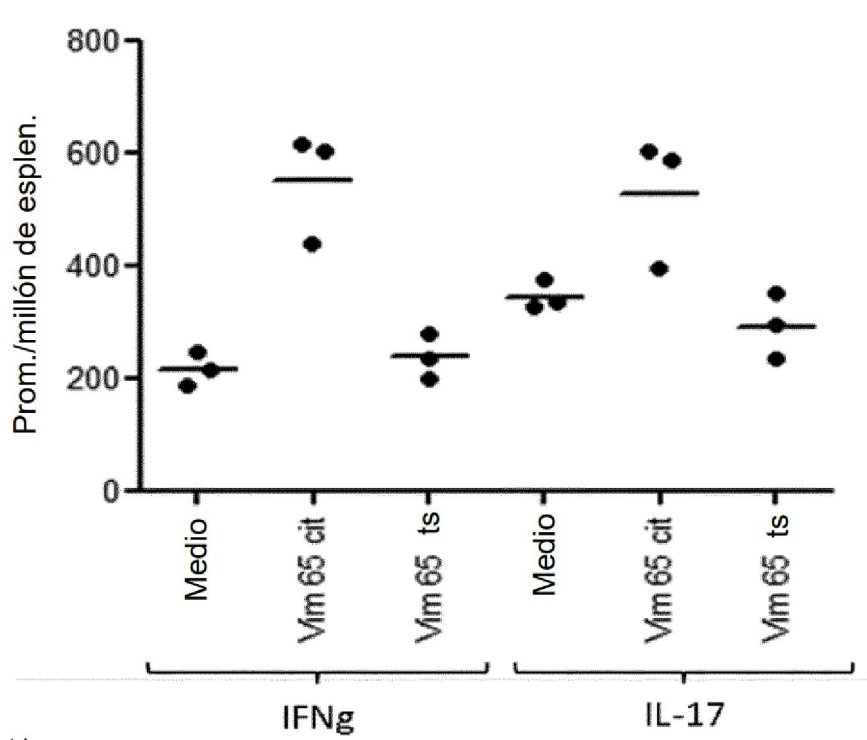


Figura 16

a)



b)

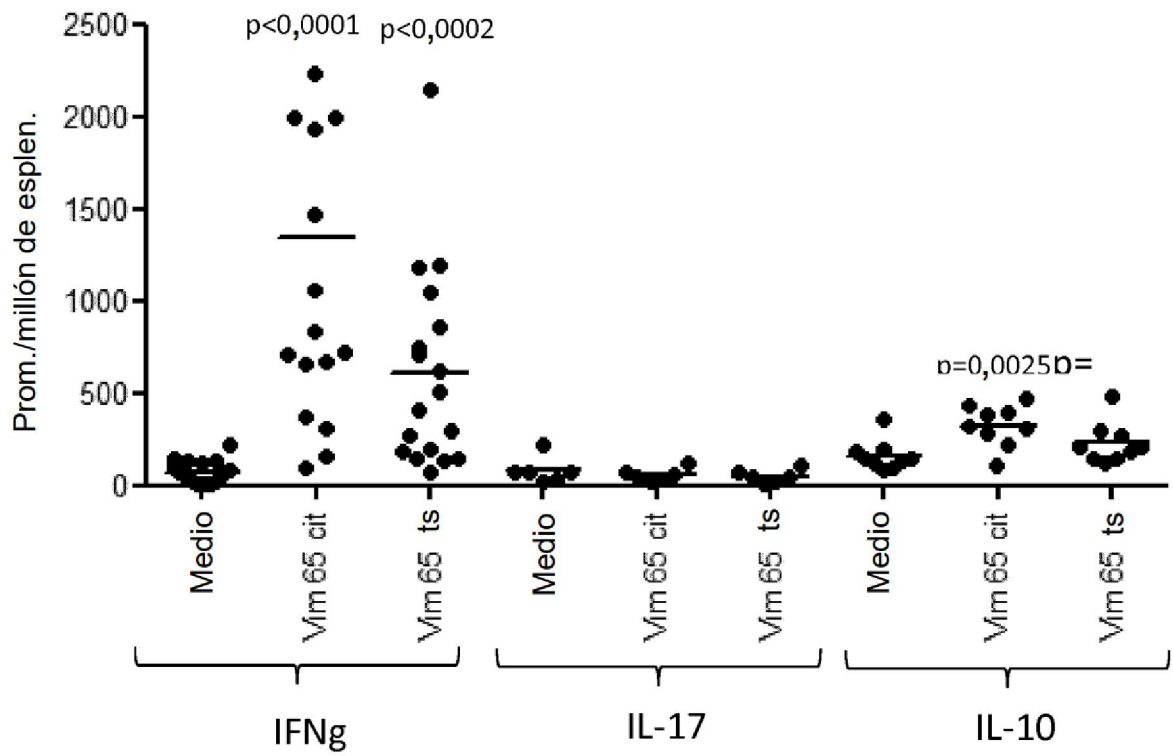


Figura 16 continuación

c)

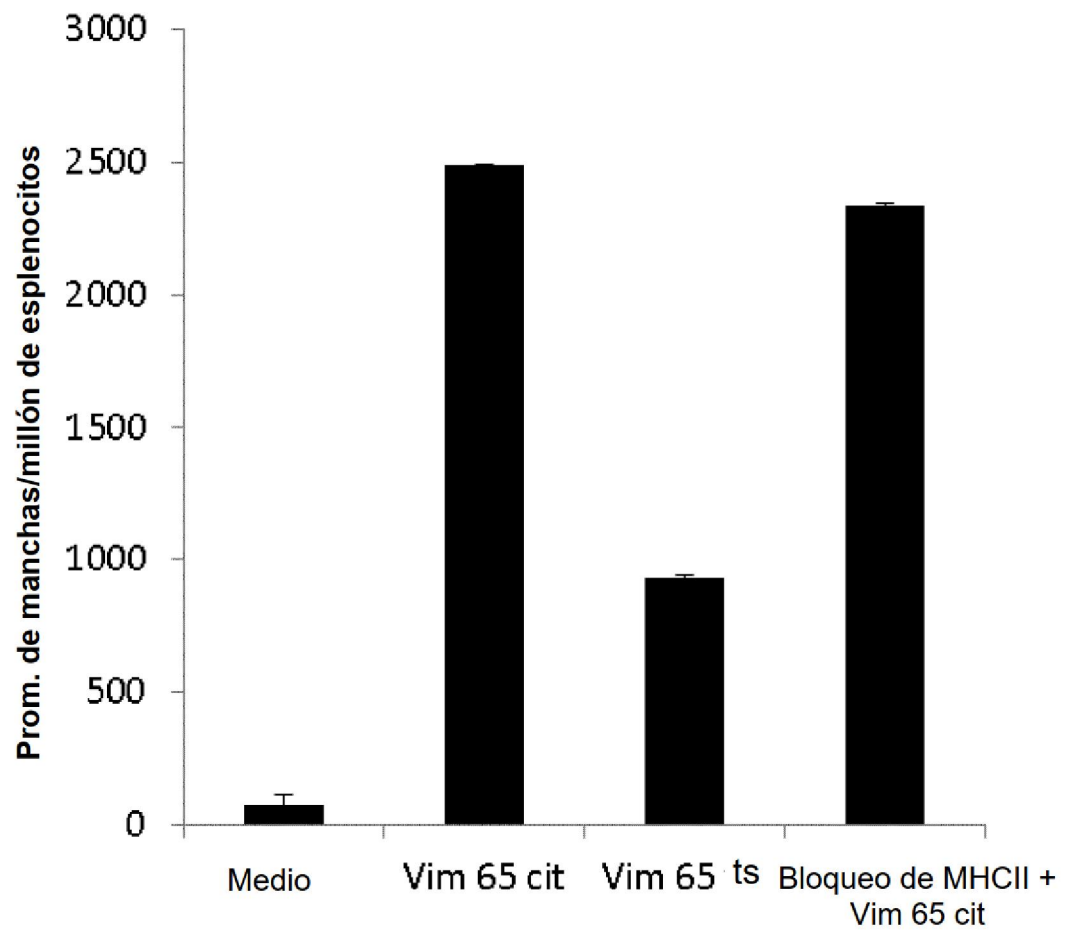


Figura 16 continuación

d)

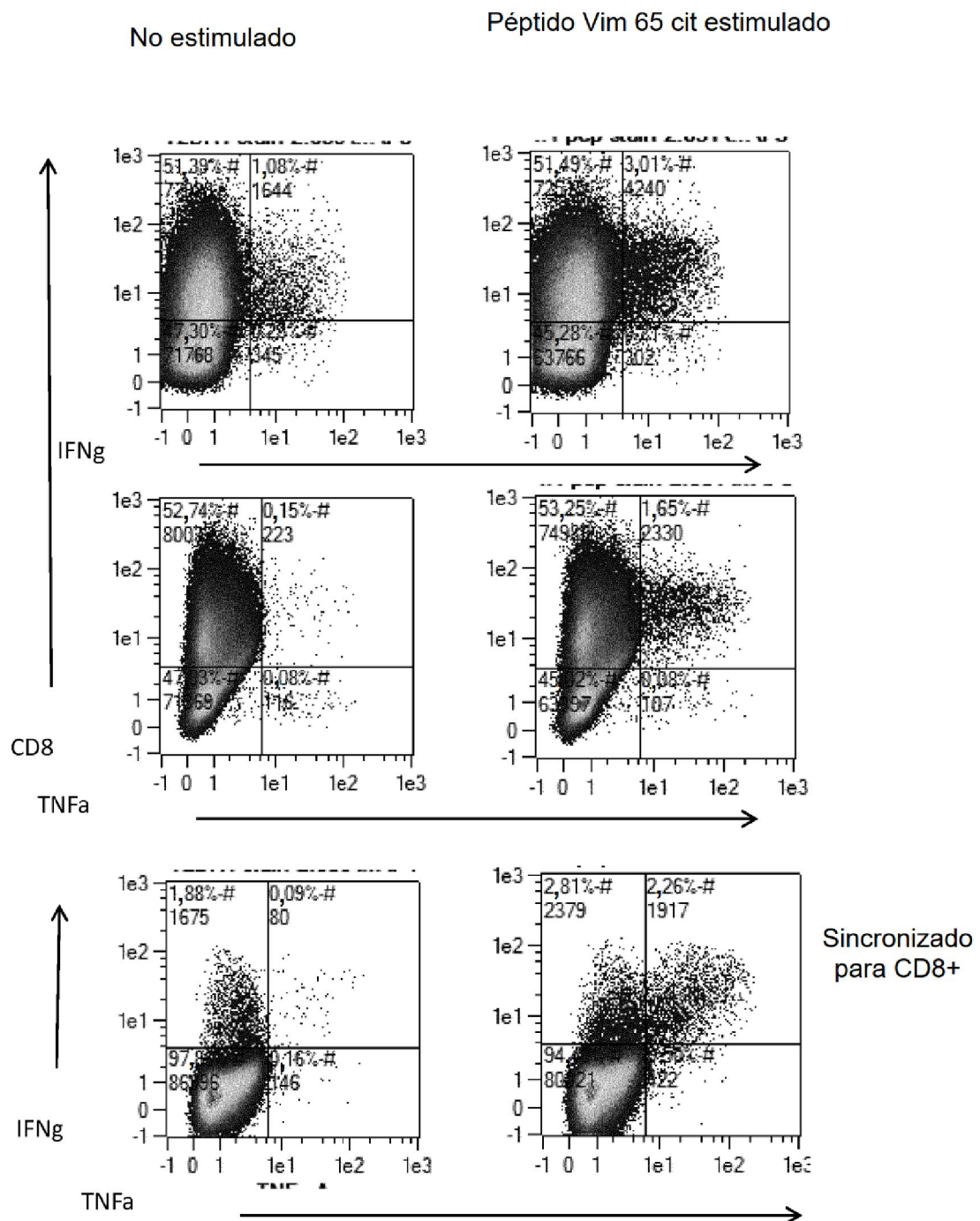
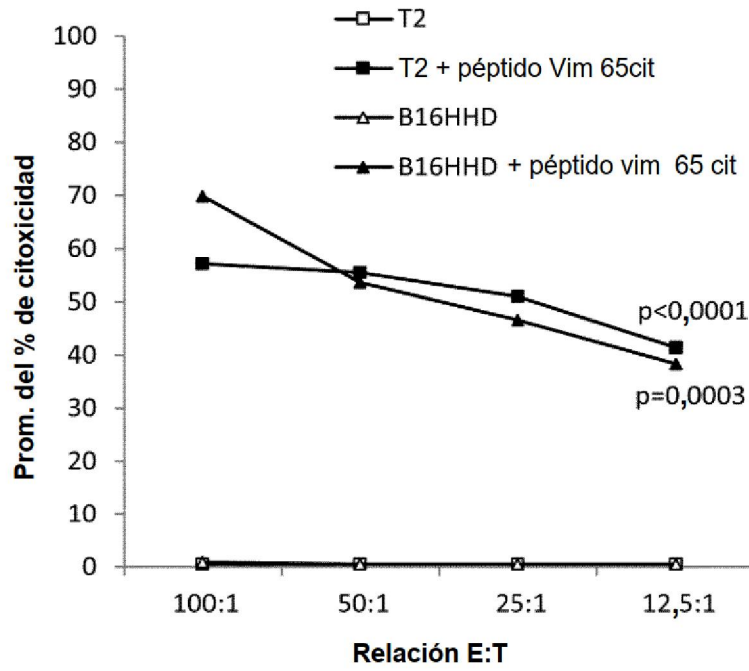


Figura 16 continuación

e)



f)

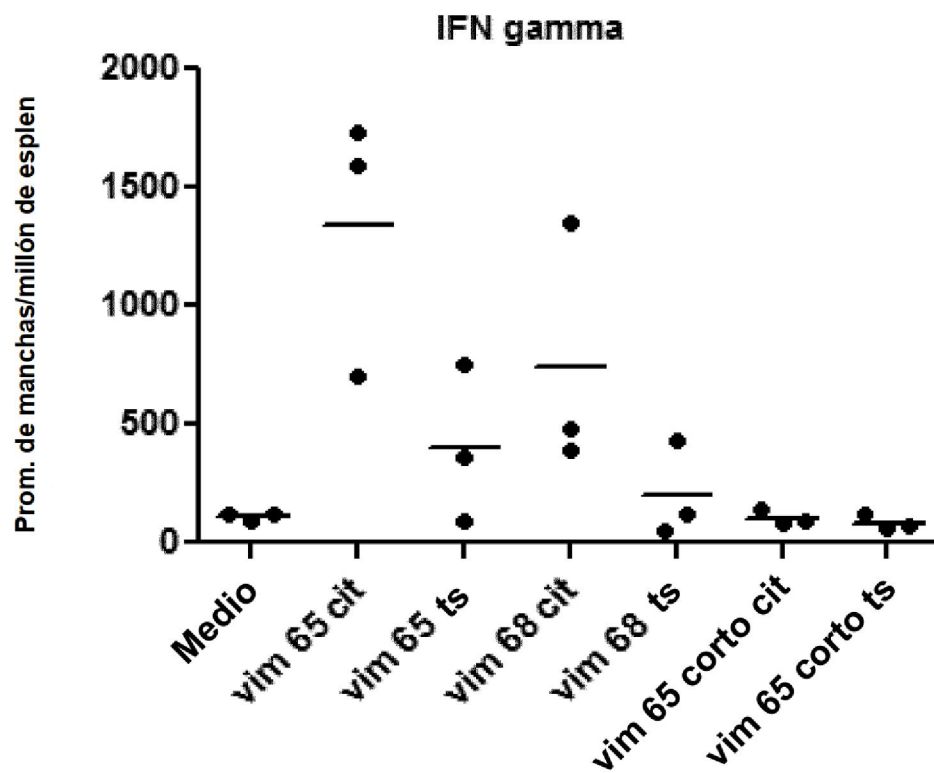


Figura 16 continuación

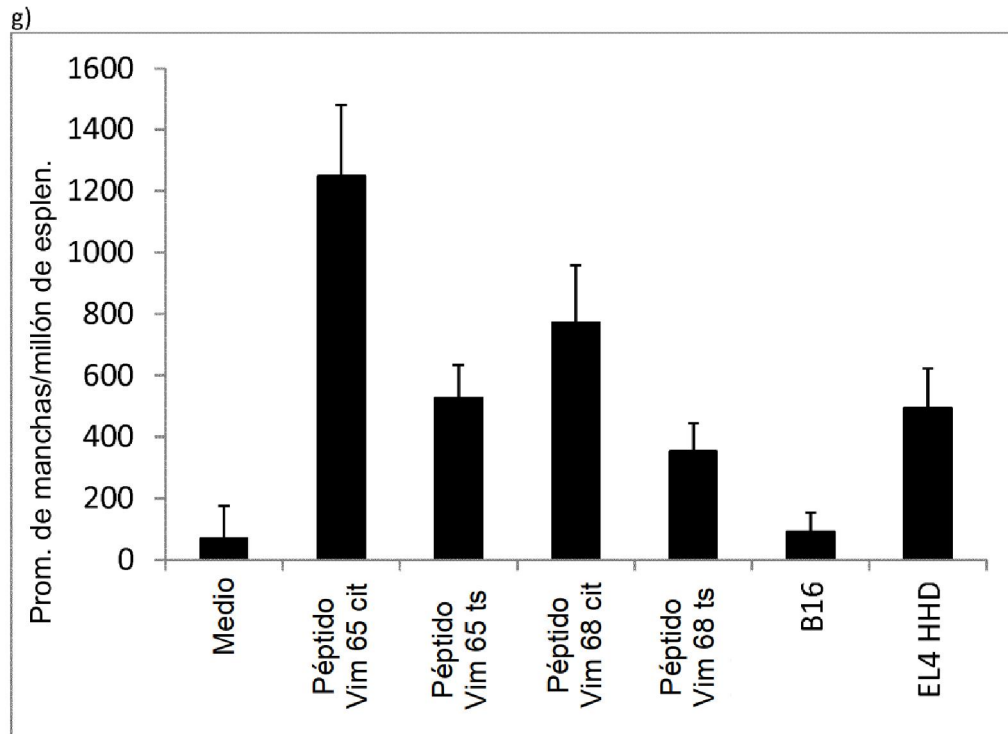


Figura 17

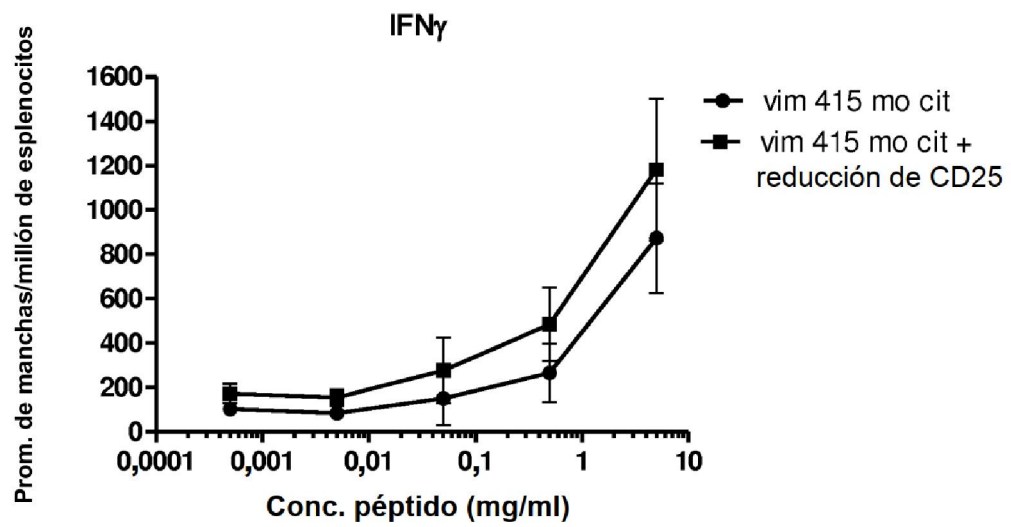


Figura 18

*p<0,05, **p<0,001, ***p<0,0001

(i)

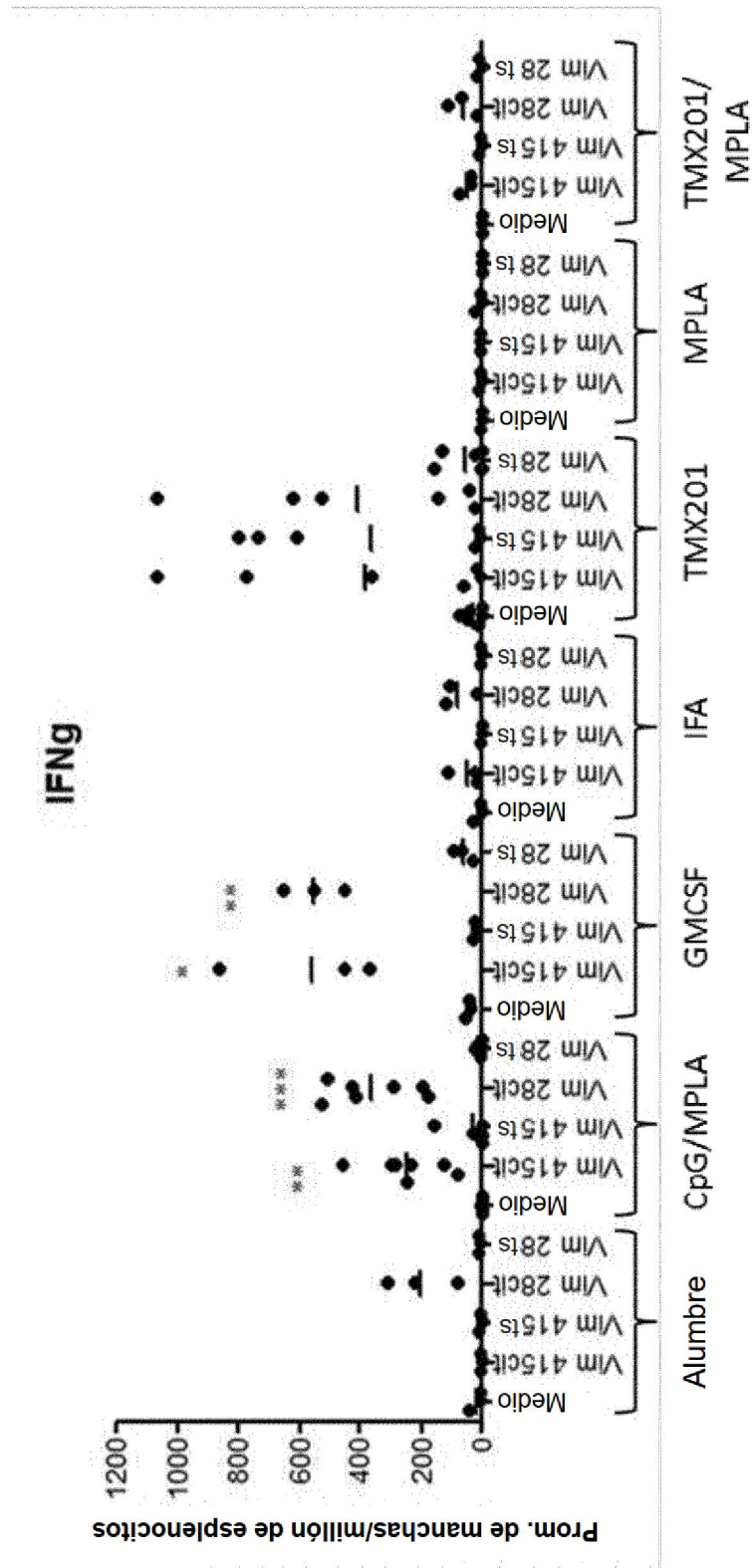
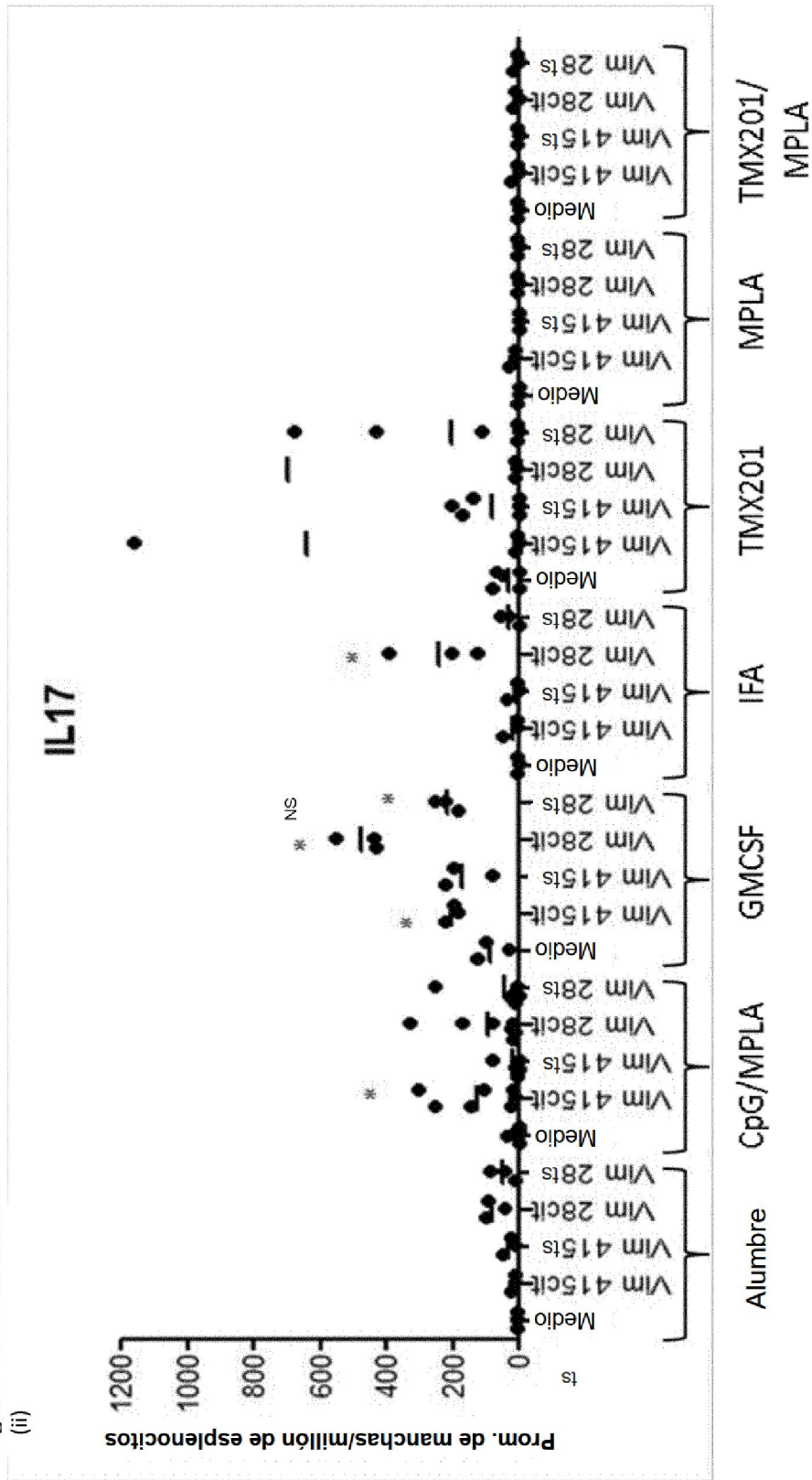


Figura 18 continuación
(ii)



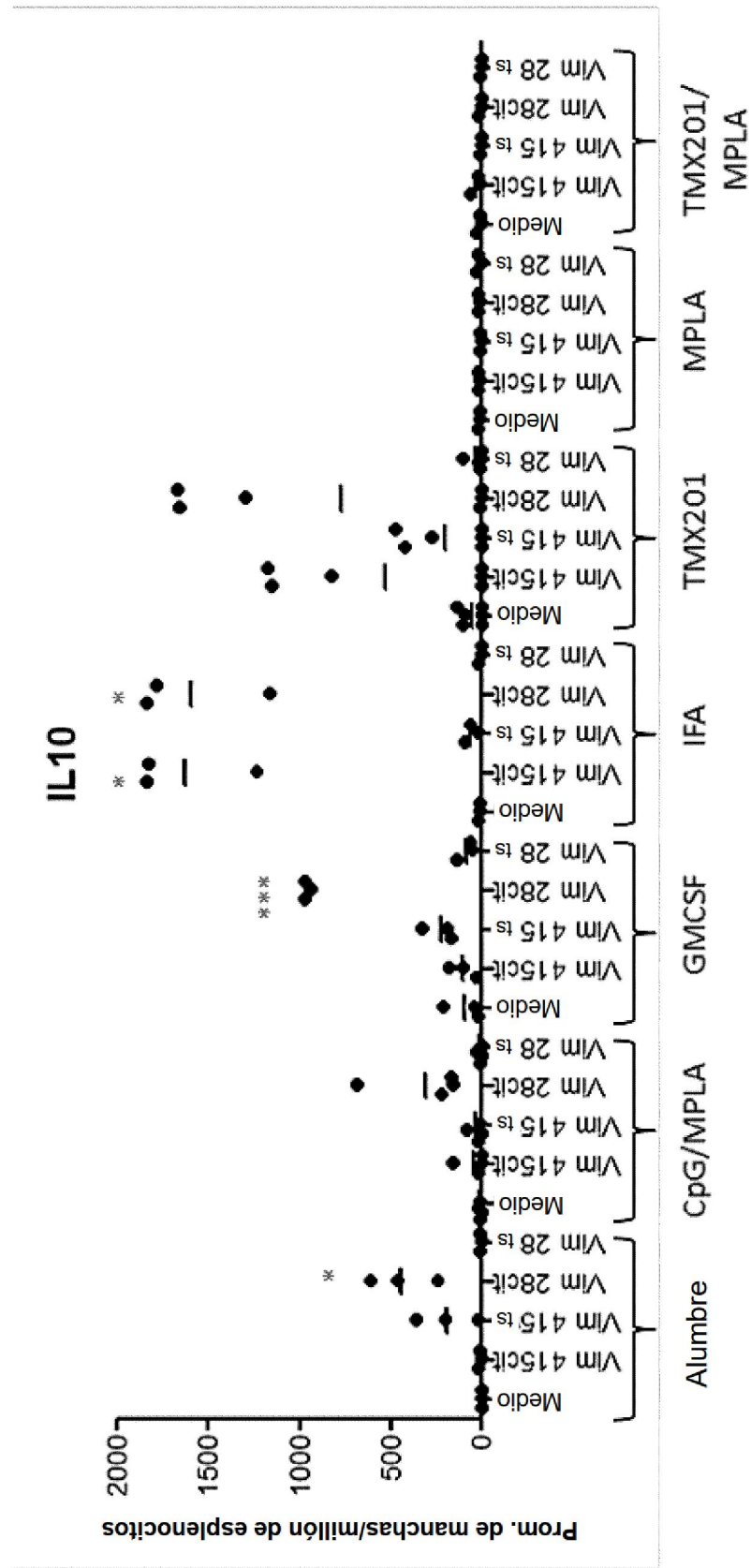
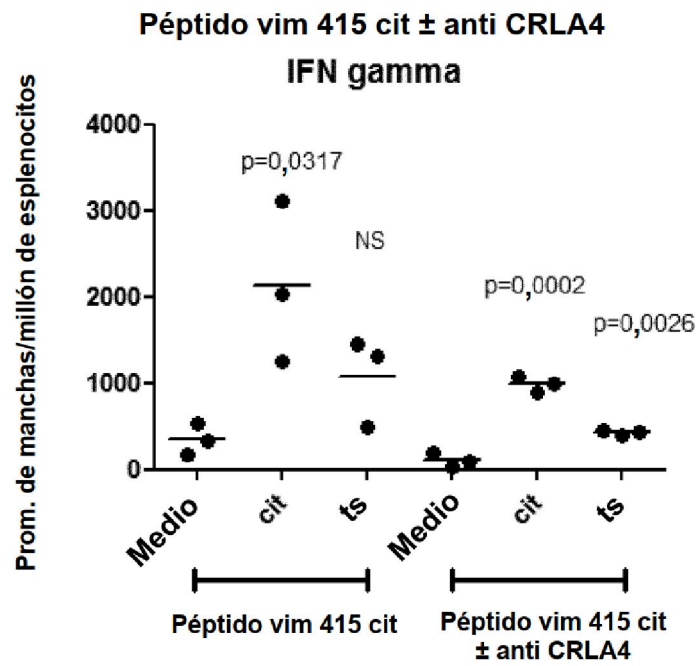


Figura 18 continuación

(iii)

Figura 19

(i)



(ii)

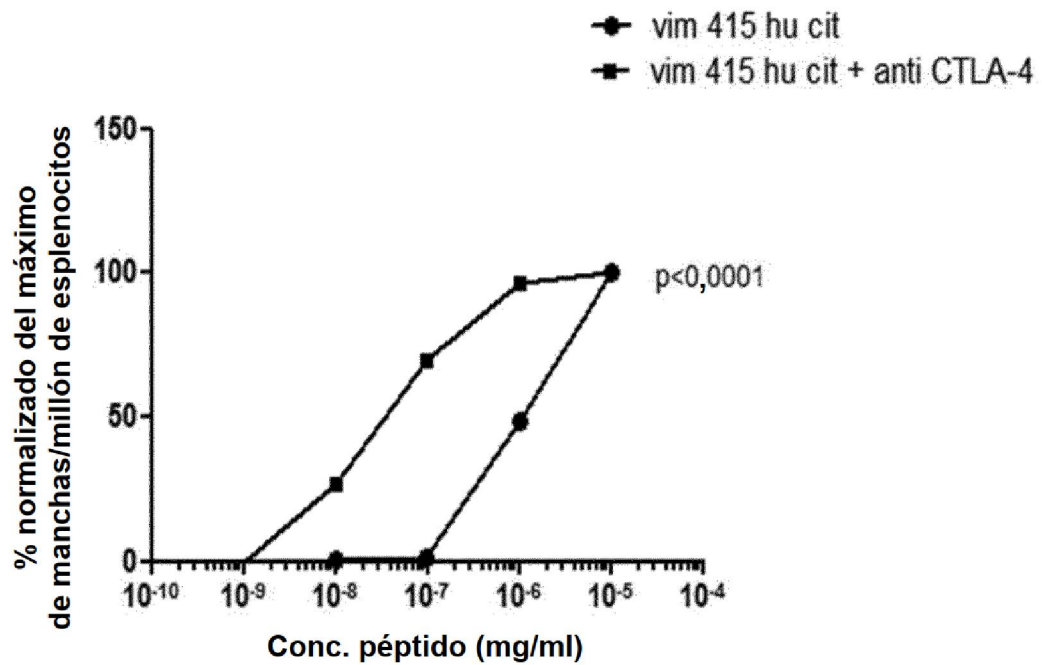


Figura 20

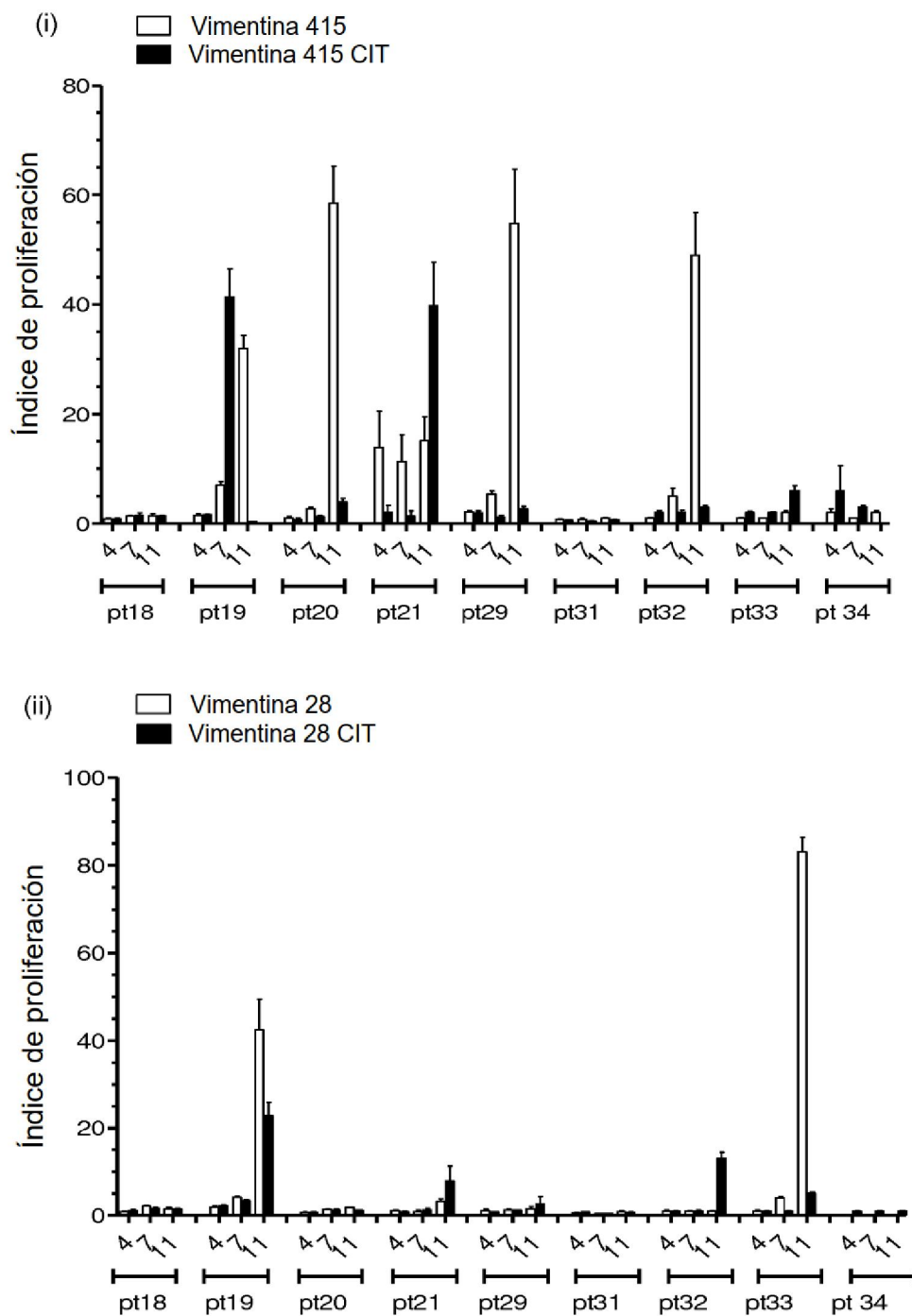


Figura 20 continuación

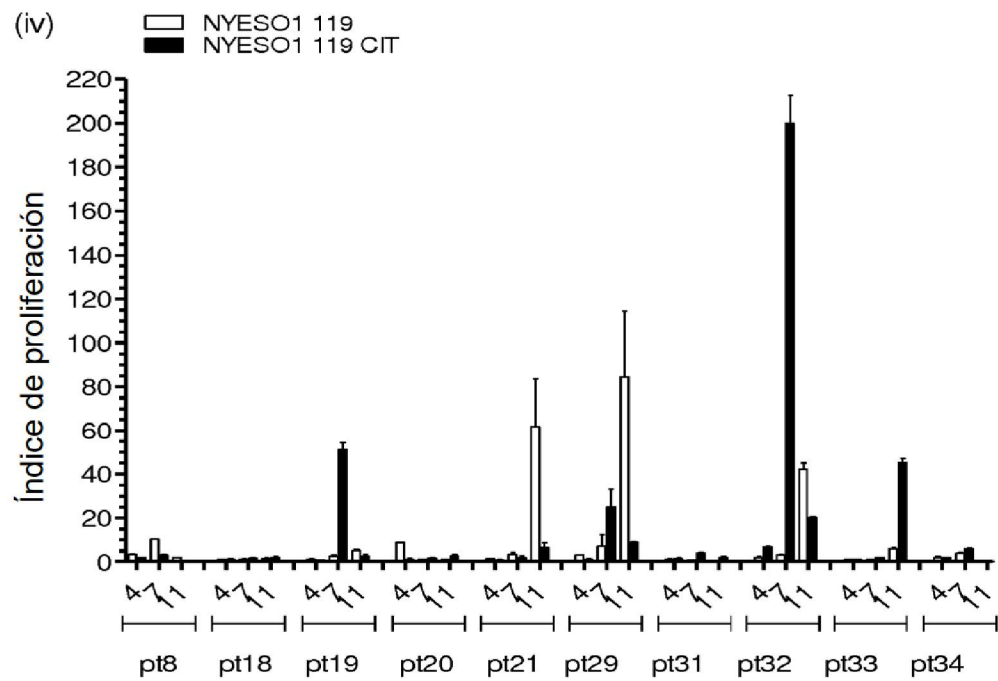
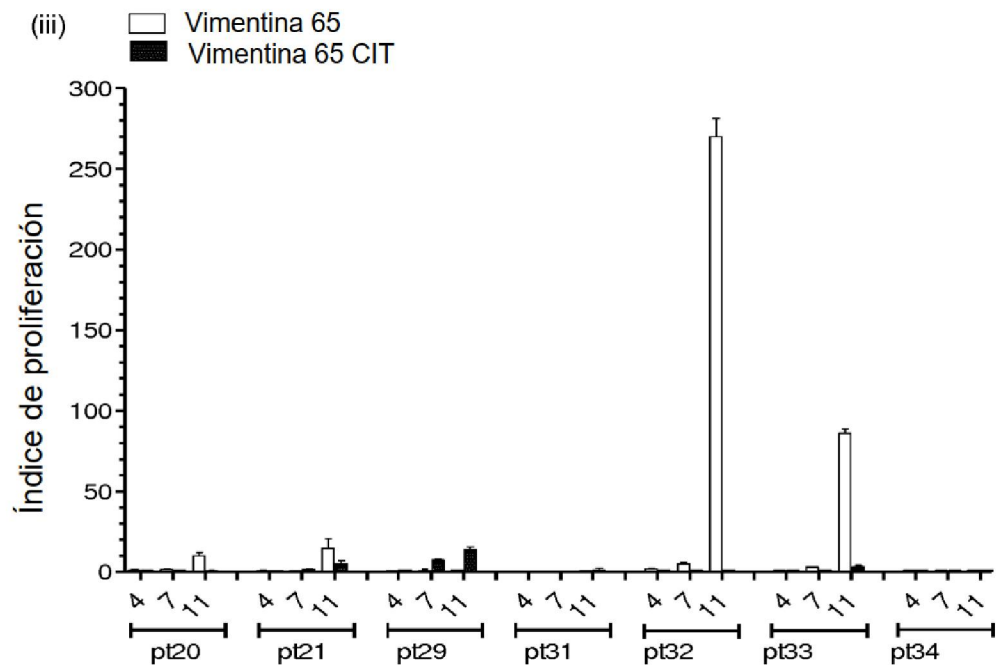
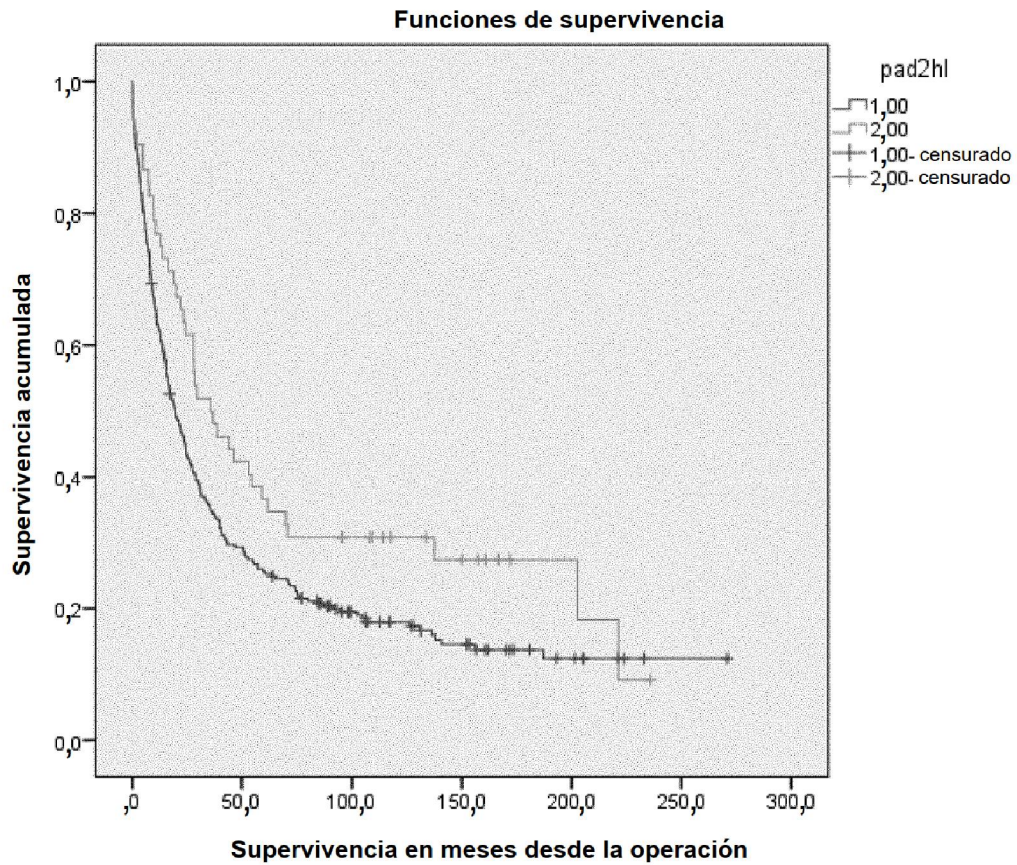


Figura 21 Supervivencia de Kaplan Meier de pacientes cuyos tumores expresan PAD o HMGB1

a) Tumores de ovario que expresan PAPD2



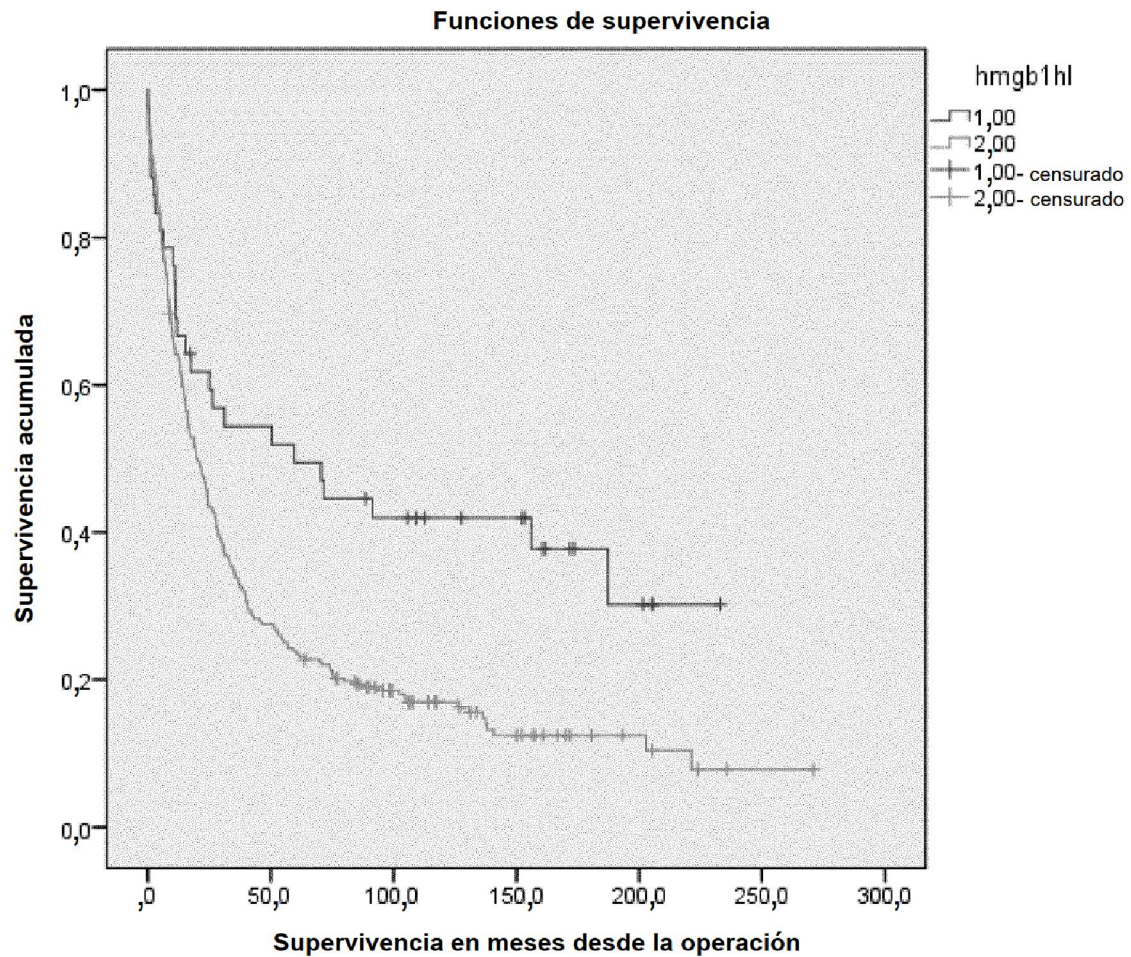
Comparaciones globales

	χ^2	df	Sig.
Orden logarítmico (Mantel-Cox)	4,570	1	0,033

Ensayo de equidad de las distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de pad2hl

Figura 21 continuación

b) Tumores de ovario que expresan HMGB1



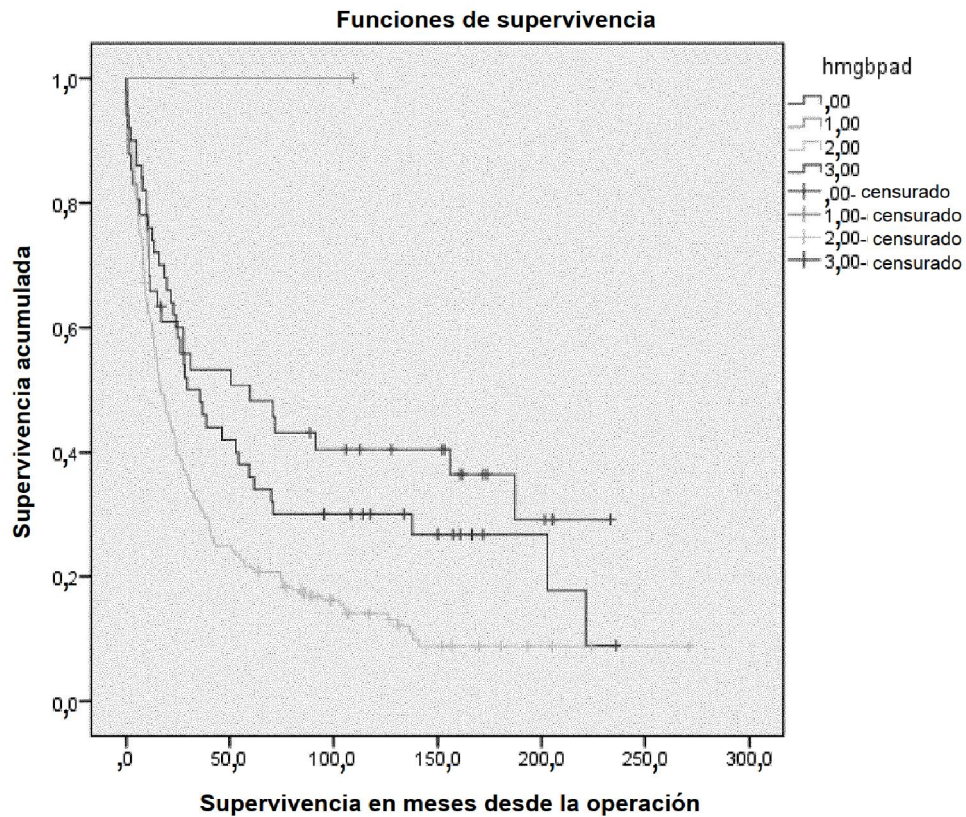
Comparaciones globales

	χ^2	df	Sig.
Orden logarítmico (Mantel-Cox)	9,642	1	0,002

Ensayo de equidad de las distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de hmgb1hl

Figura 21 continuación

c) Tumores de ovario que expresan PAD2 y HMGB1 (0 indica ausencia de expresión, 1 únicamente HMGB1, 2 únicamente PAD2 y 3 ambos)



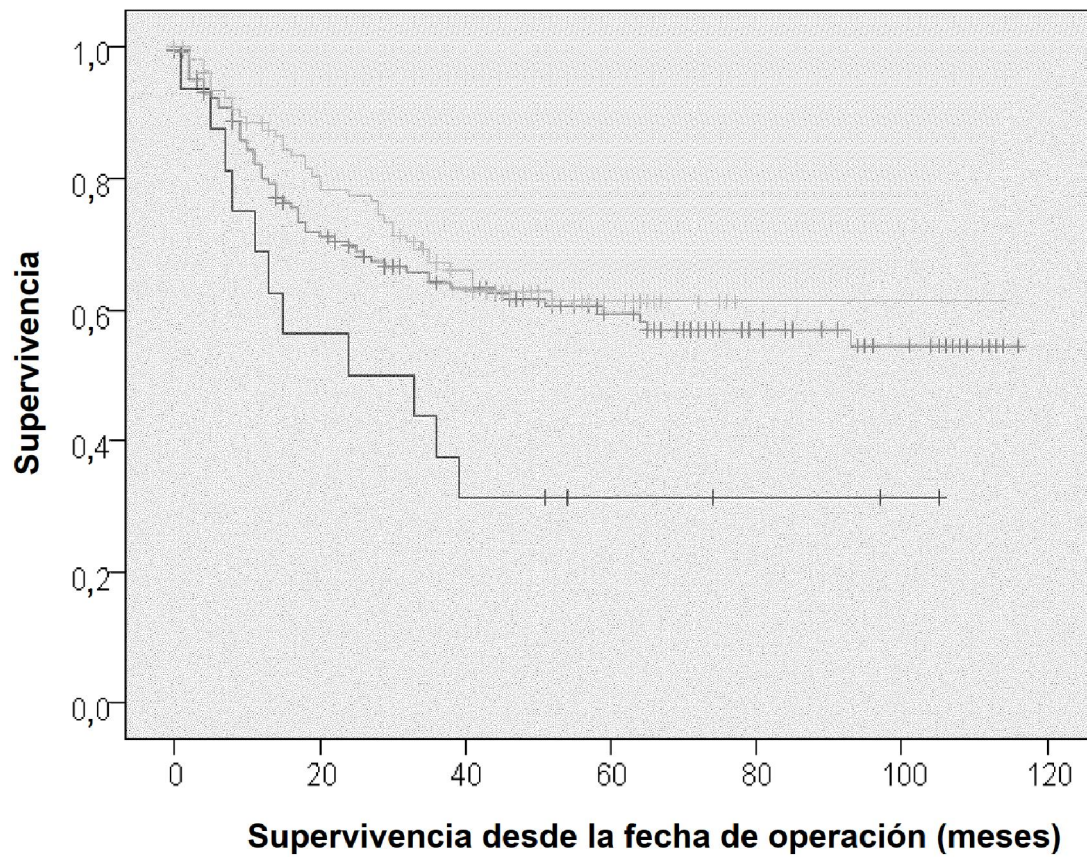
Comparaciones globales

	χ^2	df	Sig.
Orden logarítmico (Mantel-Cox)	17,217	3	0,001

Ensayo de equidad de las distribuciones de supervivencia para los diferentes niveles de hmgbpad

Figura 21 continuación

d) Pacientes con cáncer colorrectal que expresan PAD4



	χ^2	df	Sig.
Orden logarítmico (Mantel-Cox)	6,871	2	0,032

Figura 22

(a)

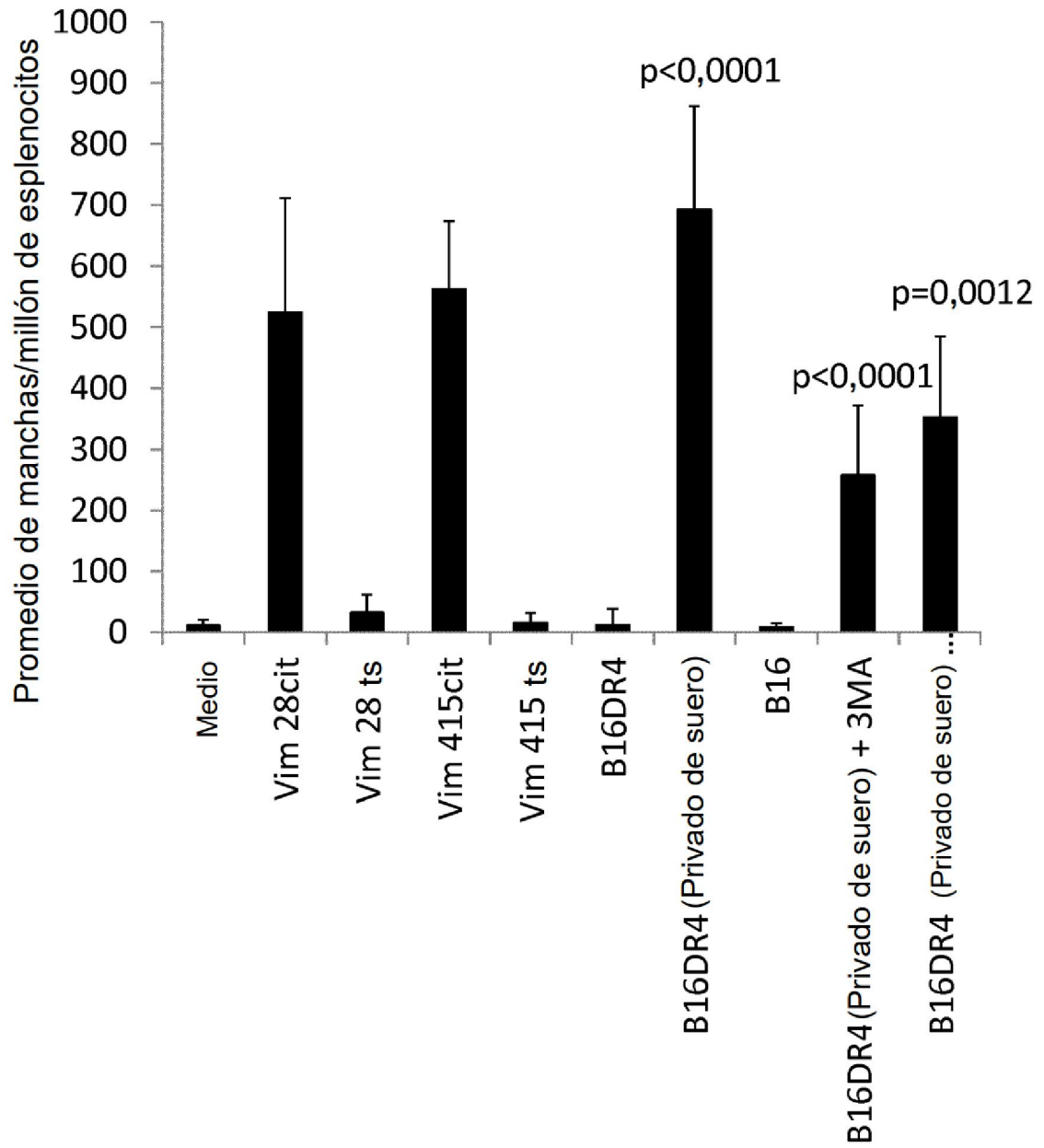


Figura 22 continuación (b)

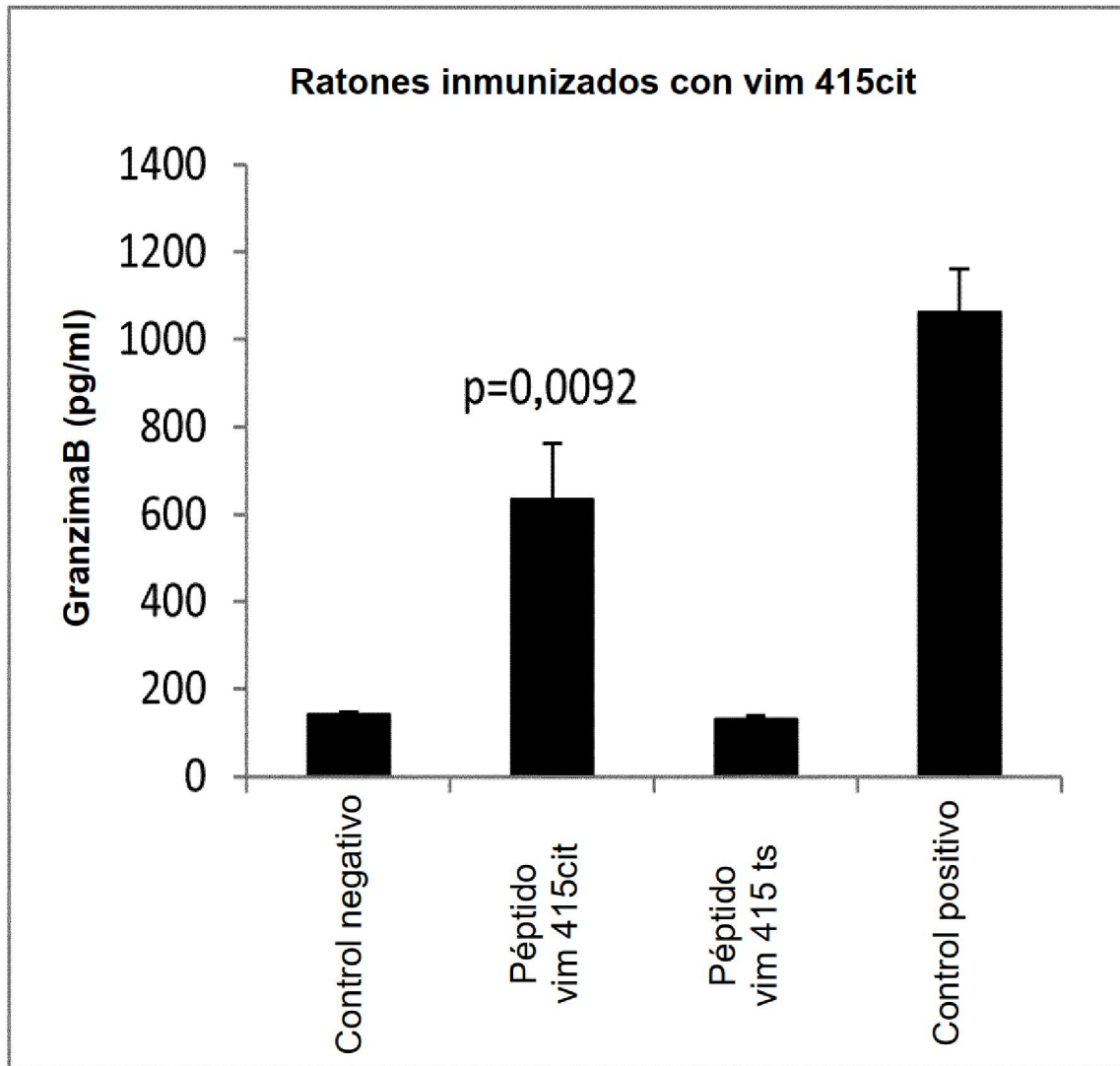
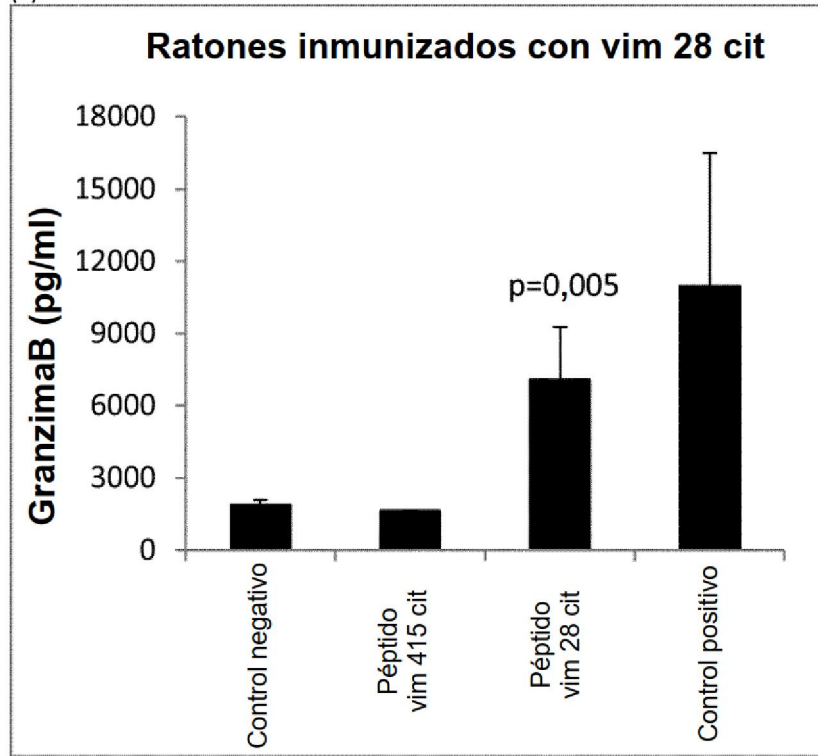


Figura 22 continuación

(c)



(d)

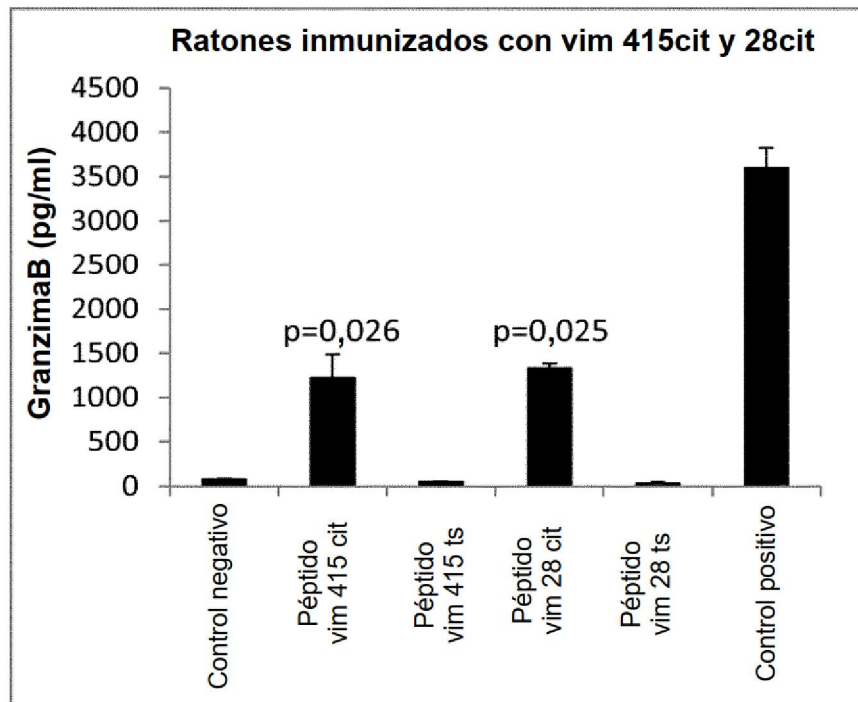


Figura 22 continuación

(e)

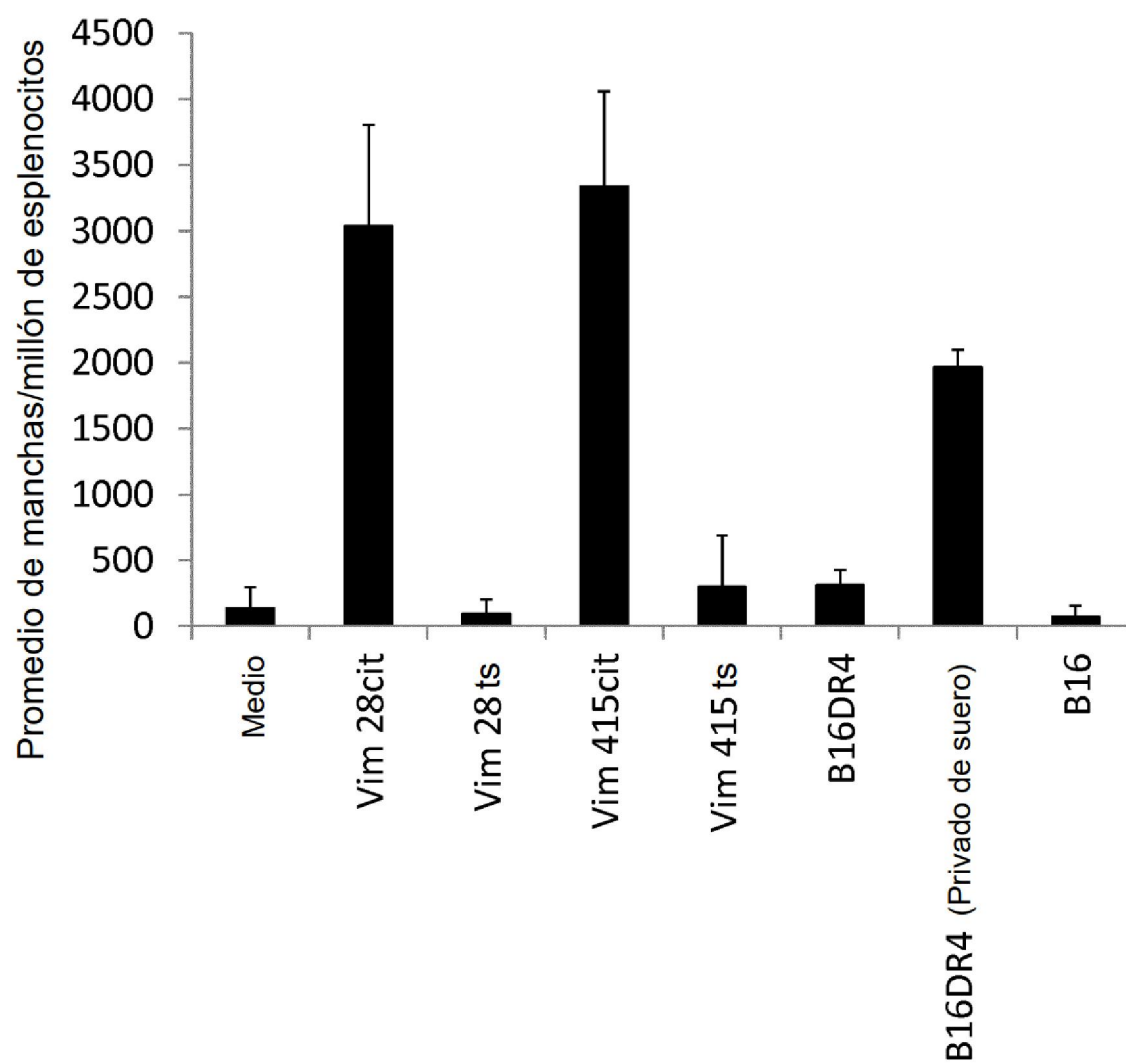
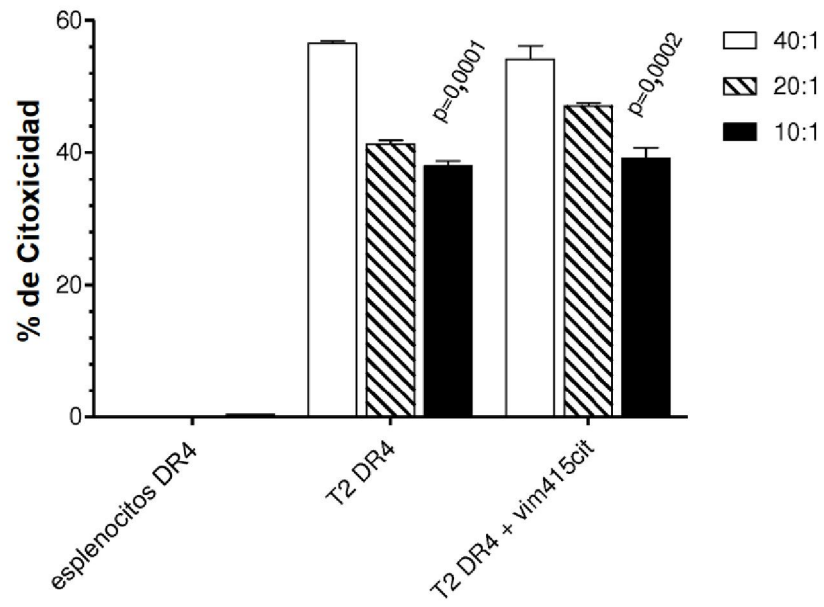


Figura 23

(a)

(i) Vim 415 cit



(ii) Vim 28 cit

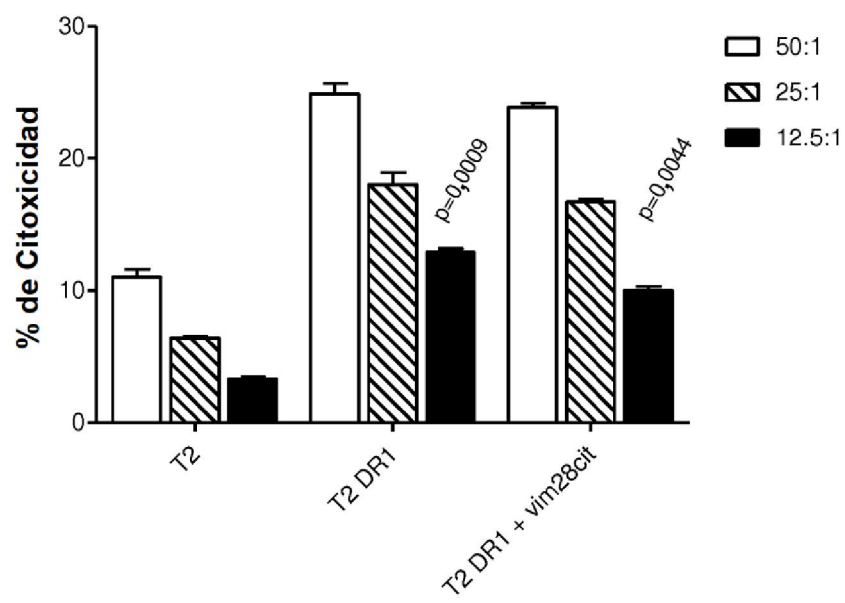


Figura 24

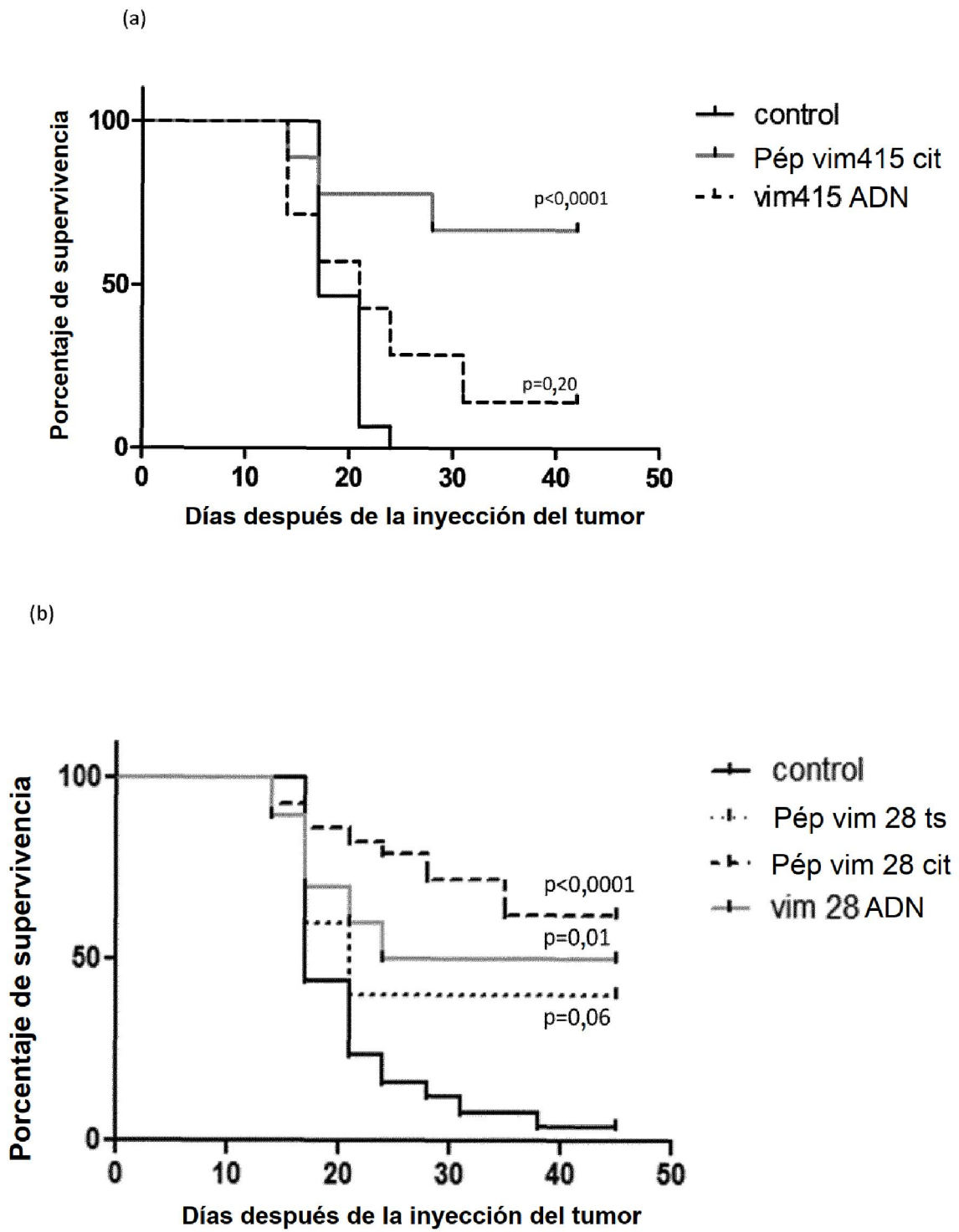
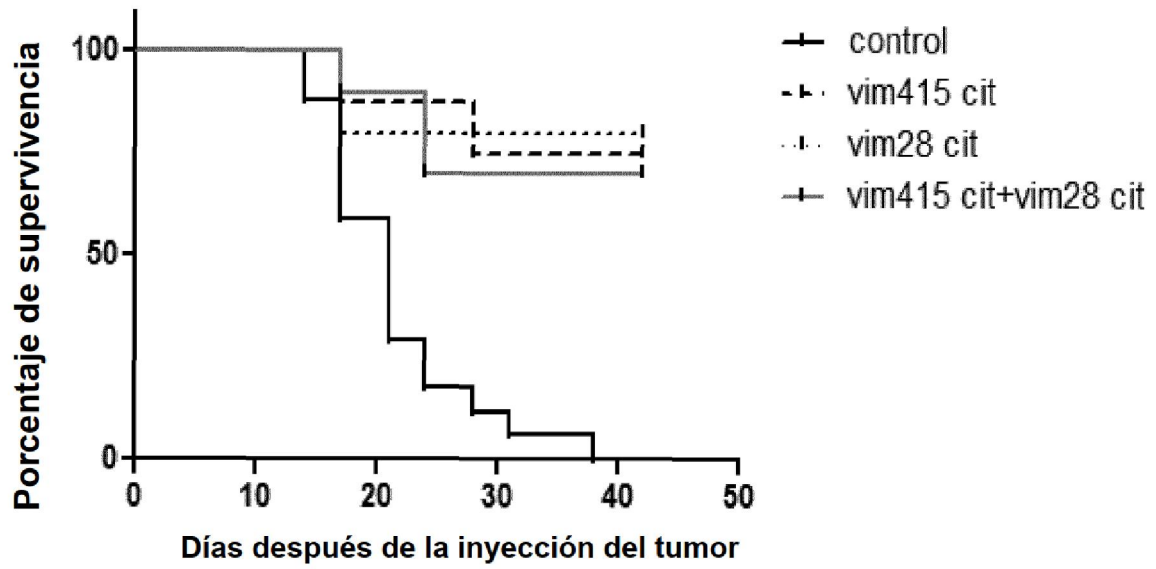


Figura 24 continuación

(c)



(d)

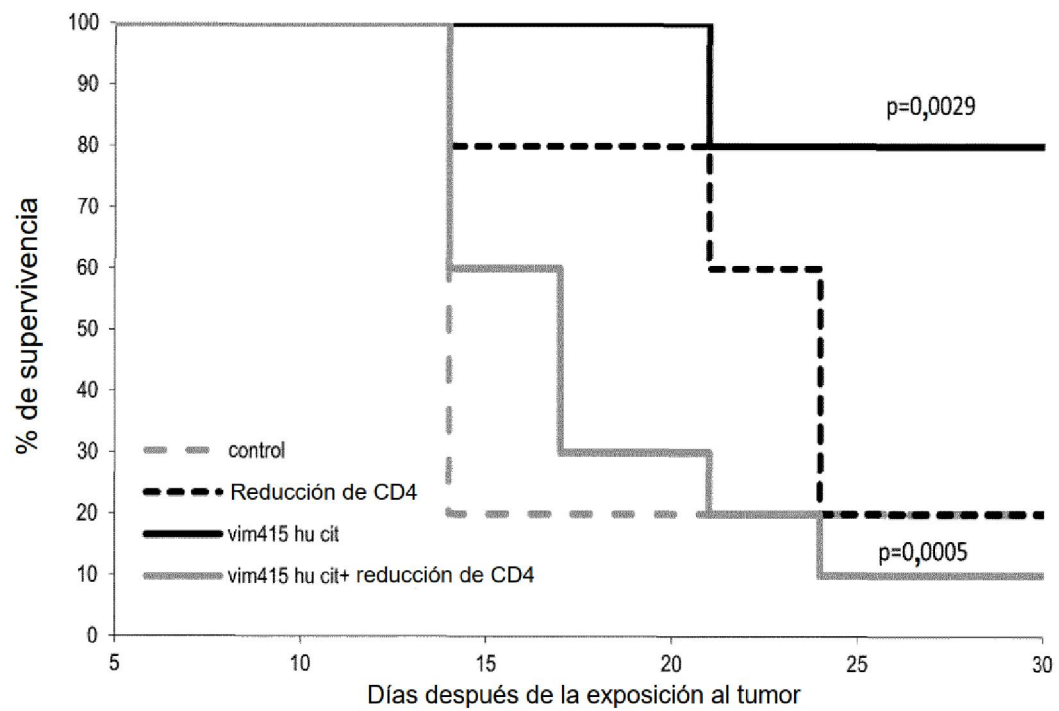


Figura 24 continuación

(e)

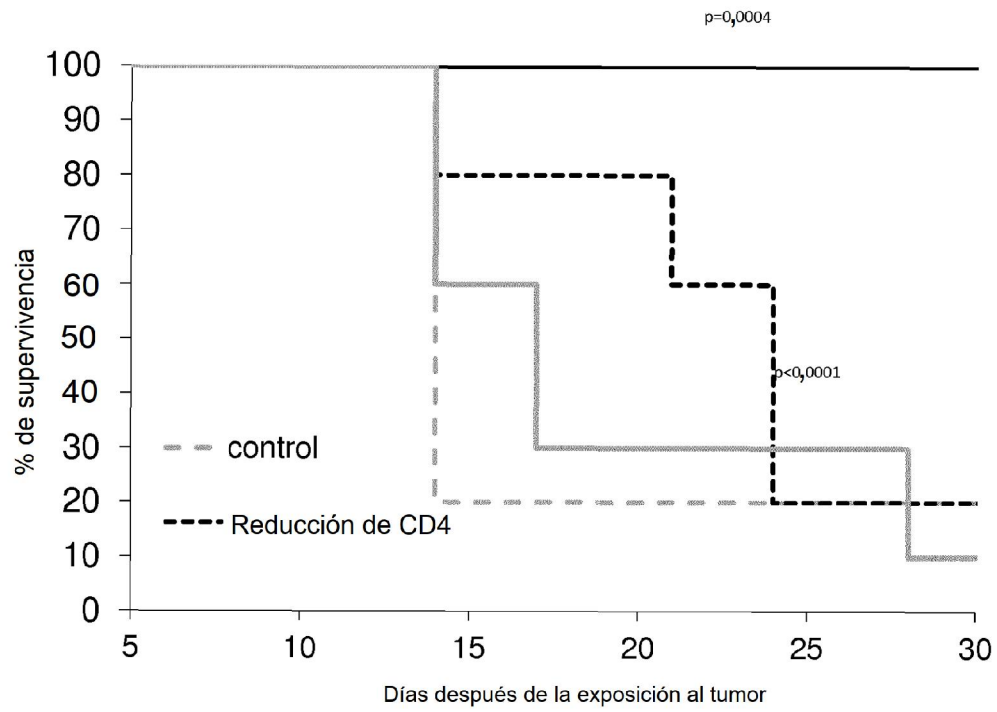
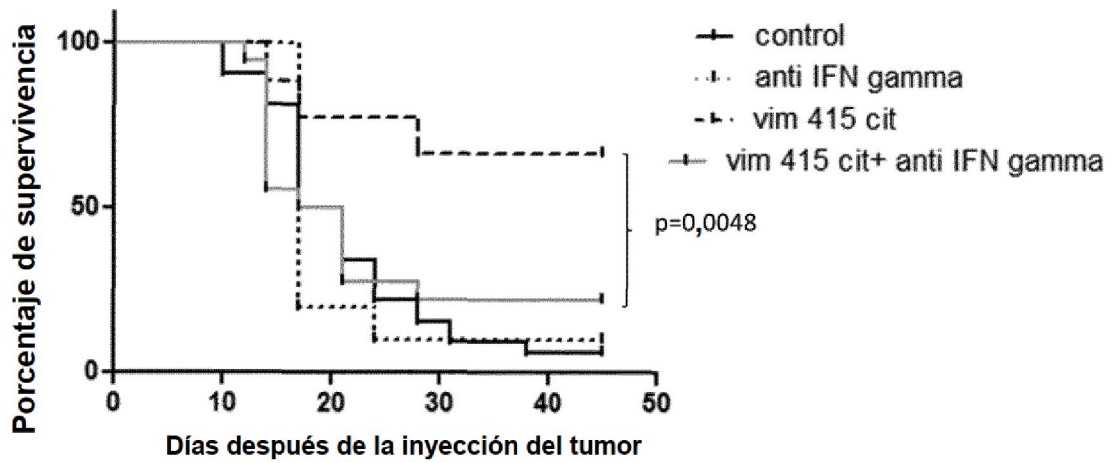


Figura 25

a)



b)

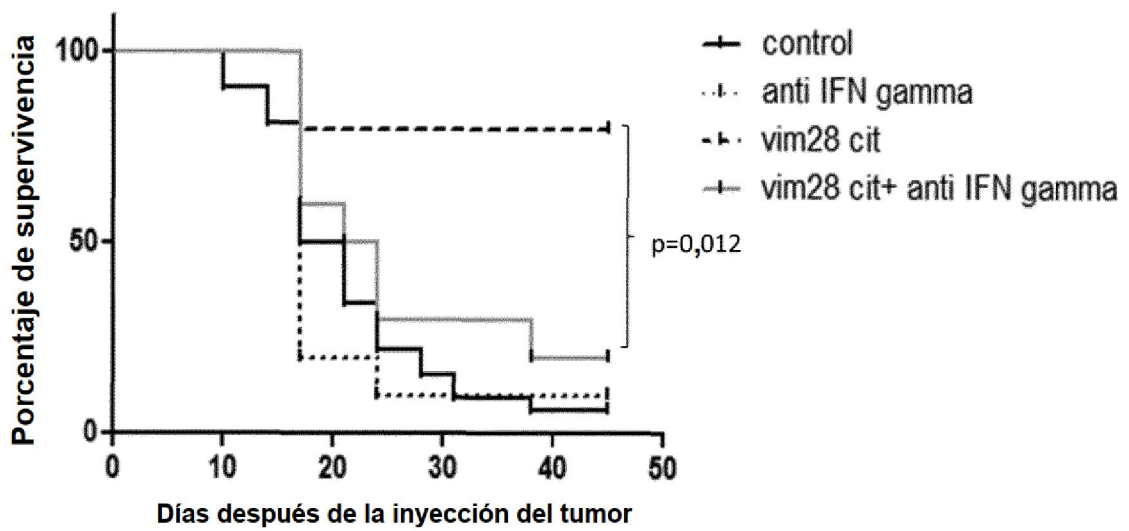
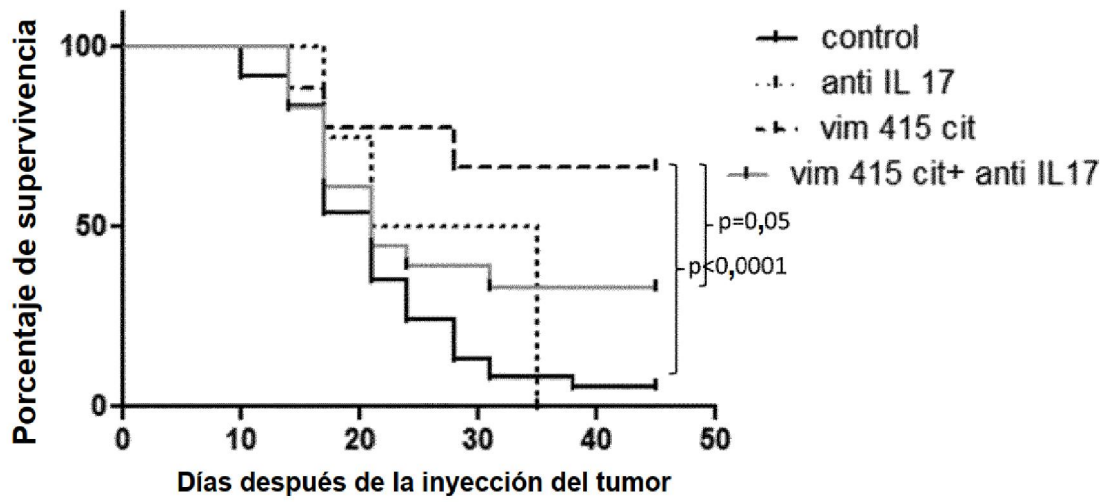


Figura 25 continuación

c)



d)

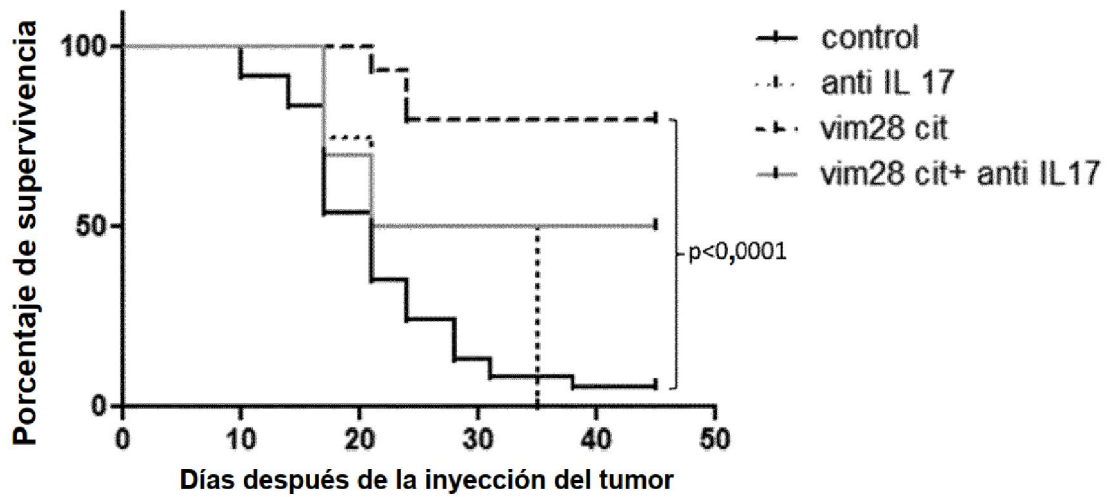
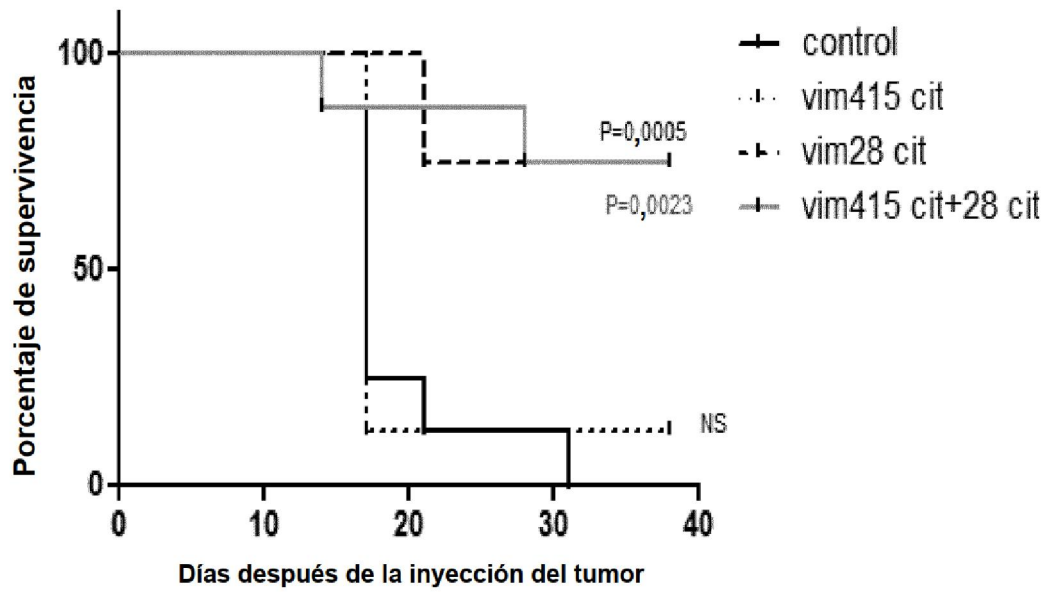


Figura 26

a)



b)

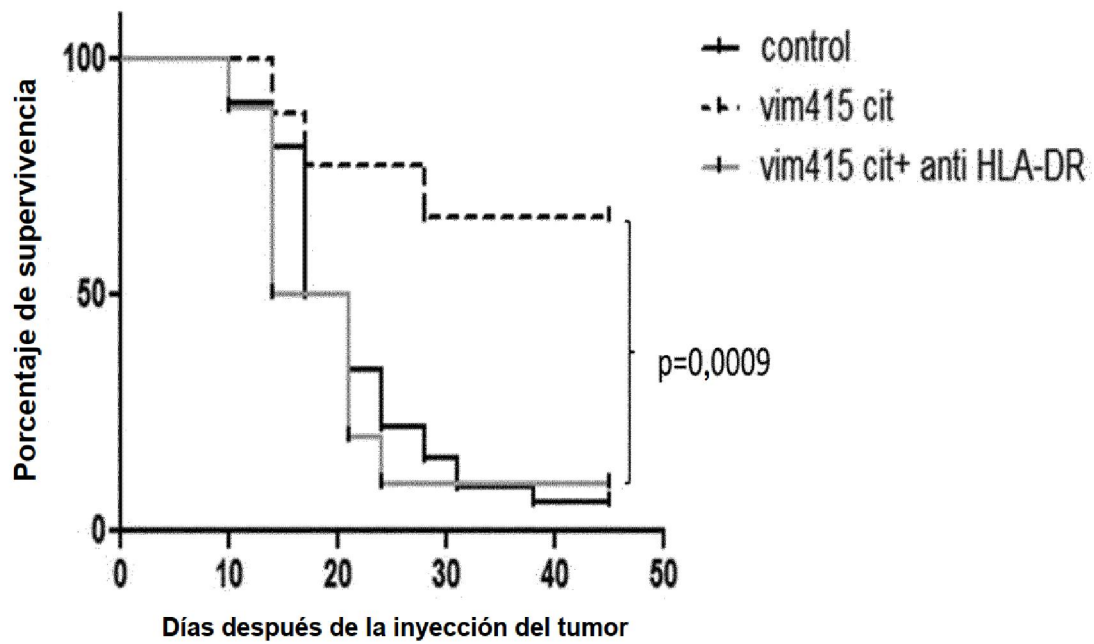


Figura 27

ALINEACIÓN DE VIMENTINA

		Sección 1																						
		1	10	20	30	40	50	60	70	79														
VIMENTINA DE POLLO NP_001041541	(1)	MSEFTS	SSSYRRMFGG	---SSRPSS	TRNHTIS	STR	YSLGSA	LRPS	SARYV	SS19	--GVYRT	MAIVRLRSS	MPFM											
VIMENTINA DE RATÓN	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGSSRPSS	RSYVIT	STR	YSLGSA	LRPST	SRSLY	SSSP	--GVY	TRSSAVRLRSS	VPGV											
VIMENTINA DE PERRO	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGCGSRPS	STRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPST	SRSLY	SSSP	--GVY	TRSSAVRLRSS	VPGV											
VIMENTINA DE OVEJA AB248145	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGGASRP	STRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPST	SRILY	SSSP	--GVY	TRSSAVRLRS	VPGV											
VIMENTINA BOVINA	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGGASRP	STRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPST	SRILY	SSSP	--GVY	TRSSAVRLRS	VPGV											
VIMENTINA DE CABALLO NP_001230074	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGGASRP	STRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPSS	SRILY	SSSP	--GVY	TRSSAVRLRSS	VPGV											
VIMENTINA DE CERDO	(1)	STRIV	SSSYRRMFGG	CGGASRP	SSRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPST	SRSLT	SSSP	CGVY	NAIRSSAVRLRSS	VPGV											
VIMENTINA HUMANA	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGGASRP	STRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPST	SRSLY	SSSP	--GVY	TRSSAVRLRSS	VPGV											
Consenso	(1)	MSTRSV	SSSYRRMFGG	GGGASRP	STRSY	ITSTR	YSLGSA	LRPST	SRSLY	SSSP	GVY	TRSSAVRLRSS	VPGV											
Sección 2																								
		(80)	80	90	100	110	120	130	140	158														
VIMENTINA DE POLLO NP_001041541	(73)	R-M	DA	DTFL	ADAIN	TEFA	RINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	G	SRIGD	LYEE	ENRD						
VIMENTINA DE RATÓN	(78)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
VIMENTINA DE PERRO	(78)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
VIMENTINA DE OVEJA AB248145	(78)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
VIMENTINA BOVINA	(78)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
VIMENTINA DE CABALLO NP_001230074	(78)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
VIMENTINA DE CERDO	(79)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
VIMENTINA HUMANA	(78)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
Consenso	(80)	RLQDS	VDF	SLAD	AINT	EFN	TRINEK	VELQ	ELNDR	FANY	DKV	RFLE	QQNKILLAE	LEQLKG	CKSR	SLGDL	YEE	EMRE						
Sección 3																								
		(159)	156	170	180	190	200	210	220	237														
VIMENTINA DE POLLO NP_001041541	(151)	VRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLAG	DLER	PVE	IQE	EI	FLK	
VIMENTINA DE RATÓN	(157)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK
VIMENTINA DE PERRO	(157)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK
VIMENTINA DE OVEJA AB248145	(157)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK
VIMENTINA BOVINA	(157)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK
VIMENTINA DE CABALLO NP_001230074	(157)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK
VIMENTINA DE CERDO	(99)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
VIMENTINA HUMANA	(157)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK
Consenso	(159)	LRQVD	Q	INDK	ARVE	VERDN	LAED	IMRL	REK	IQE	EM	LQRE	EA	EST	IQS	FRQ	VDN	SLA	RLDL	LRK	VE	IQE	EI	FLK

93

Figura 28 Vimentina

a) HLA-DR1

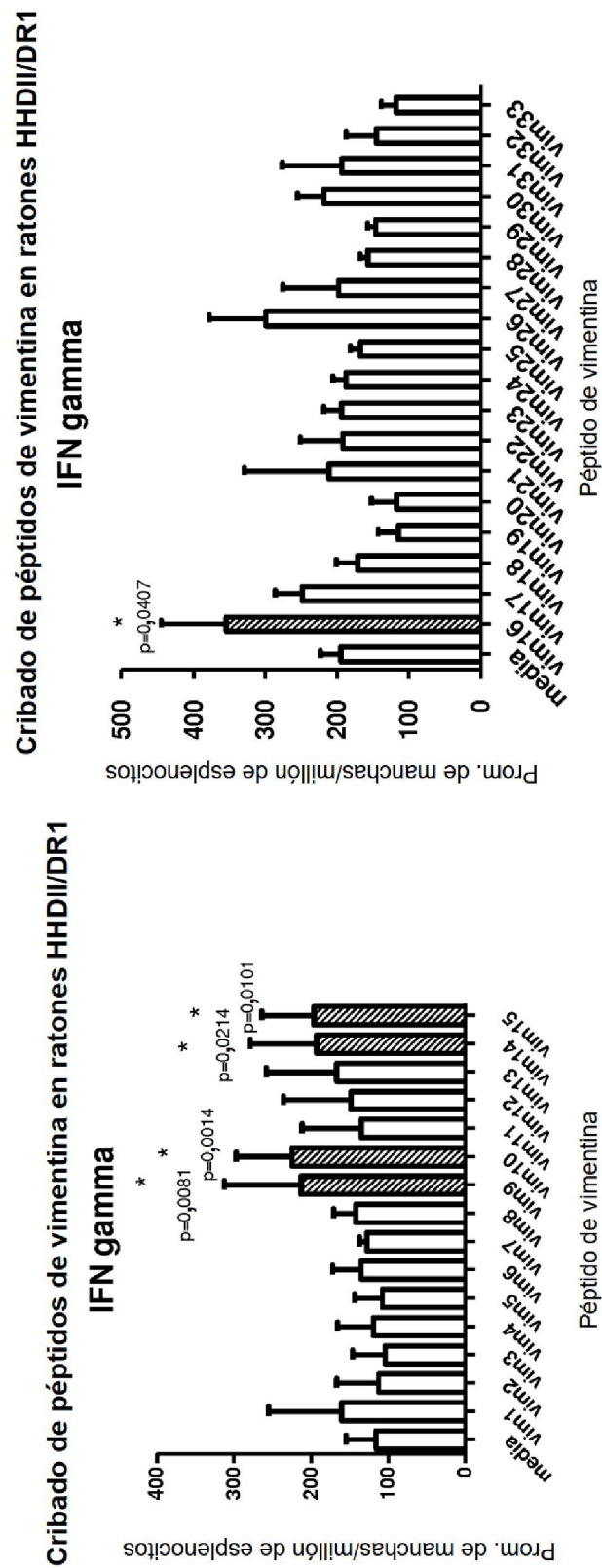


Figura 28 continuación

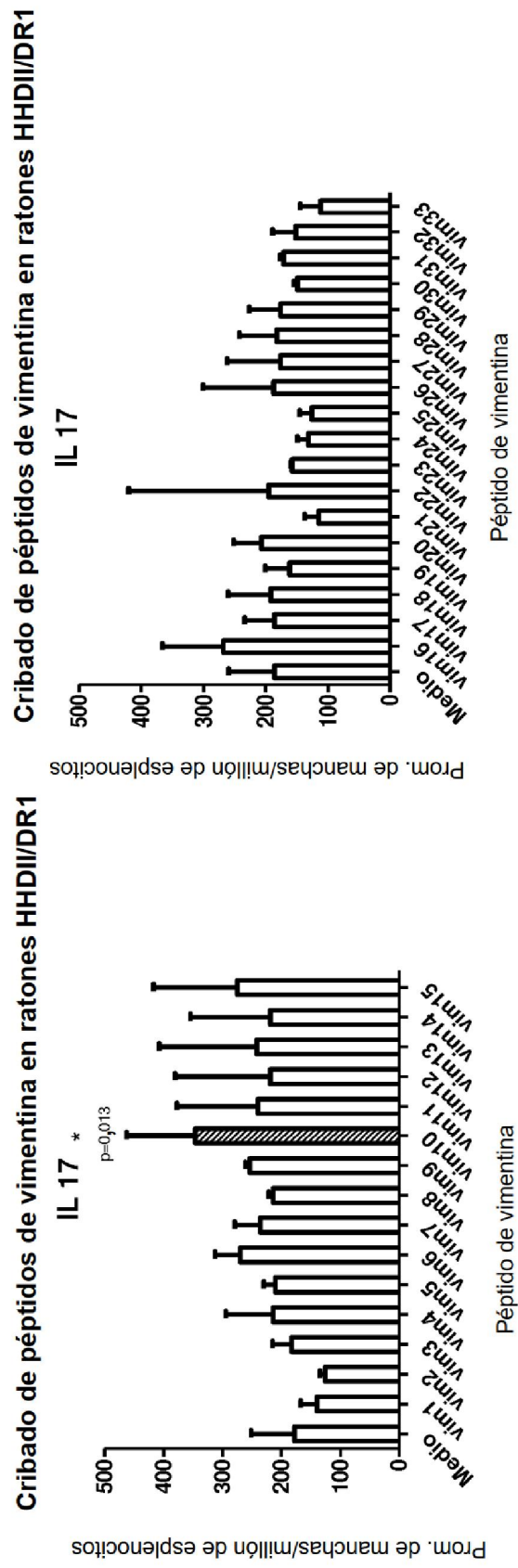


Figura 28 continuación

b) C57Bl

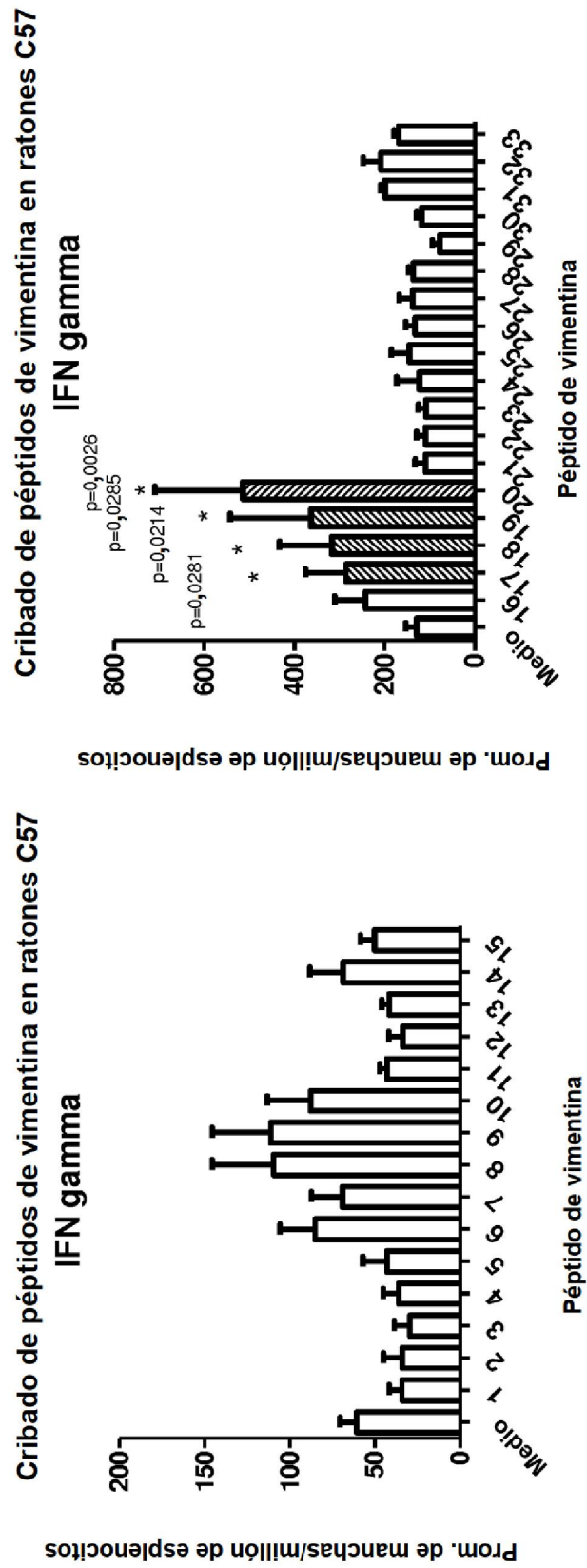


Figura 28 continuación

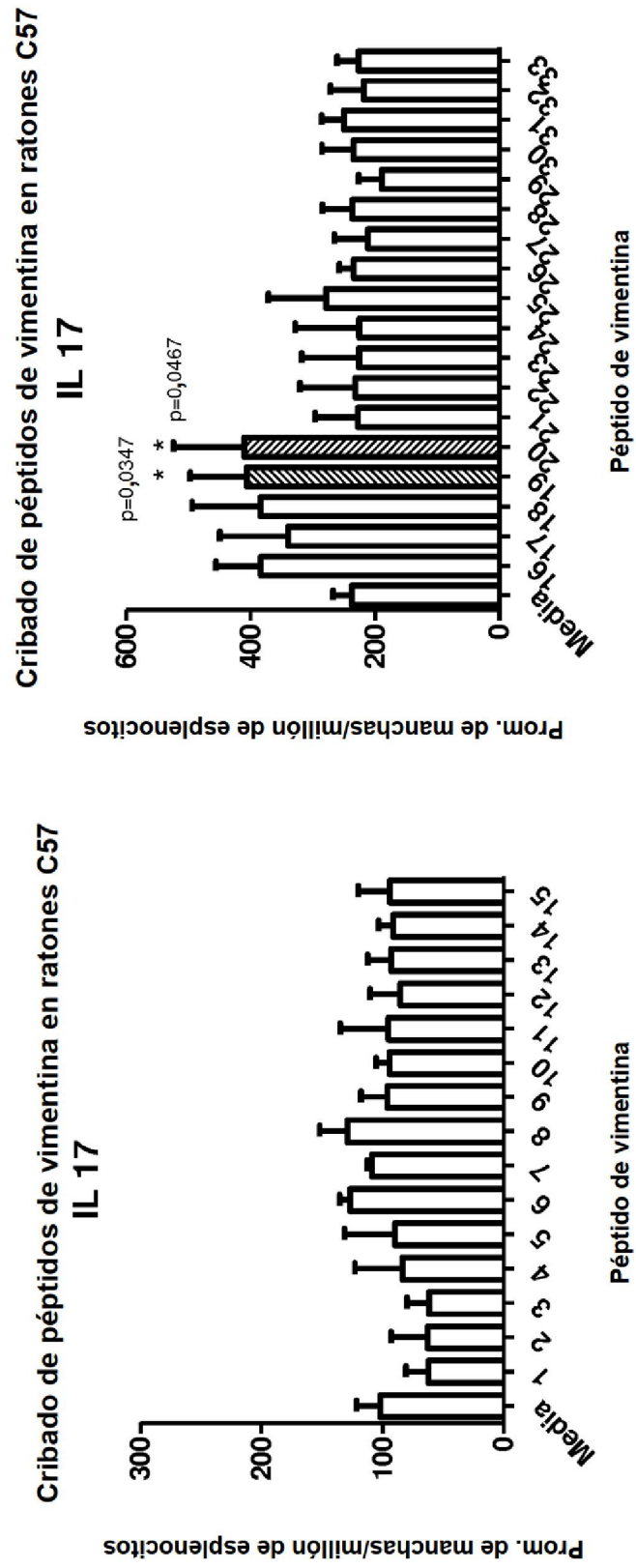


Figura 28 continuación

c)

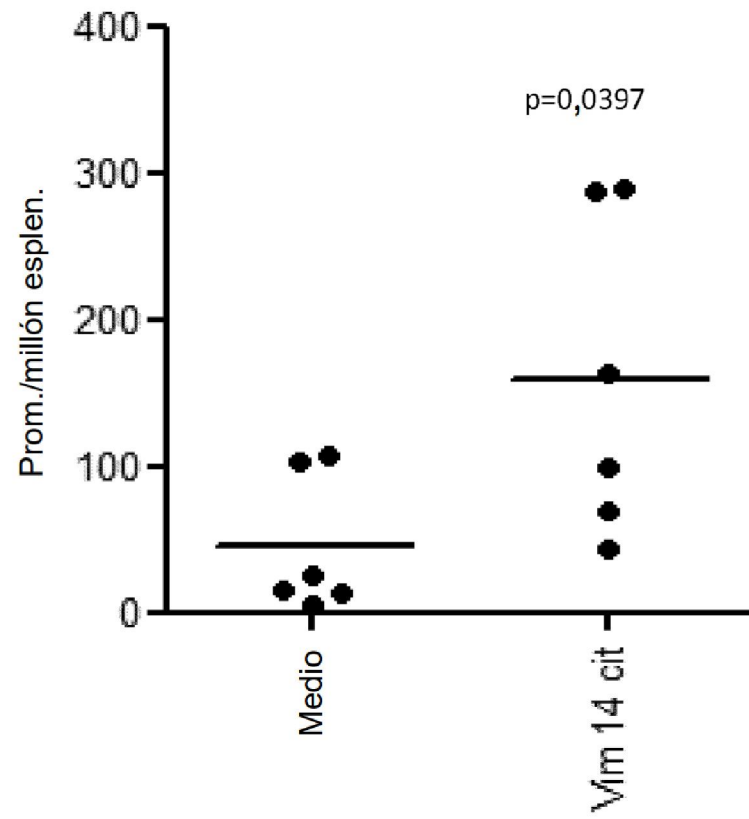


Figura 29

a) Ratones HLA-DR1

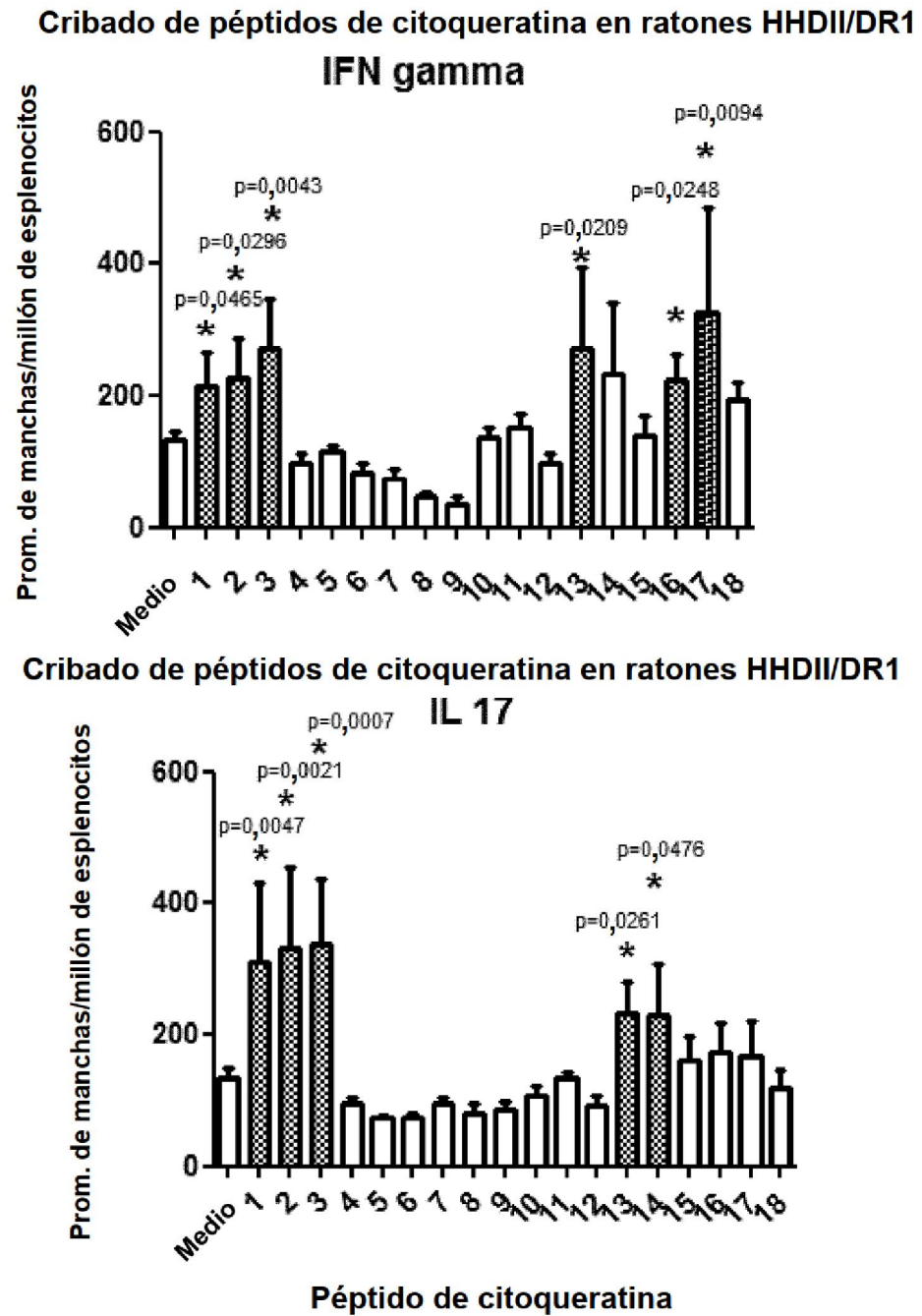


Figura 29 continuación

b) Ratones C57Bl

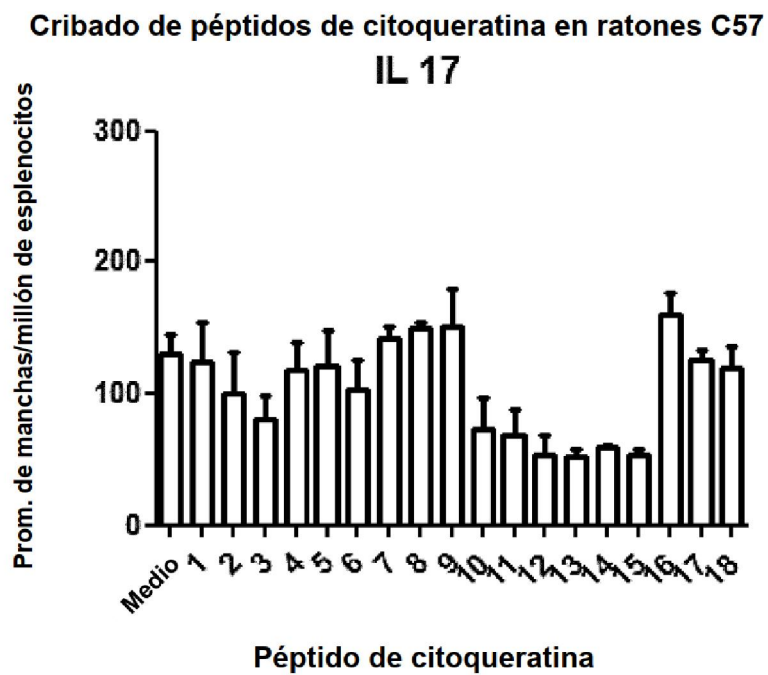
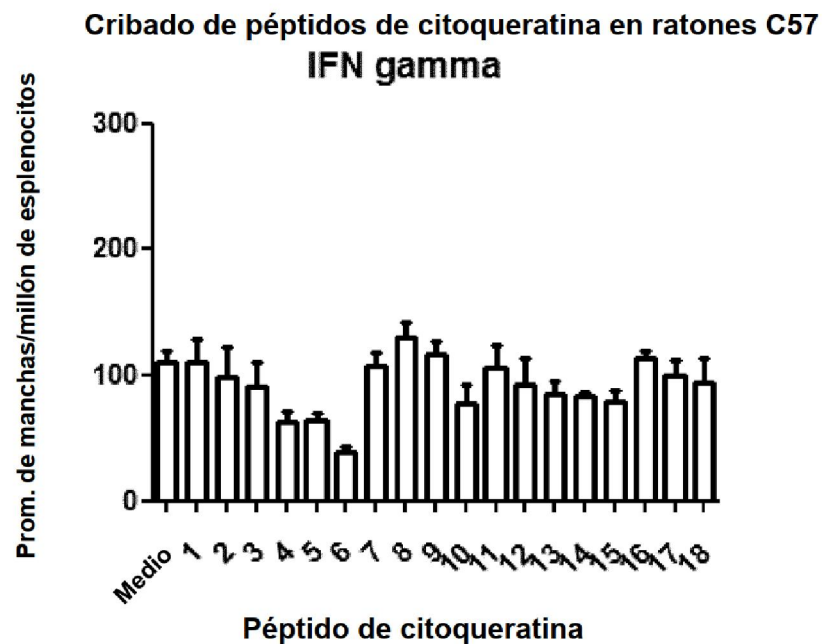


Figura 30

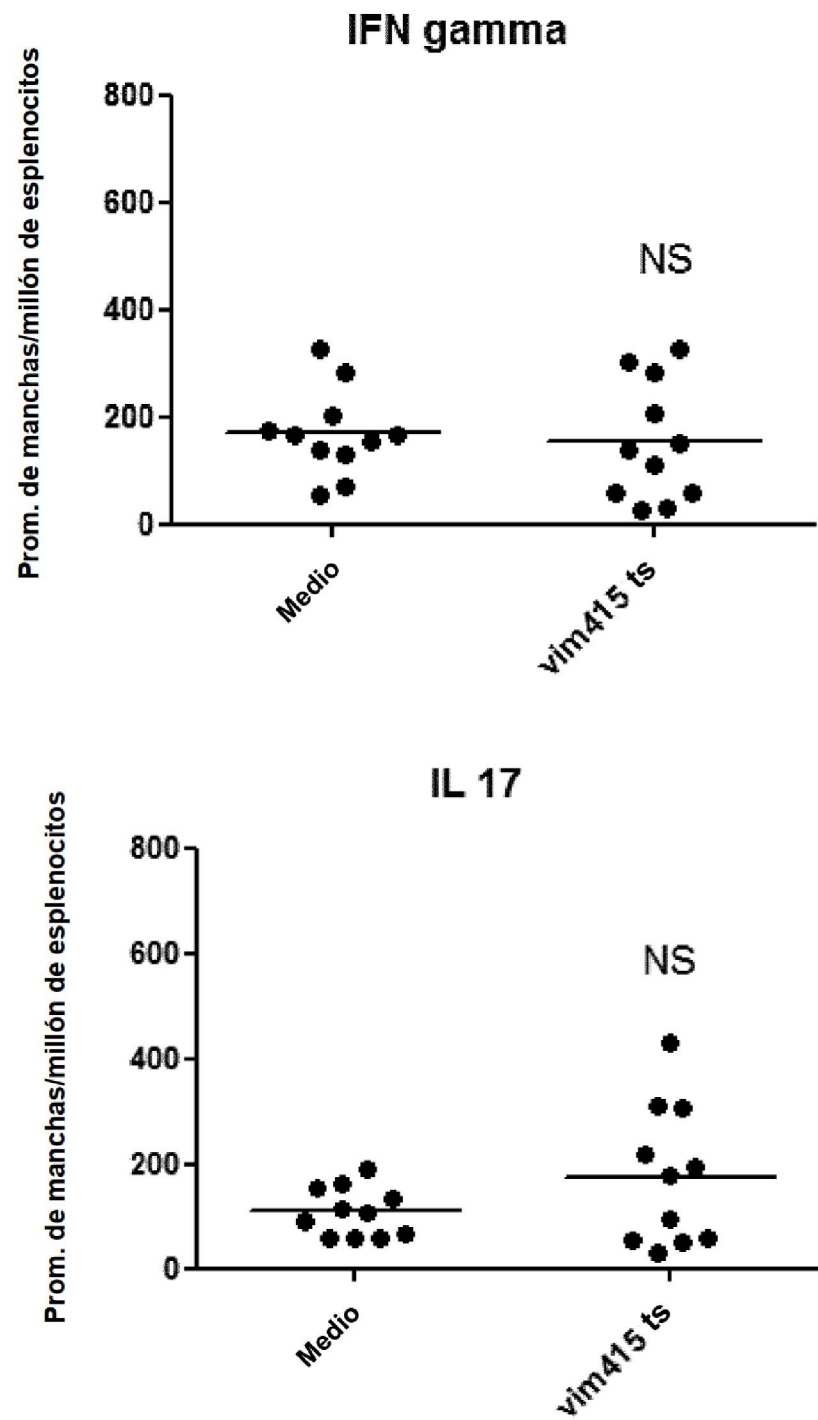


Figura 30 continuación

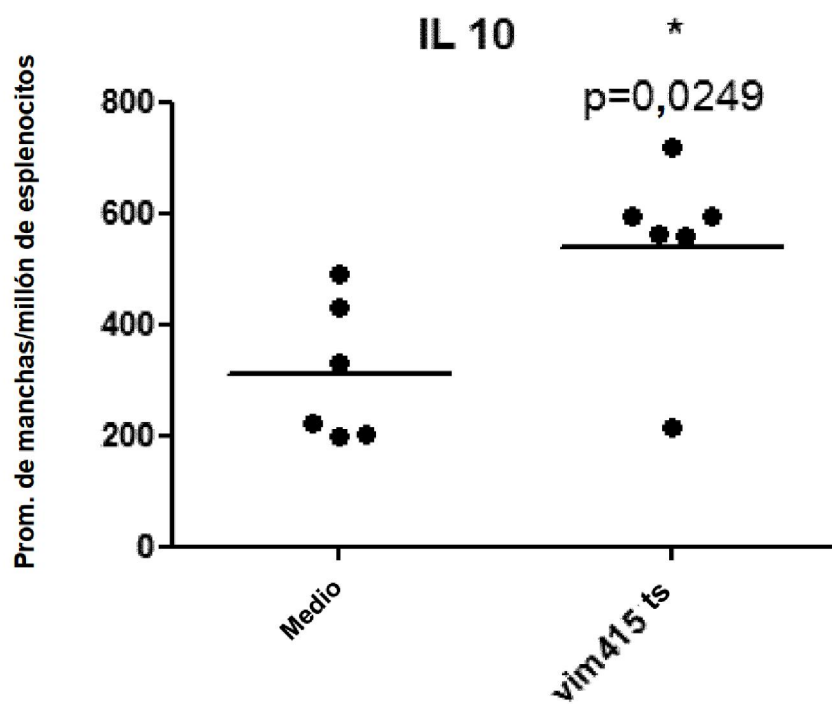


Figura 31

a)

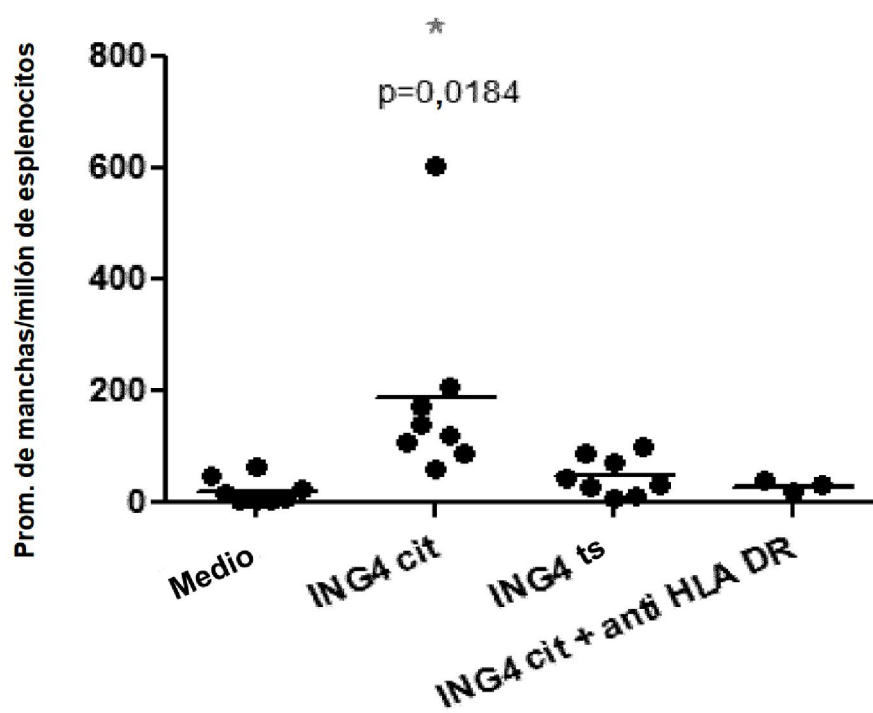


Figura 32

	Número de acceso Uniprot
NYESO-1	P78358
MMP7	P09237
Citoqueratina 18	P05783
Citoqueratina 8	P05787
Citoqueratina 19	P08727
Proteína de la capa intermedia del cartílago (CILP) 1	O75339 Q8IUL8
2	
ING4	Q9UNL4
P53	P04637
PAD4	Q9UM07
Vimentina	P08670
Adolasa B	P05062
C	P09972
A	P04075
PGK1	P00558
BiP	P11021
Calreticulina	P27797
HSP90α	P07900
HSP80β	P08238
Hsp60	P10809
GSK3β	P49841
Proteína de unión a elemento muy anterior 1	Q96AE4 Q96I24
3	
Asporina	Q9BXN1
Catepsina D	P07339
Beta actina humana	P60709
Albúmina	P02768
Receptor G de histamina H3	Q9Y5N1

Figura 32 continuación

	Número de acceso Uniprot
H1	P35367
H2	P25021
ALDH2	P05091
Precursor de la proteína disulfuro isomerasa ER60 (PDIA3)	P30101
Subunidad alfa 1 de la proteína del capuchón de F-actina	P52907
Proteína de unión a heparina	P20160
Nucleofosmina B23	P06748
¿Coactivador de P300?	Q09472
Agrecano	P16112
Proteína relacionada con glucosa	Q9Y4L1
CXCL-12	P48061
CXCL-8	P10145
CXCL-10	P02778
alfa-enolasa	P06733
proteína básica de mielina	P02686
Antitrombina	P01008
factor 1alfa de elongación	P68104
Proteína asociada a adenilciclase	Q01518
Histona H1- H1.0	P07305
Histona H1- H1.1	Q02539
Histona H1- H1.2	P16403
Histona H1- H1.3	P16402
Histona H1- H1.4	P10412
Histona H1- H1.5	P16401
Histona H1-H1t	P22492
Histona H1- H1FNT	Q75WM6
Histona H1-H1oo	Q8IZA3
Histona H1-H1x	Q92522
Histona H2A- tipo 1	P0C0S8
Histona H2A -tipo 3	Q7L7L0
Histona H2A- tipo 2-A	Q6FI13

Figura 32 continuación

	Número de acceso Uniprot
Histona H2A- tipo 2-B	<u>Q8IUE6</u>
Histona H2A - tipo 2-C	<u>Q16777</u>
Histona H2B - tipo 1-A	<u>Q96A08</u>
Histona H2B - tipo 1-B	<u>P33778</u>
Histona H2B - tipo 1-C/E/F/G/I	<u>P62807</u>
Histona H2B - tipo 1-H	<u>Q93079</u>
Histona H2B - tipo 1-M	<u>Q99879</u>
Histona H2B - tipo 1-L	<u>Q99880</u>
Histona H2B - tipo 1-N	<u>Q99877</u>
Histona H2B - tipo 1-O	<u>P23527</u>
Histona H2B - tipo 1-J	<u>P06899</u>
Histona H2B - tipo 1-D	<u>P58876</u>
Histona H2B - tipo 1-K	<u>Q60814</u>
Supuesta histona H2B tipo 2-C	<u>Q6DN03</u>
Supuesta histona H2B tipo 2-D	<u>Q6DRA6</u>
Histona H2B - tipo 2-E	<u>Q16778</u>
Histona H2B - tipo 2-F	<u>Q5QNW6</u>
Histona H2B tipo 3-B	<u>Q8N257</u>
Histona H2B tipo F-S	<u>P57053</u>
Histona H2B tipo F-M	<u>P0C1H6</u>
Histona H2B tipo W-T	<u>Q7Z2G1</u>
Histona H3-H3.1	<u>P68431</u>
Histona H3-H3.2	<u>Q71DI3</u>
Histona H3-H3.3	<u>P84243</u>
Histona H4	<u>P62805</u>

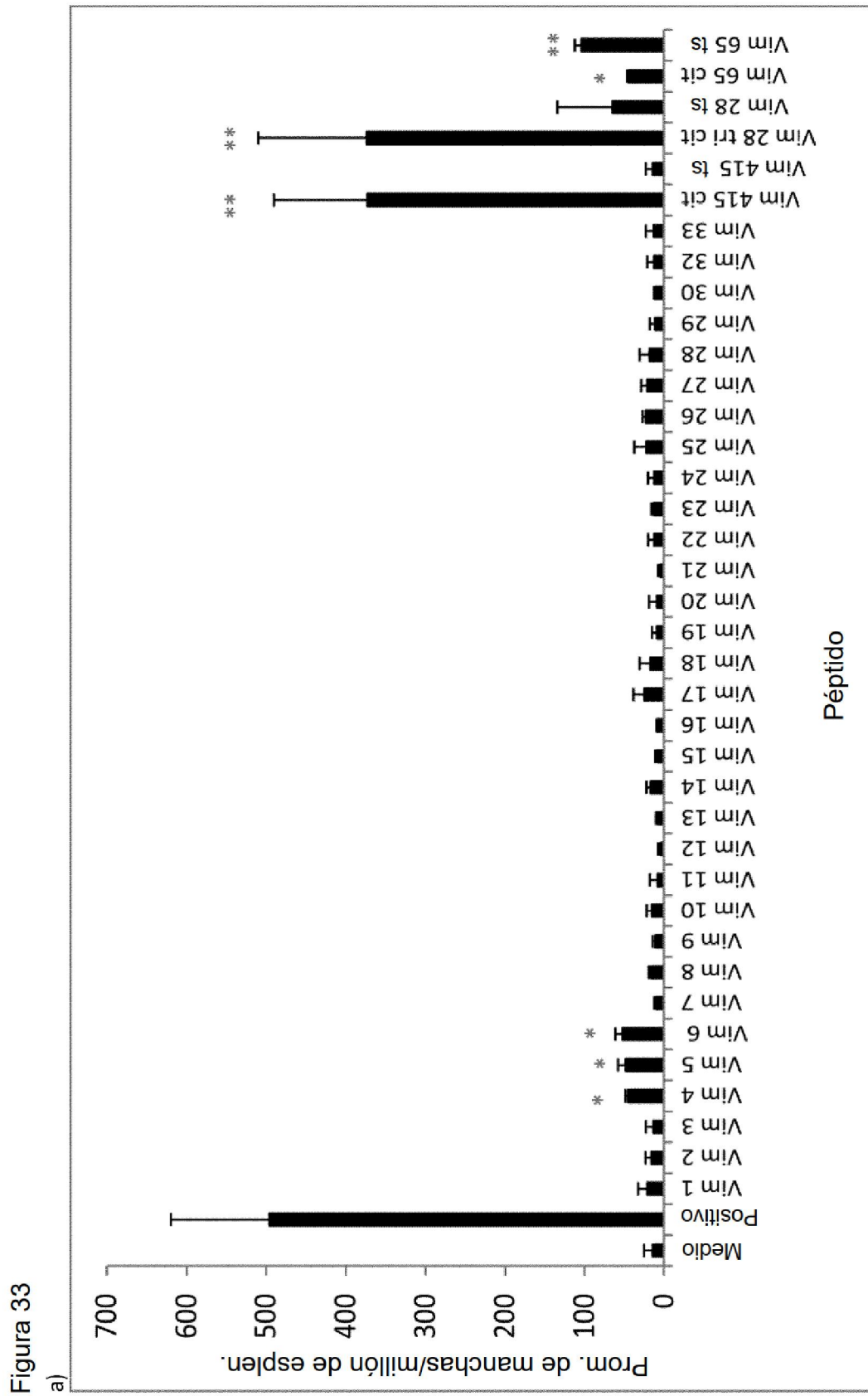
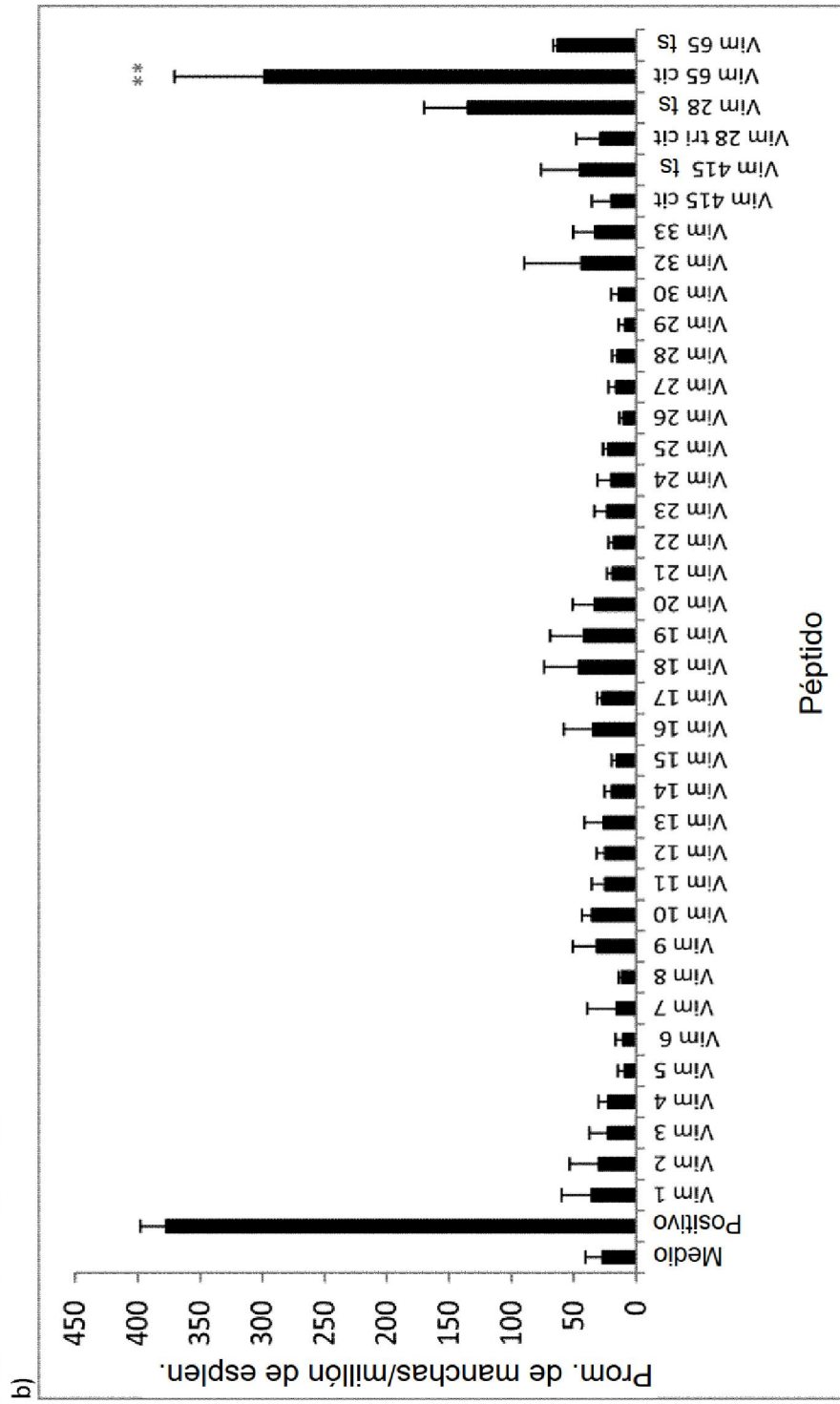


Figura 33 continuación



* p<0,05, ** p<0,005, *** p<0,0001

Figura 34

