



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 200 526**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **99928238 .7**

96 Fecha de presentación : **30.06.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1093381**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2001**

54 Título: **Péptidos antigénicos derivados de telomerasa.**

30 Prioridad: **08.07.1998 NO 19983141**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.03.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **11.12.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **11.12.2009**

73 Titular/es: **GemVax AS.**
Noreveien 7
0379 Oslo, NO

72 Inventor/es: **Gaudernack, Gustav;**
Eriksen, Jon, Amund;
Moller, Mona;
Gjertsen, Marianne Klemp;
Saeterdal, Ingvil y
Saeboe-Larsen, Stein

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 200 526 T5

DESCRIPCIÓN

Péptidos antigénicos derivados de telomerasa.

5 Esta invención se refiere a proteínas o a péptidos que producen inmunidad mediada por linfocitos T, y a vacunas contra el cáncer y a composiciones para el tratamiento contra el cáncer que comprenden dichos fragmentos de proteínas o de péptidos. Esta invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas o los péptidos y a métodos para generar linfocitos T capaces de reconocer y destruir células tumorales en un mamífero.

10 El cáncer se desarrolla a través de un proceso de etapas múltiples que implica varios sucesos mutacionales. Estas mutaciones dan como resultado una expresión/funciona-miento alterado de los genes que pertenecen a dos categorías: oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes surgen en la naturaleza a partir de proto-oncogenes a través de mutaciones puntuales o translocaciones, dando con ello como resultado un estado transformado de la célula que alberga la mutación. Todos los oncogenes codifican y actúan a través de una proteína. Los proto-oncogenes son genes
15 normales de la célula que tienen el potencial de convertirse en oncogenes. En la mayoría de los casos, se ha observado que los proto-oncogenes son componentes de vías de transducción de señales. Los oncogenes actúan de un modo dominante. Por otro lado, los genes supresores de tumores actúan de forma recesiva, es decir, mediante la pérdida de la función y contribuyen a la oncogénesis cuando los dos alelos que codifican la proteína funcional están alterados para producir productos génicos no funcionales.

20 La acción concertada de una combinación de oncogenes alterados y genes supresores de tumores da como resultado la transformación celular y el desarrollo de un fenotipo maligno.

25 Tales células están inclinadas a la senescencia y tienen una vida de duración limitada. En la mayoría de los cánceres, la inmortalización de las células tumorales requiere la activación de un complejo enzimático denominado telomerasa. En las células somáticas, la subunidad catalítica de esta enzima no está expresada generalmente. Sucesos adicionales, tales como la acción de proteínas codificadas por un virus tumoral o la desmetilación de sitios de promotor silenciados, pueden dar como resultado la expresión de un complejo de telomerasa funcional en células tumorales.

30 En el campo de la inmunología humana del cáncer, se han observado en las dos últimas décadas esfuerzos intensos para caracterizar antígenos genuinos específicos del cáncer. En particular, se han hecho esfuerzos para analizar anticuerpos de antígenos tumorales humanos. La técnica anterior sugiere que tales anticuerpos podrían utilizarse tanto para fines diagnósticos como terapéuticos, por ejemplo en relación con un agente anti-cancerígeno. Sin embargo, los anticuerpos sólo se pueden unir a antígenos tumorales que están expuestos en la superficie de células tumorales. Por
35 esta razón, los esfuerzos para producir un tratamiento del cáncer basado en el sistema inmune del cuerpo, han tenido menos éxito del esperado.

Una característica fundamental del sistema inmune es que puede distinguir entre propio y no propio y normalmente no reacciona contra moléculas propias. Se ha observado que el rechazo de tejidos u órganos trasplantados, procedentes
40 de otros individuos es una respuesta inmune a los antígenos extraños en la superficie de las células trasplantadas. La respuesta inmune consiste en general en una respuesta humoral, mediada por anticuerpos, y en una respuesta celular. Los anticuerpos son producidos y secretados por linfocitos B y reconocen típicamente antígenos libres en conformación nativa. Por ello, también pueden reconocer potencialmente casi cualquier sitio expuesto sobre la superficie del antígeno. En contraposición con los anticuerpos, los linfocitos T, que median en el brazo celular de la respuesta inmune,
45 reconocen antígenos sólo en el contexto de moléculas del MHC, y sólo después de un procesamiento apropiado del antígeno. Este procesamiento del antígeno consiste habitualmente en una fragmentación proteolítica de la proteína, dando como resultado péptidos que encajan en la muesca de las moléculas del MHC. Esto permite que los linfocitos T también reconozcan péptidos procedentes de antígenos intracelulares.

50 Los linfocitos T pueden reconocer así péptidos aberrantes procedentes de cualquier lugar en la célula tumoral, en el contexto de moléculas del MHC sobre la superficie de la célula tumoral. Los linfocitos T subsiguientemente, pueden ser activados para eliminar la célula tumoral que alberga el péptido aberrante. En modelos experimentales que implican tumores de muridos, se ha observado que mutaciones puntuales en proteínas "propias" intracelulares pueden producir antígenos de rechazo tumoral, que consisten en péptidos que difieren en un solo aminoácido del péptido normal. Los
55 linfocitos T que reconocen estos péptidos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), en la superficie de las células tumorales, son capaces de destruir las células tumorales y, por tanto, expulsar el tumor del hospedador (Boon y col., 1989, *Cell* 58, 293-303).

60 Las moléculas del MHC en seres humanos se denominan generalmente moléculas del HLA (antígeno asociado a leucocito humano). Hay dos clases principales de moléculas del HLA, la clase I y la clase II. Las moléculas del HLA de clase I están codificadas por los subloci HLA A, B y C y activan principalmente linfocitos T citotóxicos CD8+. Las moléculas del HLA de clase II, por otro lado, activan principalmente linfocitos T CD4+ y están codificadas por los subloci DR, DP y DQ. Cada individuo tiene normalmente seis moléculas diferentes del HLA de clase I, habitualmente
65 dos alelos de cada uno de los tres subgrupos A, B y C, aunque en algunos casos el número de moléculas diferentes del HLA de clase I está reducido, debido a la presencia repetida del mismo alelo del HLA.

Los productos génicos del HLA son altamente polimórficos. Individuos distintos expresan diferentes moléculas del HLA que difieren de las encontradas en otros individuos. Esto explica la dificultad en encontrar donantes de

órganos con HLA compatibles en trasplantes. La importancia de la variación genética de las moléculas del HLA en la inmunobiología se refleja por su papel como genes de la respuesta inmune. A través de su capacidad de unión a los péptidos, la presencia o ausencia de determinadas moléculas del HLA, gobierna la capacidad de un individuo para responder a epítomos de péptidos específicos. Como consecuencia, las moléculas del HLA determinan la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad.

Los linfocitos T pueden inhibir el desarrollo y el crecimiento del cáncer, mediante una diversidad de mecanismos. Los linfocitos T citotóxicos, tanto CD8+ restringidos al HLA de clase I y CD4+ restringidos al HLA de clase II, pueden destruir directamente células tumorales que presentan los antígenos tumorales apropiados. Generalmente, los linfocitos T CD4+ auxiliares son necesarios para las respuestas de linfocitos T CD8+ citotóxicos, pero si el antígeno peptídico está presentado por una APC adecuada, los linfocitos T CD8+ citotóxicos se pueden activar directamente, dando como resultado una respuesta más veloz, fuerte y eficaz.

Aunque los péptidos que son presentados por las moléculas del HLA de clase II tienen longitudes distintas (12-25 aminoácidos), los péptidos presentados por las moléculas del HLA de clase I normalmente deben tener exactamente una longitud de nueve restos de aminoácidos, para encajar en la muesca de unión del HLA de clase I. Un péptido más largo daría como resultado la falta de unión, si no se puede procesar internamente por una APC o una célula diana, tal y como una célula cancerígena antes de presentarlo a la muesca del HLA de clase I. Sólo se ha descrito un número limitado de desviaciones de este requerimiento de nueve aminoácidos, y en esos casos, la longitud del péptido presentado era ocho o diez restos de aminoácidos.

Revisiones de cómo se unen los péptidos al MHC se pueden encontrar en Hans-Georg Rammensee, Thomas Friede y Stefan Stevanovic (1995, *Immunogenetics* 41, 178-228) y en Barinaga (1992, *Science* 257, 880-881). Male y col., (1987, *Advanced Immunology*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia) ofrecen una explicación más extensa de los antecedentes técnicos de esta invención.

En el documento de solicitud de patente internacional WO92/14756, describimos péptidos sintéticos y fragmentos de productos proteicos de oncogenes que tienen una mutación puntual o translocaciones, comparados con su proto-oncogén o su proteína del gen supresor de tumores. Estos péptidos se corresponden, abarcan completamente o son fragmentos del fragmento proteico del oncogén procesado o del fragmento del gen supresor de tumores, tal y como lo presentan las células cancerígenas u otras células presentadoras de antígeno, y se presentan como un complejo de HLA-péptido por al menos un alelo en cada individuo. Estos péptidos también se demostró que inducían respuestas de linfocitos T específicos del fragmento proteico del oncogén real, producido por la célula mediante procesamiento y presentado en la molécula de HLA. En particular describimos péptidos derivados de la proteína p21-*ras* que tenía mutaciones puntuales en posiciones particulares de aminoácidos, es decir, las posiciones 12, 13 y 61. Estos péptidos se ha demostrado que son eficaces en la regulación del crecimiento de células cancerígenas *in vitro*. Además, se ha demostrado que los péptidos producen inmunidad de linfocitos T CD4+ contra células cancerígenas que albergan la proteína del oncogén mutado p21-*ras*, mediante la administración de tales péptidos en esquemas de vacunación o de terapia contra el cáncer. Más adelante hemos demostrado que estos péptidos también producen inmunidad de linfocitos T CD8+ contra células cancerígenas que albergan la proteína del oncogén mutado p21-*ras*, mediante la administración mencionada anteriormente (véase, M.K. Gjertsen y col., *Int. J. Cancer*, 1997, vol. 72 p. 784).

Sin embargo, los péptidos descritos anteriormente serán útiles sólo en cierto número de cánceres, es decir, en los que están implicados oncogenes con mutaciones puntuales o translocaciones en un proto-oncogén o en un gen supresor de tumores. Por tanto, existe una gran necesidad de un tratamiento anticancerígeno o una vacuna que sea eficaz contra una gama más general de cánceres.

En general, los tumores son muy heterogéneos en relación con las alteraciones genéticas encontradas en las células tumorales. Esto implica que el efecto terapéutico potencial y la resistencia profiláctica de una vacuna contra el cáncer se incrementará con el número de dianas contra las que la vacuna es capaz de producir inmunidad de linfocitos T. Una vacuna con dianas múltiples reducirá también el riesgo de una nueva formación de tumores mediante tratamiento con variantes de escape a partir de un tumor primario.

La enzima telomerasa ha sido recientemente el foco de atención por su supuesto papel en la prevención del envejecimiento celular. La telomerasa es una polimerasa de ADN dependiente de ARN que sintetiza repeticiones de ADN telomérico, empleando un molde de ARN que existe como una subunidad de la holoenzima telomerasa. Las repeticiones de ADN sintetizadas por la enzima se incorporan en los telómeros que son estructuras especializadas de ADN-proteína encontradas en los extremos de las moléculas de ADN lineales, que caracterizan cada cromosoma. La telomerasa se identificó en primer lugar en el ciliado *Tetrahymena* (Greider y Blackburn, 1985, *Cell* 43, 405-413). Una secuencia de la subunidad catalítica de telomerasa humana ha sido identificó recientemente por Meyerson y col. (1990, *Cell* 1197, 785-795) y Nakamura y col. (1997, *Science* 277, 955-959), los cuales denominaron respectivamente el gen hEST2 y hTRT. Además, también se han identificado otras tres proteínas que están asociadas con la actividad telomerasa: p80 y p95 de *Tetrahymena* (Collins y col., 1995, *Cell* 81, 677-686) y TP1/TLP1, que es el homólogo de mamífero de *Tetrahymena* p80 (Harrington y col., 1997, *Science* 275, 973-977; Nakayama y col., 1977, *Cell* 88, 875-884).

La telomerasa no se expresa en la mayoría de las células normales en el cuerpo. La mayoría de las estirpes celulares somáticas en seres humanos no muestran actividad telomerasa detectable, pero se ha detectado actividad telomerasa en la línea germinal y en ciertos compartimentos de células madre, que son sitios de división celular activa (Harley y

col., 1994, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59, 307-315; Kim y col., 1994, *Science* 266, 2011-2015; Broccoli y col., 1995, *PNAS USA* 92, 9082; Counter y col. 1995, *Blood* 85, 2315-2320; Hiyama y col., 1995, *J. Immunol.* 155, 3711-3715). Los telómeros de la mayoría de los tipos de células somáticas humanas se acortan al avanzar la edad del organismo, lo que es compatible con la falta de actividad telomerasa en estas células. Células humanas cultivadas también muestran acortamiento de los telómeros. El acortamiento de los telómeros continúa en células humanas cultivadas que se han transformado, hasta que los telómeros se han acortado decisivamente. En ese punto, denominado el punto de crisis, se han observado niveles significativos de muerte celular e inestabilidad cariotípica.

Células inmortales que han adquirido la capacidad de crecer indefinidamente en cultivo, emergen con frecuencias raras de poblaciones en crisis. Estas células inmortales tienen altos niveles de actividad telomerasa y telómeros estables. La actividad telomerasa también se detecta fácilmente en la gran mayoría de las muestras de tumores humanos analizados hasta la fecha (Kim y col., 1994, *Science* 266, 2011-2015) que incluyen carcinoma de ovario (Counter y col., 1994, *PNAS USA* 91, 2900-2904). Una revisión extensa la proporcionan Shay y Bachetti (1997, *Eur. J. Cancer* 33, 787-791). Por tanto, la activación de la telomerasa puede superar las barreras de la división celular continua, impuestas por la longitud del telómero. Las células que superan los mecanismos normales de senescencia deben hacer así al estabilizar la longitud del telómero, probablemente debido a la actividad de la telomerasa.

Los virus implicados en el desarrollo del cáncer humano, tales como el virus Epstein Barr (EBV, relacionado con cáncer de linfocitos B y carcinomas nasofaríngeos) y el papilomavirus humano (HPV 16 y 18, relacionados con carcinomas cervicales) se conocen desde hace tiempo por tener la capacidad de inmortalizar células humanas. Ahora se ha demostrado que la inducción de la actividad telomerasa es el elemento clave en este proceso (Klingelutz y col., 1996, *Nature* 380, 79-82).

La telomerasa es por ello una diana potencial para la terapia contra el cáncer. Por tanto, se han propuesto inhibidores de la telomerasa como una nueva clase de fármacos contra el cáncer (revisado en Sharma y col., 1997, *Ann. Oncol.* 8 (11), 1063-1074; Axelrod, 1996, *Nature Med* 2(2), 158-159; Huminiecki, 1996, *Acta Biochim Pol.* 43(3), 531-538). Se ha sugerido que la identificación de una subunidad catalítica de la telomerasa humana podría proporcionar un reactivo bioquímico para identificar tales fármacos (Meyerson y col., 1990, *Cell* 1197, 785-796). También se ha sugerido que la telomerasa sea un marcador de diagnóstico o de pronóstico del cáncer (Soria y Rixe, 1997, *Bull. Cancer* 84(10), 963-970; Dahse y col., 1997, *Clin. Chem.* 43(5), 708-714).

Según nuestro conocimiento, sin embargo, nadie ha sugerido previamente que la telomerasa pueda funcionar como una diana útil para la terapia mediada por linfocitos T, o que los péptidos o proteínas de la telomerasa se puedan utilizar para el tratamiento o la profilaxis del cáncer.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un péptido para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, consistiendo el péptido en una secuencia EARPA LLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNL RKT VVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), comprendiendo el tratamiento o la profilaxis generar una respuesta de los linfocitos T, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNL RKT VVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un ácido nucleico para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, en el que el ácido nucleico es capaz de codificar un péptido que consiste en una secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNL RKT VVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), comprendiendo el tratamiento o la profilaxis generar una respuesta de los linfocitos T, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNL RKT VVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para generar linfocitos T capaces de reconocer y destruir células tumorales en un mamífero, en donde el método comprende cultivar una muestra de linfocitos T tomada de un mamífero en presencia de un péptido, con una cantidad suficiente para generar linfocitos T específicos de telomerasa, en donde el péptido consiste en una secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNL RKT VVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), en donde los linfocitos T específicos de la telomerasa generan una respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNL RKT VVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, con al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después de ser procesado por una célula presentadora de antígenos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de una combinación de un péptido de la telomerasa y un péptido capaz de inducir una respuesta de linfocitos T contra una proteína o un péptido de un oncogén o de un supresor tumoral mutante, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis

ES 2 200 526 T5

del cáncer, en donde el péptido de la telomerasa consiste en una secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), y el tratamiento o la profilaxis comprende generar una respuesta de los linfocitos T, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después de ser procesado por una célula presentadora de antígenos.

En esta memoria se describe una proteína o un péptido de la telomerasa para uso en el tratamiento o la profilaxis del cáncer.

También se describe un ácido nucleico para uso en el tratamiento o la profilaxis del cáncer, siendo capaz el ácido nucleico de codificar una proteína o un péptido de la telomerasa, tal y como se ha descrito anteriormente.

También se describe una composición farmacéutica que comprende al menos una proteína o un péptido de la telomerasa o un ácido nucleico descrito anteriormente y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en esta memoria la preparación de una composición farmacéutica tal y como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el método mezclar al menos una proteína o un péptido de la telomerasa o un ácido nucleico tal y como se ha descrito anteriormente, con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se describe una composición farmacéutica que comprende una combinación de al menos una proteína o un péptido de la telomerasa tal y como se ha descrito anteriormente, y al menos un péptido capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T contra una proteína o un péptido de un oncogén o de un supresor tumoral mutante, junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en esta memoria un método para la preparación de una composición farmacéutica tal y como se ha descrito anteriormente, comprendiendo el método mezclar al menos una proteína o un péptido de la telomerasa descrito anteriormente, con al menos un péptido capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T contra una proteína o un péptido de oncogén o supresor mutante de tumores, y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

También se describe en esta memoria el uso, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, de una proteína o un péptido de la telomerasa o un ácido nucleico capaz de codificar una proteína o un péptido de la telomerasa.

También se describe un método para generar linfocitos T capaces de reconocer y destruir células tumorales en un mamífero, que comprende tomar una muestra de linfocitos T de un mamífero, y cultivar la muestra de linfocitos T en presencia de proteína o péptido de la telomerasa en una cantidad suficiente para generar linfocitos T específicos de la proteína o el péptido de la telomerasa.

La invención se describe más particularmente, sólo a modo de ejemplo, a continuación.

En esta memoria descriptiva, las denominaciones A2, A1, A3 y B7 indican péptidos que son susceptibles de ser presentados por HLA-A2, HLA-A1, HLA-A3 y HLA-B7, respectivamente.

Proporcionamos un péptido de la telomerasa para uso en un método de tratamiento o de profilaxis del cáncer que consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. El péptido genera una respuesta de los linfocitos T contra la telomerasa, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAK FLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos. El péptido puede ser para uso en un método que comprende administrar a un mamífero, preferentemente un ser humano que padece o que es probable que padezca cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína o el péptido de la telomerasa, de modo que se induce una respuesta de los linfocitos T contra la telomerasa en el mamífero.

Los linfocitos T específicos de la telomerasa se pueden utilizar para dirigirse a células que expresan telomerasa. Por tanto, puesto que la mayoría de las células de un organismo no expresan telomerasa, no estarán afectadas. Sin embargo, las células tumorales que expresan telomerasa serán dianas y serán destruidas. Como la actividad telomerasa se ha detectado en la mayoría de los cánceres identificados hasta ahora, esperamos que nuestros materiales y métodos tengan una amplia utilidad.

Los cánceres que son susceptibles de tratamiento incluyen, pero no están limitados a cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colo-rectal, cáncer de pulmón, melanoma maligno, leucemias, linfomas, cáncer de ovario, cáncer cervical y carcinomas del conducto biliar.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término telomerasa se refiere a una enzima ribonucleoproteica que tiene actividad de elongación del telómero. La proteína de la telomerasa, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a cualquier componente proteico de la telomerasa, incluyendo cualquier subunidad que tiene actividad catalítica.

ES 2 200 526 T5

Preferentemente, la proteína de la telomerasa es una proteína de la telomerasa de mamíferos y más preferentemente una proteína de la telomerasa humana. La proteína de la telomerasa humana es preferentemente la subunidad catalítica de la telomerasa identificada como hTRT por Nakamura y col. (1997, *Science* 277, 955-959) y hEST2 por Meyerson y col. (1990, *Cell* 1197, 785-795), cuyas secuencias de ADNc están depositadas con los números de orden de GenBank AF015950 y AF018167, respectivamente.

El péptido de la telomerasa se escoge de modo que genera una respuesta de los linfocitos T, dirigida contra la proteína de la telomerasa (o contra la proteína de la telomerasa a partir de la cual se obtiene el péptido de la telomerasa). En particular, la respuesta de los linfocitos T se genera de modo que es una respuesta producida para el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPIVNMDYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos. En realizaciones preferidas, la respuesta inducida de los linfocitos T es una respuesta de linfocitos T citotóxicos. La respuesta de los linfocitos T citotóxicos puede ser una respuesta de linfocitos T CD4+ o puede ser una respuesta de linfocitos T CD8+. En cualquier caso, el péptido debe ser capaz de ser presentado como un complejo con una proteína del MHC de clase I o de clase II en la superficie de células tumorales o de células presentadoras de antígenos, teniendo lugar con antelación el procesamiento del antígeno, si fuera necesario.

El péptido de la telomerasa consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9 o 10.

Péptidos adecuados que se pueden utilizar en los métodos y en las composiciones descritas en esta memoria, consisten en la secuencia de SEQ ID NO: 2, 3, 4, 9 o 10. Aparte de estas secuencias, los péptidos descritos en las Tablas 1 y 2 no forman parte de la invención.

Los péptidos descritos en esta memoria son particularmente adecuados para el uso en una vacuna capaz de producir de forma segura inmunidad con linfocitos T CD4+ o CD8+:

- a) los péptidos se producen sintéticamente y, por tanto, no incluyen genes cancerígenos transformantes ni otros sitios o materiales que puedan producir efectos perjudiciales,
- b) los péptidos se pueden utilizar aislados para inducir la inmunidad celular,
- c) los péptidos se pueden dirigir a un tipo particular de respuesta de linfocitos T, sin los efectos secundarios de otras respuestas indeseadas.

Los péptidos de la telomerasa descritos en esta memoria se pueden administrar en una cantidad en el intervalo de 1 microgramo (1 μ g) hasta 1 gramo (1 g) a un paciente o individuo humano promedio para ser vacunado. Se prefiere el uso de una dosis menor en el intervalo de 1 microgramo (1 μ g) a 1 miligramo (1 mg) para cada administración.

En realizaciones preferidas, el péptido de la telomerasa se proporciona al paciente en forma de una composición farmacéutica. El péptido de la telomerasa se puede administrar como una mezcla de proteínas o una mezcla de proteínas y péptidos o una mezcla de péptidos. La composición farmacéutica puede incluir, además, los aditivos, diluyentes, estabilizantes o similares usuales, tal y como se conocen en la técnica.

También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una o varios péptidos de la telomerasa. La mezcla de péptidos puede ser una cualquiera de las siguientes:

- (a) una mezcla de péptidos que tienen secuencias diferentes, por ejemplo, que se corresponden con diferentes partes de una secuencia proteica de la telomerasa;
- (b) una mezcla de péptidos que tienen secuencias solapantes, pero adecuadas para ajustarse a diferentes alelos del HLA;
- (c) una mezcla de ambas mezclas (a) y (b);
- (d) una mezcla de varias mezclas (a);
- (e) una mezcla de varias mezclas (b);
- (f) una mezcla de varias mezclas (a) y varias mezclas (b).

La composición farmacéutica se puede preparar mezclando la(s) proteína(s) o péptido(s) de la telomerasa con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica también puede incluir al menos un péptido capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T contra una proteína o un péptido de un oncogén o de un supresor tumoral mutante. Alternativamente, los péptidos de la telomerasa se pueden administrar simultáneamente o en una secuencia opcional con estos péptidos. Ejemplos de proteínas de oncogenes son las proteínas p21-ras, H-ras, K-ras y N-ras, abl, gip, gsp, ret y trk. Preferen-

temente, la proteína o el péptido del oncogén es una proteína o un péptido p21-ras, por ejemplo, los péptidos p21-ras descritos en el documento de Solicitud de Patente Internacional WO92/14756. Las proteínas de supresores tumorales incluyen p53 y Rb (retinoblastoma). Una composición farmacéutica tal se puede preparar mezclando el(los) péptido(s) de la telomerasa con las proteínas o los péptidos de supresores de tumores mutantes o de oncogenes, junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término mutante se refiere a una secuencia de tipo silvestre que tiene una o varias de las siguientes mutaciones: mutación puntual (transición o transversión), delección, inserción, duplicación, translocación o inversión. La expresión composición farmacéutica, no sólo incluye una composición utilizable en el tratamiento de pacientes con cáncer, sino también incluye composiciones útiles en relación con la profilaxis, es decir, composiciones de vacunas.

Los péptidos de la telomerasa se administran a un ser humano que necesita dicho tratamiento o una profilaxis. La administración puede tener lugar una o varias veces de forma adecuada para establecer y/o mantener la inmunidad deseada de los linfocitos T. Los péptidos se pueden administrar tanto simultánea como separadamente, junto con compuestos tales como citoquinas y/o factores de crecimiento, es decir, interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-12 (IL-12), factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) o similares, para reforzar la respuesta inmune, tal y como se conoce en la técnica. Los péptidos de la telomerasa se pueden emplear en una vacuna o en una composición terapéutica de forma aislada o en combinación con otros materiales. Por ejemplo, el péptido o los péptidos se pueden proporcionar en forma de un conjugado de lipopéptido que es conocido, para inducir una respuesta de alta afinidad de los linfocitos T citotóxicos (Deres, 1989, *Nature* 342).

Los péptidos mencionados anteriormente como posibles constituyentes de la composición farmacéutica, se pueden proporcionar en forma de ácido nucleico que codifica el péptido particular. Por tanto, la composición farmacéutica puede consistir sólo en péptido o estar en combinación con ácido nucleico, o puede consistir en mezclas de ácidos nucleicos.

Los péptidos de la telomerasa se pueden administrar a un individuo en forma de vacunas de ADN. El ADN que codifica el péptido de la telomerasa puede estar en forma de ADN de plásmido clonado o de oligonucleótido sintético. El ADN se puede suministrar junto con citoquinas, tales como IL-2 y/o otras moléculas co-estimuladoras. Las citoquinas y/o las moléculas co-estimuladoras se pueden suministrar ellas mismas en forma de ADN de plásmido o de oligonucleótido.

La respuesta a una vacuna de ADN se ha demostrado que se incrementa en presencia de secuencias de ADN inmunoestimuladoras (ISS). Estas pueden estar en forma de motivos hexaméricos que contienen CpG metilada, de acuerdo con la fórmula: 5'-purina-purina-CG-pirimidina-pirimidina-3'. Nuestras vacunas de ADN pueden incorporar por ello éstas u otras ISS, en el ADN que codifica el péptido de la telomerasa, en el ADN que codifica la citoquina u otras moléculas co-estimuladoras o en ambas. Una revisión de las ventajas de la vacunación con ADN la proporcionan Tighe y col. (1998, *Immunology Today*, 19(2), 89-97).

Describimos un péptido para uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, comprendiendo el uso producir respuestas de linfocitos T, mediante la estimulación *in vivo* o *ex vivo* con el péptido de la telomerasa. El péptido de la telomerasa también se puede utilizar en un método de vacunación de un paciente para obtener resistencia contra el cáncer. Un método adecuado de vacunación comprende producir respuestas de los linfocitos T estimulando *in vivo* o *ex vivo* con un péptido de la telomerasa. También describimos un péptido para uso en un método para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, que comprende administrar a un mamífero que padece cáncer o que es susceptible de padecer cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de la telomerasa, de modo que se induce una respuesta de los linfocitos T contra la telomerasa en el mamífero. En particular, la respuesta de los linfocitos T es contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVIVNMDYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después de procesamiento por una célula presentadora de antígenos.

Los péptidos descritos en esta memoria se pueden producir mediante procesos convencionales, por ejemplo, mediante los distintos métodos de síntesis peptídicas conocidos en la técnica. La escisión enzimática también se puede utilizar. Los péptidos de la telomerasa también pueden estar en forma de péptidos expresados recombinantes.

Los ácidos nucleicos que codifican el péptido de la telomerasa se pueden preparar mediante síntesis de oligonucleótidos. Esto se puede realizar mediante cualquiera de los diversos métodos asequibles en la técnica. Un ácido nucleico que codifica la proteína de la telomerasa se puede clonar a partir de una genoteca genómica o de ADNc, empleando un escrutinio convencional de la genoteca. La sonda puede corresponder a una parte de cualquier secuencia de un gen conocido de la telomerasa. Alternativamente, el ácido nucleico se puede obtener empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El ácido nucleico es preferentemente ADN y se puede clonar de forma adecuada en un vector. Los subclones se pueden generar empleando enzimas de restricción adecuadas. El ADN clonado o subclonado se puede propagar en un hospedador adecuado, por ejemplo un hospedador bacteriano. Alternativamente, el hospedador puede ser un organismo eucarionte, tal como levadura o baculovirus. Los péptidos de la telomerasa se pueden producir mediante expresión en un hospedador adecuado. En este caso, el ADN se clona en un vector de expresión. Está disponible una variedad de equipos de reactivos comerciales para la expresión. Los métodos descritos en Maniatis y col.

(1991, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Harlow y Lane (1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press) se pueden utilizar para estos fines.

5

Métodos experimentales

Los péptidos se sintetizaron empleando síntesis de péptidos en fase sólida con flujo continuo. Se emplearon aminoácidos N-a-Fmoc con una protección adecuada de la cadena lateral. Los aminoácidos Fmoc se activaron para el acoplamiento como ésteres de pentafluorofenilo o empleando activación con TBTU o diisopropil-carbodiimida antes del acoplamiento. Se empleó 20% de piperidina en DMF para la separación selectiva del Fmoc después de cada acoplamiento. La escisión de la resina y la separación final de la protección de la cadena lateral se realizó con TFA al 95% que contenía antioxidantes adecuados. Los péptidos se purificaron y se analizaron mediante HPLC de fase inversa (C18). La identidad de los péptidos se confirmó empleando espectroscopia de masa con electro-pulverización (Finnigan mat SSQ710).

Para que una vacuna contra el cáncer y los métodos para una terapia específica del cáncer basados en la inmunidad de los linfocitos T sean eficaces, tienen que cumplir tres condiciones:

- (a) el péptido tiene al menos 8 aminoácidos de longitud y es un fragmento de una proteína de la telomerasa y
- (b) el péptido es capaz de inducir respuestas de los linfocitos T, tanto con su longitud completa como después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos.

Los siguientes métodos experimentales se pueden emplear para determinar si se cumplen las tres condiciones en un péptido determinado. Primero, se debe determinar si el péptido en particular da origen a respuestas inmunes de linfocitos T *in vitro*. También será necesario establecer si los péptidos sintéticos se corresponden, o son capaces de alcanzar después del procesamiento, con fragmentos peptídicos correspondientes a fragmentos peptídicos presentes en células cancerígenas que albergan telomerasa o en células presentadoras de antígenos que han procesado la telomerasa presente en la naturaleza. La especificidad de los linfocitos T inducidos *in vivo* por la vacunación con el péptido de la telomerasa, también se puede determinar.

Es necesario determinar si las líneas celulares tumorales que expresan telomerasa pueden ser destruidas por clones de linfocitos T, obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes con carcinoma, después de la vacunación con el péptido de la telomerasa. Los clones de linfocitos T se obtienen después de clonar linfoblastos T presentes en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente con carcinoma, después de la vacunación con péptido de la telomerasa. El protocolo de la vacunación con el péptido incluye varias inyecciones intracutáneas *in vivo* de péptidos, con GM-CSF u otro coadyuvante empleado normalmente. La clonación de linfocitos T se realiza extendiendo en placas Terasaki linfoblastos T que responden, con 5 linfoblastos por pocillo. Cada pocillo contiene 2×10^4 PBMC autólogas e irradiadas (30 Gly) como células alimentadoras. Las células se multiplican con el péptido de la telomerasa candidato 25 mM y 5 U/ml de interleuquina-2 recombinante (rIL-2) (Amersham, Aylesbury, UK), en un volumen total de 20 ml. Después de 9 días, los clones de los linfocitos T se transfieren sobre placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA) con 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Wellcome, Dartford, UK), 5 U/ml de rIL-2 y PBMC alogénicas e irradiadas (30 Gly) (2×10^5) por pocillo como células alimentadoras. Los clones en crecimiento se expandieron adicionalmente en placas de 24 pocillos con PHA/rIL-2 y 1×10^6 PBMV alogénicas e irradiadas como células alimentadoras y se escrutaron en busca de especificidad de péptido después de 4 a 7 días.

Los clones de los linfocitos T se seleccionaron para una posterior caracterización. El fenotipo de la superficie celular del clon de linfocito T se determina para averiguar si el clon del linfocito T es CD4+ o CD8+. El clon del linfocito T se incuba con dianas de células tumorales autólogas con diferentes proporciones de efector a diana, para determinar si tiene lugar la lisis de las células tumorales. La lisis indica que el linfocito T tiene reactividad dirigida contra un antígeno derivado de tumor, por ejemplo, proteína de la telomerasa.

Para verificar que el antígeno reconocido está asociado con la proteína de la telomerasa y para identificar la molécula del HLA de clase I o de clase II que presenta el péptido putativo de la telomerasa al clon de linfocito T, líneas de células tumorales diferentes que expresan telomerasa, que son portadoras de una o varias moléculas del HLA de clase I o II, en común con las del paciente, se emplean como células diana en ensayos de citotoxicidad. Las células diana se marcan con ^{51}Cr o ^3H -timidina ($9,25 \times 10^4$ Bq/ml) durante una noche, se lavan una vez y se extienden en placas con 5000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Los linfocitos T se añaden con distintas proporciones de efector-diana y las placas se incuban durante 4 horas a 37°C y luego se cosechan antes de contar en un contador de centelleo líquido (Packard Topcount). Por ejemplo, se puede emplear como células diana, la línea de células de carcinoma de vejiga T24 (12Val⁺, HLA-A1⁺, B35⁺), la línea de células de melanoma FMEX (12Val⁺, HLA-A2⁺, B35⁺) y la línea de células de carcinoma de colon SW 480 (12Val⁺, HLA-A2⁺, B8⁺) o cualquier otra línea celular tumoral positiva para la telomerasa. Una línea celular adecuada que no expresa la proteína de la telomerasa se puede utilizar como testigo y no se debe lisar. La lisis de una línea celular particular indica que el clon de linfocitos T que se está sometiendo a ensayo, reconoce un epítipo de la telomerasa procesada endógenamente en el contexto del subtipo del HLA de clase I o clase II expresado por esta línea celular.

ES 2 200 526 T5

La restricción del HLA de clase I o de clase II de un clon de linfocito T se puede determinar mediante experimentos de bloqueo. Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales contra antígenos de la clase I del HLA, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal panreactivo W6/32 del HLA de clase I, o contra antígenos de la clase II, por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos del HLA de clase II DR, DQ y DP (B8/11, SPV-L3 y B7/21). La actividad del clon del linfocito T contra la línea celular tumoral autóloga se evalúa empleando anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas del HLA de clase I y de clase II, con una concentración final de 10 mg/ml. Los ensayos se llevan a cabo tal y como se ha descrito arriba, por triplicado en placas de 96 pocillos y las células diana se incuban previamente durante 30 minutos a 37°C antes de añadir los linfocitos T.

La especificidad fina de un clon de linfocito T se puede determinar empleando experimentos de someter a impulsos con péptidos. Para identificar el péptido de la telomerasa que está siendo reconocido realmente por un clon de linfocitos T, se somete a ensayo un panel de péptidos noámeros. Se marca con ⁵¹Cr o ³H-timidina, los fibroblastos autólogos eluidos con un ácido suave, se extienden en placas con 2500 células por pocillo, en placas de 96 pocillos y se someten a impulsos con los péptidos a una concentración de 1 mM, junto con microglobulina b2 (2,5 mg/ml) en un incubador con CO₂ al 5% a 37°C, antes de añadir los linfocitos T. Los ensayos se llevan a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos y se incuban durante 4 horas con una proporción de efector a diana de 5 a 1. Los testigos pueden incluir un clon de linfocito T cultivado de forma aislada, cultivado con APC en ausencia de péptidos o con un péptido asociado con melanoma que no viene al caso, el péptido MART-1/Melan-A.

También se puede utilizar un protocolo alternativo para determinar la especificidad fina de un clon de linfocito T. En este protocolo alternativo, la línea celular T2 deficiente para TAP se emplea como células presentadoras de antígenos. Esta línea celular expresa sólo pequeñas cantidades de antígeno HLA-A2, pero niveles incrementados de antígenos del HLA de clase I en la superficie celular se pueden inducir añadiendo microglobulina b2. Las células diana marcadas con ³H se incuban con los diferentes péptidos del ensayo y los péptidos testigos, con una concentración de 1 mM, junto con microglobulina b2 (2,5 mg/ml) durante una hora a 37°C. Después de someter a impulsos con péptidos, las células diana se lavan a fondo, se someten a recuento y se extienden en placas con 2500 células por pocillo, en placas de 96 pocillos, antes de añadir los linfocitos T. Las placas se incuban durante 4 horas a 37°C en CO₂ al 5% antes de recogerlas. Los testigos incluyen un clon de linfocito T cultivado de forma aislada o con células diana en ausencia de péptidos. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado en placas de 96 pocillos con una proporción de efector a diana de 20 a 1.

La sensibilidad de un clon de linfocito T hacia un péptido particular identificado anteriormente, también se puede determinar empleando un experimento de dosis-respuesta. Fibroblastos sensibles al péptido se pueden emplear como células diana. Las células diana se someten a impulsos con el péptido particular tal y como se ha descrito anteriormente, para la determinación de especificidad fina, con la excepción de que los péptidos se añaden con diferentes concentraciones antes de añadir los linfocitos T. Los testigos incluyen células diana aisladas y células diana sometidas a impulsos con el péptido asociado a melanoma irrelevante Melan-A/Mart-1.

Experimentos biológicos/Descripción de las figuras

Figura 1

La Figura 1 (Fig. 1) describe la inducción de los linfocitos T citotóxicos (CTL's) reactivos contra la telomerasa (hTERT) en ratones transgénicos HLA-A2(A2/K^b) inmunizados con péptidos de la telomerasa con identificador de secuencia 9 y 10. Un péptido convencional de la gripe (58-66) con restricción HLA-A2 se empleó como testigo. Tres grupos de cinco ratones recibieron cada uno dos inyecciones subcutáneas semanales de 10⁷ células de bazo singénicas, sometidas a impulsos con péptidos (100 µg/ml). Una semana después de la segunda inyección, se sacrificaron los ratones y se extrajeron sus bazos. Las células del bazo se prepararon mediante técnicas convencionales, y las células de animales sensibilizados se estimularon de nuevo *in vitro*, durante 5 días mediante cocultivo con células de bazo autólogas irradiadas, sometidas a impulsos con péptidos (10 µg/ml), como células presentadoras de antígenos, antes de someter a ensayo la citotoxicidad contra células diana que expresan hTERT (Jurkat) transfectadas con HLA-A2 (A2/K^b) en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr.

Las columnas de la izquierda de la Fig. 1 muestran la destrucción de células Jurkat transfectadas con HLA-A2, sometidas a impulsos con el péptido testigo (gripe 58-66) por linfocitos T obtenidos después de sensibilizar ratones con el péptido con identificador de secuencia 9, con diferentes proporciones de efector a diana. Una citotoxicidad específica superior a la señal de fondo se observó en todas las proporciones de efector a diana. Las columnas en el centro muestran datos similares con linfocitos T obtenidos a partir de ratones sensibilizados con el péptido con identificador de secuencia 10. Una destrucción significativa de las células Jurkat se observó únicamente cuando los esplenocitos procedentes de ratones sometidos a impulsos con péptido de la telomerasa se emplearon como células efectoras, ya que cuando se emplearon como células efectoras los esplenocitos de ratones sensibilizados con péptido de la gripe, sólo se observó un nivel de señal de fondo de destrucción de células Jurkat, cuando las células diana se sometieron a impulsos con un péptido que no viene al caso (péptido del receptor 1 de la melanocortina, MCIR244), como es evidente por las columnas en la parte derecha de la Fig. 1. Estos resultados demuestran que los péptidos con identificador de secuencia 9 y 10 son inmunogénicos *in vivo* y después de la inmunización pueden producir una respuesta inmune en un animal de sangre caliente, portador de la molécula común HLA-A2 del MHC humano. Este resultado indica que los péptidos con identificador de secuencia nº 9 y 10 también se pueden utilizar como vacuna

ES 2 200 526 T5

5 contra el cáncer en seres humanos portadores de HLA-A2 y otras moléculas del HLA de clase I, capaces de unirse a estos péptidos. Además, estos resultados demuestran que la hTERT expresada por la línea Jurkat de leucemia de linfocitos T, puede ser procesada por la maquinaria proteolítica de la línea celular para conseguir fragmentos peptídicos idénticos o similares a los péptidos con identificador de secuencia 9 y 10. Todas estas observaciones indican que una respuesta inmune obtenida después de la vacunación de pacientes con cáncer o de pacientes con riesgo de desarrollar cáncer con estos péptidos puede dar como resultado una destrucción eficaz de células tumorales que expresan la subunidad hTERT de la telomerasa.

10 La Fig. 1 describe la citotoxicidad de células Jurkat transfectadas con HLA-A2 con células efectoras obtenidas a partir de ratones inmunizados tal y como se indica en la figura. Las células diana se marcaron con ^{51}Cr ($0,1 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ de suspensión celular) durante 1 h a 37°C , se lavaron dos veces y se sometieron a impulsos con péptido ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) durante 1 h a 37°C , antes de lavar. Se sembraron por pocillo dos mil células diana marcadas, sometidas a impulsos con péptido, en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en v, y las células efectoras (desde $2,5 \times 10^4$ hasta 2×10^5) se añadieron a los pocillos. Los cultivos se incubaron durante 4 horas a 37°C y el material sobrenadante se recogió y se sometió a ensayo en un contador gamma. Los resultados en la Fig. 1 se expresan como la citotoxicidad específica calculada según la siguiente fórmula:

$$\text{(cpm liberadas experimentalmente - cpm liberadas espontáneamente)} / (\text{cpm total} - \text{cpm liberadas espontáneamente}) \times 100$$

20

Figura 2

25 La Figura 2 (Fig. 2) muestra los resultados de la estimulación *in vitro* de linfocitos T de sangre periférica, procedentes de un paciente (TT) con cáncer de colon, con péptidos obtenidos de la telomerasa (hTERT) con identificador de secuencia 2, 3, 4 y 7. Los resultados en relación con la SEQ ID NO: 7 sólo se muestran para fines comparativos. El cultivo *in vitro* se realizó del modo siguiente: triplicados de 10^5 células mononucleares se incubaron durante 6 días en medio X-VIVO 10 suplementado con suero humano termoinactivado, reunido al 15%, en un incubador humidificado con CO_2 al 5%. Los péptidos estaban presentes en todo el cultivo con una concentración final de $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ en el medio. Los cultivos sin péptido servían como testigo. Se observó una respuesta proliferativa por encima de los valores de señal de fondo, cuando los linfocitos T se estimulaban con el péptido con identificador de secuencia 4. Estos resultados demuestran que la sangre de un paciente con cáncer contiene linfocitos T circulantes específicos de un péptido derivado de la telomerasa (hTERT). Estos resultados demuestran que la subunidad enzimática de la telomerasa (hTERT) es inmunogénica en seres humanos y puede originar espontáneamente respuestas de linfocitos T específicos de la telomerasa, cuando se expresa en exceso por un tumor en crecimiento en el paciente. Además, un componente de la respuesta específica de la telomerasa en este paciente se dirige contra el péptido con seq. id. no. 4, descrito en esta memoria. Este resultado indica que el péptido con seq. id. no. 4 también se puede utilizar como una vacuna contra el cáncer en seres humanos. La figura describe los resultados de ensayos convencionales proliferativos de linfocitos T, en donde células mononucleares de sangre periférica (10^5) se cultivaban con péptidos tal y como se ha indicado, durante 7 días por triplicado, antes de cosecharlas. Para medir la capacidad proliferativa de los cultivos, se añadió ^3H -timidina ($3,7 \times 10^4 \text{ Bq}/\text{pocillo}$) al cultivo durante una noche antes de cosechar. Los valores se indican en forma de cuentas por minuto (CPM) de los triplicados.

45 Figuras 3 y 4

Las Figuras 3 y 4 (Fig. 3 y Fig. 4) muestran la reactividad de linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) obtenidos a partir de un paciente con cáncer pancreático avanzado. Los linfocitos T se obtuvieron a partir de una biopsia tumoral y se multiplicaron con éxito *in vitro* para establecer una línea de linfocitos T. La línea de linfocitos T era CD3+, CD4+ y CD8-, y se multiplicaba específicamente como respuesta a los péptidos de la telomerasa. Los resultados en la Fig. 3 muestran linfocitos T que reconocen los péptidos con seq. id. no. 2 y 3 cuando se comparan con testigos sólo con medio. Los resultados en la Fig. 4 muestran linfocitos T que reconocen el péptido con seq. id. no. 2. Los TILs se expandieron cocultivando con interleuquina 2 humana recombinante (rIL-2) y se sometieron a ensayo después de 14 días en un ensayo de proliferación convencional empleando péptidos con identificador de secuencia nº 2, 3, 4 y 7. Los resultados en relación con la SEQ ID NO: 7 se muestran sólo para fines comparativos.

60

65

ES 2 200 526 T5

TABLA 1

5	LMSVYVVVEL	FLHWLMSVYVVVELLRSFFYVTE
	ELLRSFFYV	EARPALLTSRLRFIPK
	YVVELLRSF	DGLRPIVNMDYVVGAR
	VVELLRSFF	GVPEYGCVVNLRKVVNF
10	SVYVVELLR	
	VELLRSFFY	
	YVTETTFQK	
15	RLFFYRKSV	
	SIGIRQHLK	
	RPALLTSRL	
20	ALLTSRLRF	
	LLTSRLRFI	
	RPIVNMDYV	
25	LRPIVNMDY	
	YVVGARTFR	
	VVGARTFRR	
	GARTFRREK	
30	ARTFRREKP	
	PPELYFVKV	
	ELYFVKVDV	
35	FVKVDVTGA	
	IPQDRLTEV	
	DRLTEVIAS	
40	RLTEVIASI	
	IPQGSILSTL	
	ILSTLLCSL	
45	LLRLVDDFL	
	RLVDDFLLV	
	VPEYGCVVN	
	VPEYGCVVNL	
50	TLVRGVPEY	
	FLRTLVRGV	
	GVPEYGCVV	
55	VVNLRKTVV	
	GLFPWCGLL	
60		
65		

ES 2 200 526 T5

TABLA 2

5 YAETKHFLY
ISDTASLCY
DTDPRRLVQ
10 AQDPPPELY
LTDLQPYMR
QSDYSSYAR

15 ILAKFLHWL
ELLRSFFYV
LLARCALFV
20 WLCHQAFLL
RLVDDFLLV
RLFFYRKSV
LQLPFHQOV
25 RLGPOGWRL
SLQELTWKM
NVLAFGFAL
30 VLLKTHCPL
FLLVTPHLT
TLTDLQPYM
RLTEVIASL
35 FLDLQVNSL
SLNEASSGL
ILSTLLCSL
40 LLGASVLGL
VLAFGFALL
LQPYMRQFV
LMSVYVVEL
45 RLPQRYWQM
RQESSPWQV
YLPNTVTDA
50 NMRRKLEGV
RLTSRVKAL
LLQAYRFHA
LLDTRTLEV
55 YMRQFVAHL
LLTSRLRFI
CLVCVPWDA
60 LLSSLRPSL

65

ES 2 200 526 T5

TABLA 2 (Continuación)

5	FMCHHAVRI
	LQVNSLQTV
	LVAQCLVCV
	CLKELVARV
10	FLRNTKKFI
	ALPSDFKTI
	VLVHLLARC
	VQSDYSSYA
15	SVWSKLQSI
	KLPGTTLTA
	QLSRKLPGT
20	ELYFVKVDV
	GLLLDIRTL
	WMPGTFRRL
	SLTGARRLV
25	VVIEQSSSL
	LPSEAVQWL
	QAYRFHACV
30	GLFDVFLRF
	KLFGVLRK
	RLREEILAK
	TLVRGVPEY
35	GLPAPGARR
	GLFPWCGLL
	KLTRHRVTY
40	VLPLATFVR
	ELVARVLQR
45	DPRRLVQLL
	FVRACLRRL
	SVREAGVPL
	AGRNMRKRL
50	LARCALFVL
	RPAAEATSL
	LPSDFKTI
	LPSEAVQWL
55	LPGTTLTAL
	RPSFLLSSL
	LPNTVTDAL
60	RPALLTSRL
65	

ES 2 200 526 T5

TABLA 2 (Continuación)

5	RCRAVRSLL MPRAPRCRA
10	GIRRDGLLL VLRKCHSL YMRQFVAHL SLRTAQTQL
15	OMRPLFLEL LLRLVDDFL FVQMPAHGL HASGPRRRL
20	VVIEQSSSL RVISDTASL CVFAAEHRL RVKALFSVL
25	NVLAFGFAL LVARVLQRL FAGIRRDGL HAQCFYGVL
30	RAODPPPEL AYRFHACVL HAKLSLQEL GAKGAAGPL
35	TASLCYSIL APRCRAVRS GARRLVETI AQCPYGVLL
40	HAKTFLRTL EATSLEGAL KAKNAGMSL AQTQLSRKL
45	AGIRRDGLL
50	VLRKCHSI ILKAKNAGM DERRLVQLL GAKGAAGPL
55	FAGIRRDGL GARRRGGSA HAKTFLRTL HAKLSLQEL
60	
65	

ES 2 200 526 T5

TABLA 2 (Continuación)

5	LARCALFVL EHRLREEIL NMRRKLFV
10	CAREKPQGS LTRHRVTYV
15	RRFLRNTKK RRDGLLLRI RREKRAERL
20	RRLVETIFL LRFMCHHAV RRYAVVQKA
25	KRAERLTSK RRKLFVLR RRRGGSASR
30	RRLPRLPQR RRLGPQGWR LRGSGAWGL
35	HREARPALL VRRYAVVQK ARTSIRASL
40	HRVTYVPLL LRSHYREVL MRPLFLELL
45	HRAWRTFVL MRRKLFVLR LRLVDDFLL
50	LRRVGDDVL YRKSVWSKL QRLCERGA
55	K FRALVAQCL SRKLPGTTL LRRIVPPGI
60	RRSPGVGCV RRVGDDVLV VRGCAWLR
65	RR VRSLLRSHY ARTFRREKR SRSLPLPKR IRASLTFNR

ES 2 200 526 T5

TABLA 2 (Continuación)

5	LREEILAKF IRRDGLLLR QRGDPAAFR LRPIVNMDY
10	ARRLVETIF ARPALLTSR LRPSLTGAR
15	LRLKCHSLF FRREKRAER ARGGPPEAF
20	CRAVRSLLR GRTRGPSDR RRRLGCERA
25	LRELSEAEV ARCALFVLV
30	RPAAEATSL DPRRLVQLL RPSFLLSGL
35	LPSEAVQWL RPALLTSRL LPSDFKTIL
40	RPPPAAPSF LPRLPQRYW LPNTVTDAL
45	LPGTTLTAL LAKFLHWLM KAKNAGMSL
50	GSRHNERRF KALFSVLNY SPLRDAVVI
55	RAQDPPPEL MPAHGLFPW
60	AEVRQHREA REAGVPLGL EEATSLEGA
65	LEAAANPAL QETSFLRDA REVLPLATF

ES 2 200 526 T5

TABLA 2 (Continuación)

5	KEQLRPSFL
	REKPQGSVA
	LEVQSDYSS
10	REARPALLT
	EEDTDP RRL
	REEILAKFL
15	CERGAKNVL
	DDVLVHLLA
	GDMENKLFA
20	YERARRPGL
25	
30	
35	
40	
45	
50	
55	
60	
65	

REIVINDICACIONES

1. El uso de un péptido para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, consis-
 5 tiendo el péptido en una secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), comprendiendo el tratamiento o la profilaxis generar una respuesta de linfocitos T, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, de
 10 al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos.

2. El uso de un ácido nucleico para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del
 cáncer, en donde el ácido nucleico es capaz de codificar un péptido que consiste en una secuencia EARPALLTSRLR
 FIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO:
 15 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), comprendiendo el tratamiento o la profilaxis generar una respuesta de linfocitos T, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos.
 20

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tratamiento o la profilaxis comprende administrar a un
 mamífero que padece cáncer o que es susceptible de padecerlo, una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del
 péptido, de modo que se induce una respuesta de los linfocitos T dirigida contra la telomerasa en el mamífero.
 25

4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la respuesta inducida de los linfocitos
 T es una respuesta de linfocitos T citotóxicos.
 30

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el medicamento es una composición
 farmacéutica que comprende el péptido o el ácido nucleico, junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente
 aceptable.
 35

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, en donde el medicamento comprende al
 menos un péptido que consiste en la secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR
 (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV
 (SEQ ID NO: 10) con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
 40

7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el medicamento comprende al menos
 un ácido nucleico que es capaz de codificar un péptido que consiste en la secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID
 NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL
 (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) y un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
 45

8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 a 7, en donde el medicamento comprende el
 péptido que consiste en la secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID
 NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID
 NO: 10) y al menos un péptido capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T dirigida contra una proteína o un
 péptido de un oncogén o de un supresor tumoral mutante, junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente
 aceptable.
 50

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la proteína o el péptido del oncogén es una proteína o un
 péptido p21-ras mutante, o en el que la proteína o el péptido de un supresor tumoral es una proteína o un péptido de
 retinoblastoma o de p53.
 55

10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer se selecciona entre
 cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer colo-rectal, cáncer de pulmón, melanoma maligno,
 leucemias, linfomas, cáncer de ovario, cáncer cervical y carcinomas del conducto biliar.
 60

11. Un método para generar linfocitos T capaces de reconocer y destruir células tumorales en un mamífero, en
 el que el método comprende cultivar una muestra de linfocitos T tomada de un mamífero en presencia de un pép-
 tido, con una cantidad suficiente para generar linfocitos T específicos de la telomerasa, en donde el péptido consis-
 65 te en una secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10), en donde los linfocitos T específicos de la telomerasa generan una respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPVNM DYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento por una célula presentadora de antígenos.
 70

12. Un linfocito T específico de la telomerasa, generado por un método de acuerdo con la reivindicación 11.

ES 2 200 526 T5

13. El uso de una combinación de un péptido de la telomerasa y un péptido capaz de inducir una respuesta de linfocitos T contra una proteína o un péptido de un oncogén o de un supresor tumoral mutante, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, consistiendo el péptido de la telomerasa en la secuencia EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPIVNMDYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) y el tratamiento o la profilaxis comprende generar una respuesta de linfocitos T, siendo la respuesta contra el péptido EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO: 2), DGLRPIVNMDYVVGAR (SEQ ID NO: 3), GVPEYGCVVNLRKTVVNF (SEQ ID NO: 4), ILAKFLHWL (SEQ ID NO:9) o ELLRSFFYV (SEQ ID NO: 10) o un fragmento de los mismos, de al menos 8 aminoácidos de longitud, producible después del procesamiento realizado por una célula presentadora de antígenos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

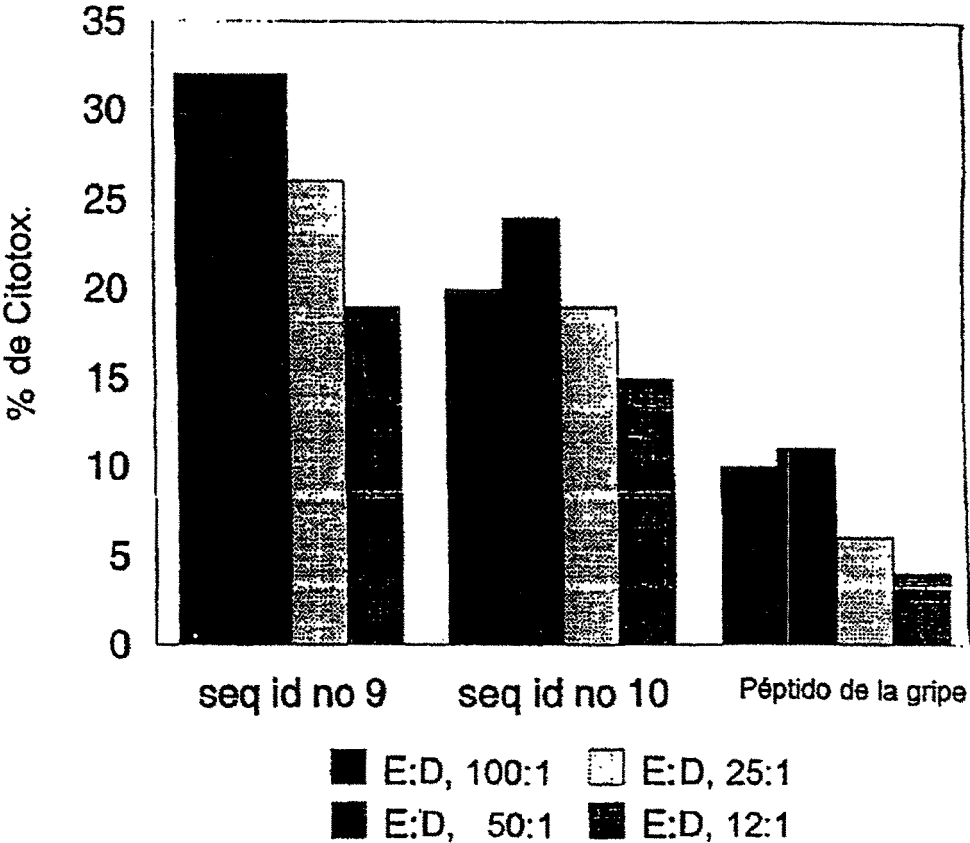


Fig. 1

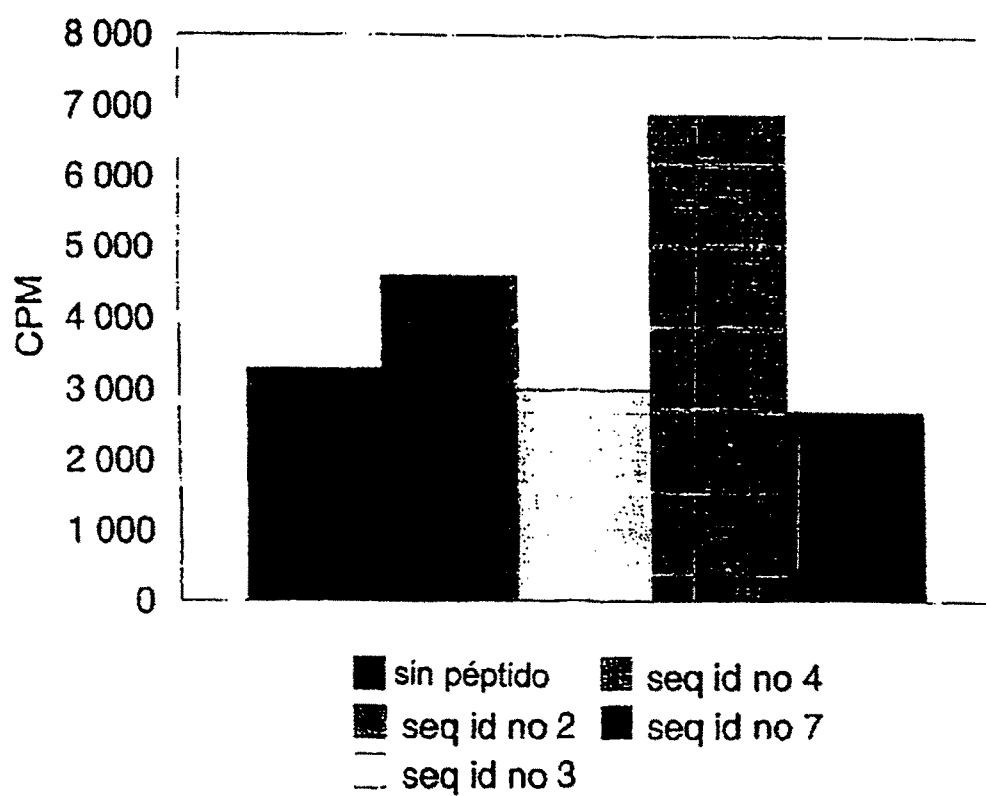


Fig. 2

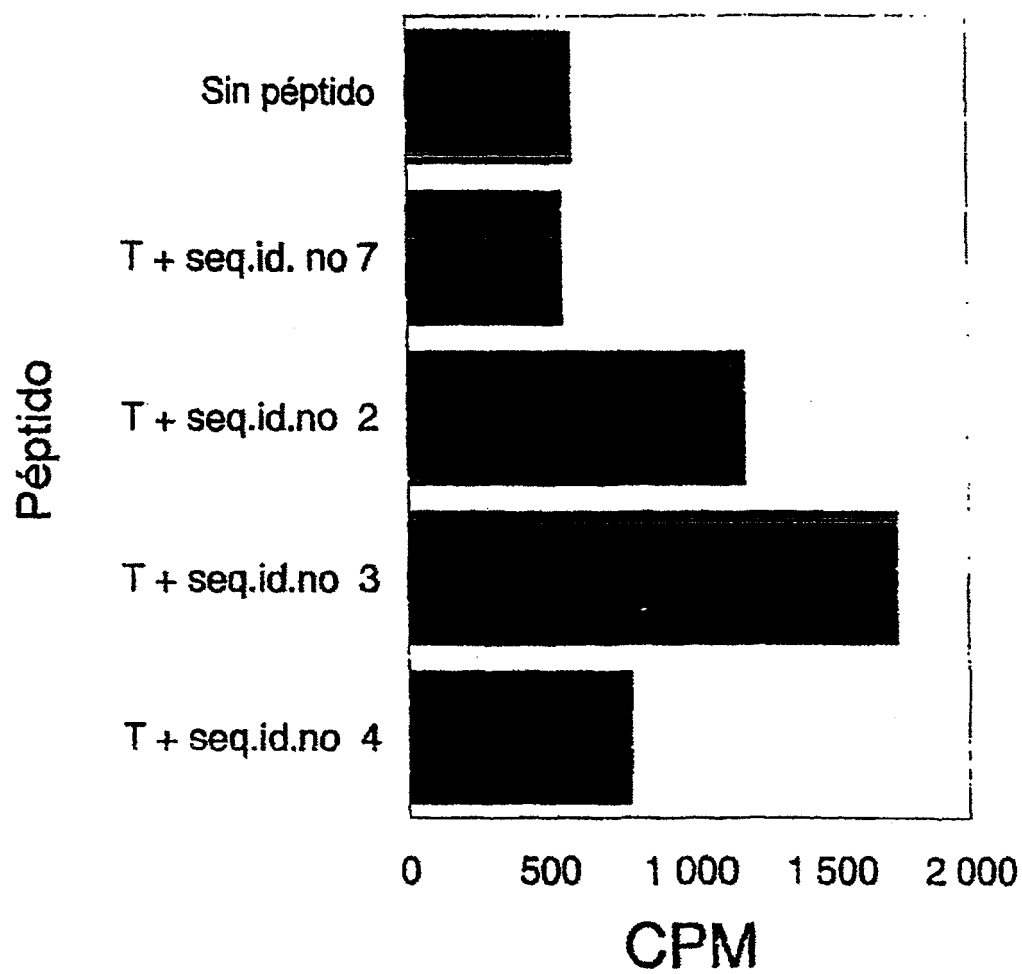


Fig. 3

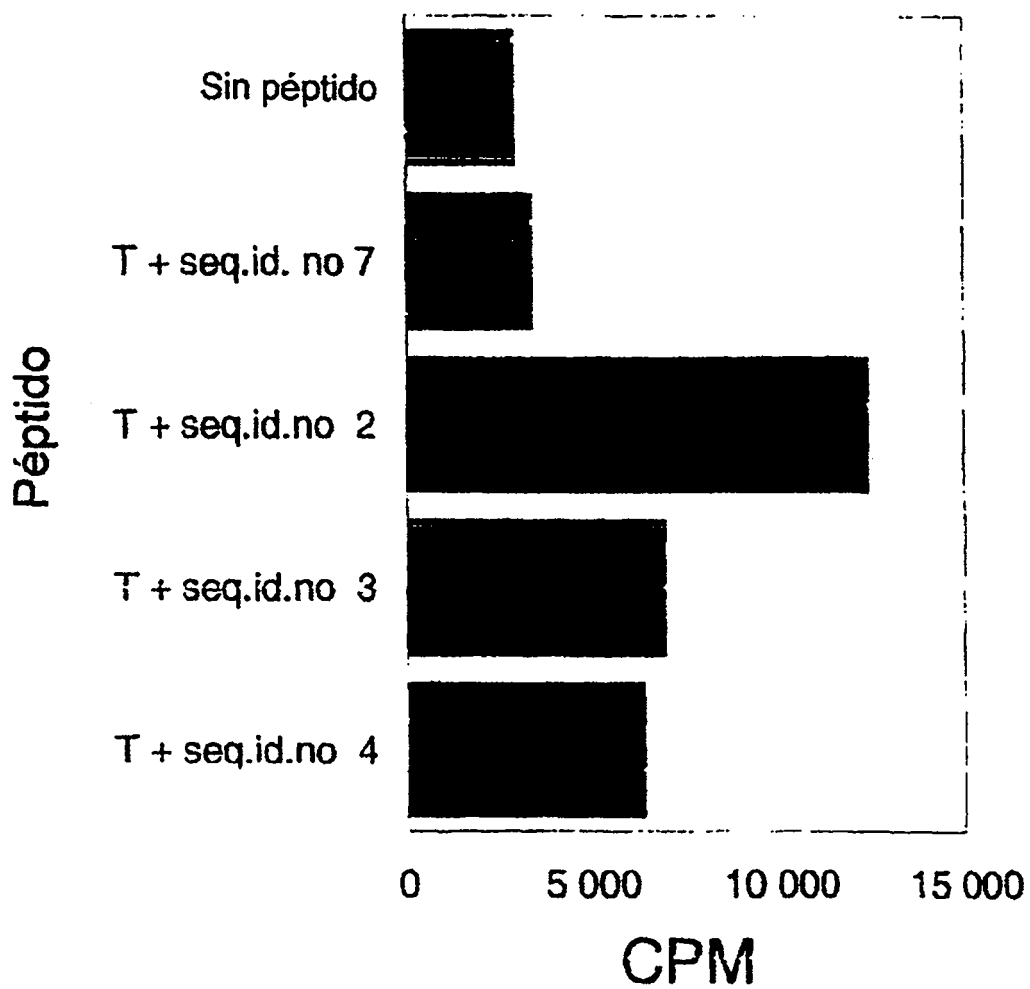


Fig. 4

ES 2 200 526 T5

LISTA DE SECUENCIAS

COMÚN PARA TODAS LAS SECUENCIAS

TIPO DE SECUENCIA: Péptido

UNIDAD DE SECUENCIA: Aminoácido

TOPOLOGÍA: Lineal

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 1

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 22 aminoácidos

F L H W L M S V Y V V E L L R S F F Y V T E

1 5 10 15 20

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 2

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 16 aminoácidos

E A R P A L L T S R L R F I P K

1 5 10 15

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 3

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 16 aminoácidos

D G L R P I V N M D Y V V G A R

1 5 10 15

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 4

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 18 aminoácidos

G V P E Y G C V V N L R K T V V N F

1 5 10 15

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 5

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 23 aminoácidos

K F L H W L M S V Y V V E L L R S F F Y V T E

1 5 10 15 20

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 6

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 17 aminoácidos

K F L H W L M S V Y V V E L L R S

1 5 10 15

ES 2 200 526 T5

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 7

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 18 aminoácidos

5 L M S V Y V V E L L R S F F Y V T E
 1 5 10 15

10

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 9

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

15 I L A K F L H W L
 1 5

20

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 10

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

25 E L L R S F F Y V
 1 5

30

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 11

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

35 L M S V Y V V E L
 1 5

40

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 12

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

45 T S R L R F I P K
 1 5

50

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 13

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

55 L T S R L R F I P
 1 5

60

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 14

LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

65 L L T S R L R F I
 1 5

ES 2 200 526 T5

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 15
LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

5 P A L L T S R L R
1 5

10 IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 16
LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

15 P A L L T S R L R
1 5

20 IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 17
LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

25 R P A L L T S R L
1 5

30 IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 18
LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

35 A R P A L L T S R
1 5

40 IDENTIFICADOR DE SECUENCIA N°: 19
LONGITUD DE LA SECUENCIA: 9 aminoácidos

45 E A R P A L L T S
1 5

50

55

60

65