



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 379**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06015806 .0**

96 Fecha de presentación : **27.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1734049**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

54 Título: **Péptidos asociados a tumor unidos a moléculas MHC.**

30 Prioridad: **29.05.2002 DE 102 25 144**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Immatics Biotechnologies GmbH**
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE

72 Inventor/es: **Weinschenk, Toni;**
Rammensee, Hans-Georg y
Stevanovic, Stefan

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 317 379 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos asociados a tumor unidos a moléculas MHC.

5 La presente invención se refiere a péptidos asociados a tumor con la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I.

Los péptidos de este tipo son utilizados, por ejemplo, en la inmunoterapia de las enfermedades tumorales.

10 La identificación de antígenos asociados a tumores (TAA) mediante componentes del sistema inmune desempeña un papel fundamental en la destrucción de células tumorales por parte del sistema inmune. Este mecanismo se basa en la condición de que entre las células tumorales y las células normales existen diferencias cualitativas o cuantitativas. Para desencadenar una respuesta antitumoral, las células tumorales deben expresar a los antígenos, lo cual provoca una respuesta inmunológica suficiente para la destrucción del tumor.

15 Los linfocitos T citotóxicos que expresan la molécula CD8 (en adelante, CTL) tienen un papel importante en el rechazo a tumores. Para que se desencadene una reacción inmune de este tipo a través de los linfocitos T citotóxicos, deben presentarse proteínas o péptidos foráneos ante los linfocitos T. Los linfocitos T sólo reconocen a los antígenos como fragmentos de péptidos cuando éstos son presentados por moléculas MHC en la superficie de la célula. Estas moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) son receptoras de péptidos que, normalmente, los unen dentro de la célula para transportarlos a la superficie de la célula. Este complejo formado por péptidos y moléculas MHC es reconocido por los linfocitos T. Las moléculas MHC del ser humano también se conocen como “antígenos de leucocito humano” (HLA).

25 Existen dos clases de moléculas MHC: Las moléculas MHC de clase I, que aparecen en la mayoría de células con núcleo, presentan péptidos producidos por degradación proteolítica de proteínas endógenas. Las moléculas MHC de clase II sólo aparecen en células especializadas presentadoras de antígenos (APC) y presentan péptidos de proteínas exógenas que, en el transcurso de la endocitosis, son absorbidos y transformados por las APC. Los complejos formados por péptido y MHC de clase I son reconocidos por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos; los complejos formados por péptido y MHC de clase II son reconocidos por linfocitos T colaboradores CD4.

30 Para que un péptido pueda desencadenar una respuesta celular inmune, debe estar unido a una molécula MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos unidos a moléculas MHC de clase I suelen tener de 8 a 10 residuos y contienen en su secuencia dos residuos conservados (*Anchor*), que interactúan con el surco de unión correspondiente de la molécula MHC.

35 Para que el sistema inmune pueda desencadenar una respuesta efectiva de CTL contra los péptidos derivados de tumor, es necesario que dichos péptidos, además de poder unirse a las moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también sean reconocidos por linfocitos T con receptores específicos de linfocitos T (TCR, *T-cell receptor*).

El objetivo principal para el desarrollo de una vacuna antitumoral es la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumores que son reconocidos por CTL CD8⁺.

45 Los antígenos que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos específicos de tumores o sus epítomos pueden ser moléculas de cualquier clase de proteína como, por ejemplo, encimas, receptores, factores de transcripción, etc. Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son las estructuras específicas de tejidos como, por ejemplo, los antígenos CT (*cancer testis*), expresados en distintos tipos de tumor y en tejido sano de los testículos.

50 Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos de tumores y, por lo tanto, puedan ser aplicadas como tratamiento, deben cumplirse determinadas condiciones: el antígeno debe estar expresado fundamentalmente por células tumorales, no por tejido normal o, si éste lo expresa, debe ser en cantidades inferiores a las de los tumores. En caso de que el antígeno en cuestión no sólo se exprese en un tipo de tumor, sino en varios, también es deseable que lo haga en concentraciones altas. También es esencial la presencia de epítomos en la secuencia de aminoácidos del antígeno, ya que dichos péptidos derivados de un antígeno asociado a un tumor (“péptidos inmunógenos”) desencadenan una respuesta de linfocitos T, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

55 Los antígenos asociados a tumores (TAA) representan, por tanto, el punto de partida para el desarrollo de una vacuna antitumoral. Los métodos para la identificación y caracterización de los TAA se basan en la acción de los CTL ya inducidos en el paciente o en la creación de perfiles de transcripción diferenciados entre tumores y tejidos normales.

60 El hallazgo de genes sobreexpresados en tejidos tumorales o expresados de manera selectiva en dichos tejidos no proporciona, sin embargo, información precisa sobre la acción de los antígenos transcritos por estos genes en la inmunoterapia. La causa de ello es que sólo los péptidos aislados de estos antígenos son aptos para una acción de ese tipo, ya que sólo los epítomos de los antígenos -no todo el antígeno- son capaces de provocar una respuesta de linfocitos T mediante la presentación de MHC. Por eso es importante seleccionar péptidos de proteínas sobreexpresadas o expresadas de manera selectiva, presentados con moléculas MHC y así obtener blancos para el reconocimiento específico de tumores mediante linfocitos T citotóxicos.

ES 2 317 379 T3

Ante estos antecedentes, el objetivo de la presente invención es facilitar al menos una nueva secuencia de aminoácidos para un péptido con la capacidad de unirse a una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I.

5 Este objetivo se alcanza conforme a la presente invención mediante la preparación de un péptido asociado a tumor con una secuencia de aminoácidos que es seleccionada del grupo compuesto por las secuencias SEQ ID n.º 1 hasta SEQ ID n.º 79 en el protocolo de secuencias adjunto, en donde el péptido muestra la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I.

10 De esta forma, se alcanza el objetivo que sirve de base para la presente invención.

Con ello se entiende que los péptidos identificados por el tumor son sintetizados para obtener mayores cantidades y para su aplicación para los fines descritos más abajo o transportados en células para su expresión.

15 Los inventores pudieron aislar e identificar los péptidos mencionados como ligandos específicos de moléculas MHC de clase I a partir de tejido tumoral. Se denominan péptidos "asociados a tumores" a aquellos aislados e identificados a partir de material tumoral. Estos péptidos, que son presentados en tumores auténticos (primarios) están sujetos al procesamiento de antígenos en una célula tumoral.

20 Los ligandos específicos se pueden aplicar en la terapia contra el cáncer; por ejemplo para inducir una respuesta inmune contra células tumorales que expresan los antígenos de los que proceden los péptidos.

Dicha respuesta inmune en forma de una inducción de CTL se puede obtener *in vivo*. Para ello, se administra el péptido por ejemplo en forma de composición farmacéutica a un paciente con una enfermedad tumoral asociada a TAA.

Por otro lado, también se puede desencadenar una respuesta CTL *ex vivo* en un tumor que expresa los antígenos de los que proceden los péptidos. Para ello se incuban las células precursoras de CTL junto con células presentadoras de antígenos y los péptidos. Finalmente, se cultivan los CTL así estimulados y se administran al paciente estos CTL activados.

También existe la posibilidad de cargar *ex vivo* las APC con los péptidos y administrar al paciente estas APC cargadas. El antígeno se expresa en el tejido tumoral del que procede el péptido. Las APC pueden entonces presentar a los CTL el péptido y activarlos.

35 Los péptidos conformes a la invención también se pueden aplicar como reactivos diagnósticos.

De esta forma, con los péptidos se puede saber si en una población de CTL existen CTL dirigidos específicamente contra un péptido o si fueron inducidos por terapia.

40 Además, con los péptidos también se puede comprobar el aumento de linfocitos T precursores que muestran una reactividad contra el péptido definido.

Además, el péptido puede ser utilizado como marcador para seguir el desarrollo de un tumor que expresa el antígeno des que procede el péptido.

En la tabla 1 adjunta se presentan los péptidos identificados. Aparecen clasificados según el tipo de HLA al que se unen. En la tabla también se dan las proteínas de las que proviene el péptido y la posición correspondiente del péptido en la proteína. Se mantienen los nombres en inglés de las proteínas, con el fin de evitar traducciones confusas. También se dan los números de registro de la base de datos Genbank del *National Center for Biotechnology Information* del Instituto Nacional de Salud (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Los inventores pudieron aislar los péptidos (o ligandos) de tumores de células renales de dos pacientes, RCC01 y RCC13. Se aislaron 68 ligandos del tejido tumoral del paciente RCC01 y 13 ligandos del tejido tumoral del paciente RCC13. Dos de los ligandos identificados en ambos pacientes eran idénticos. Éstos eran los péptidos con SEQ ID n.º 1 y 3 (YVDPVITSI del proto-oncogén met [C-Met] y ALLNIKVKL de la queratina 18).

Se identificaron 79 ligandos a partir de los tumores de los pacientes, de los cuales 30 estaban unidos a los subtipos de HLA HLA-A*02, 13 a los subtipos HLA-A*68, 34 a los subtipos HLA-B*18 o HLA-B*44 y 2 a los subtipos HLA*24

Todos los ligandos HLA-A*02 presentan el motivo peptídico específico del alelo: (Leucina/valina, isoleucina, alanina o metionina en la posición 2; leucina/valina, isoleucina o alanina en el C-terminal.

65 Algunos de los ligandos provienen de genes de mantenimiento fuertemente expresados, que en la mayoría de los tejidos son expresados de forma regular, aunque muchos se distinguen por su asociación a tumores.

ES 2 317 379 T3

En el caso del péptido con ID de secuencia n.º YVDPVITSI, se trata, por ejemplo, de un ligando relacionado especialmente con tumores y que procede del proto-oncogén met (c-met) (posición 654-662). Los péptidos con ID de secuencia n.º 2, 22 y 23 proceden de la adipofilina (también llamada “proteína relacionada con la diferenciación adiposa”) y presentan las posiciones 129-137, 62-71 y 349-358 en esta proteína, en la que las dos últimas figuran entre los péptidos presentados por HLA-A*68. En el caso del ligando con ID de secuencia n.º 3, se trata de un ligando que procede de la queratina 18 y allí se encuentra localizado en la posición 365-373.

La mayor parte de los ligandos presentan el aminoácido ácido glutamínico (E) en la posición 2, un residuo conservado-aminoácido del subtipo HLA-B*44. Así se pudieron identificar péptidos procedentes de proteínas que ya en anteriores intentos se identificaron como inmunógenos como, por ejemplo, el péptido con ID de secuencia n.º 5, que procede de la proteína anexina II (posición en la anexina II: 55-63). Esta proteína se presenta como inmunógena con respecto a las moléculas MHC de clase II en pacientes con melanoma (véase Heinzel y col., *The self peptide annexin II [208 - 223] presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells, 2001*, “Cancer Immunol. Immunother.” 49:671-678).

Además, se pudieron identificar algunos péptidos procedentes de proteínas, sobreexpresadas en tejido tumoral. Así, se pudieron identificar fragmentos de Vimentina (EEIAFLKKL, posición 229-237) y Caldesmon (DEAAFLERL, posición 92-100). Young y col. (*Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers, 2001*, “Am. J. Pathol.”, 158:1639-1651) que estas proteínas estaban sobreexpresadas en tejidos de células tumorales renales.

Los inventores pudieron además identificar, entre otros, ligandos procedentes de ets-1 (NEFSLKGVDF, posición 86-95), Alfa-Catenina (NEQDLGIQY, posición 169-177) y Galectina 2 (SEVKFTVTF, posición 80-88).

Además, los inventores aislaron el fragmento YYMIGEQKF (ID de secuencia n.º 79), procedente de la enzima Nicotinamida-N-Metiltransferasa (posición 203-211). Takahashi y col. (*Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification, 2001*, “Proc. Natl. Acad. Sci.” EUA, 98:9754-9749) demostraron que esta enzima se encontraba sobreexpresada en el tejido tumoral de las células renales.

De forma sorprendente, los inventores pudieron mostrar, para uno de los péptidos identificados, linfocitos T citotóxicos específicos en sangre de donantes. De esta forma se da el potencial para desencadenar una respuesta de CTL específica contra los tumores.

Además, los inventores pudieron mostrar con experimentos propios que, mediante la utilización de dos péptidos modelo seleccionados, era posible generar *in vitro* linfocitos T citotóxicos específicos para el péptido con SEQ ID n.º 1 (fragmento del proto-oncogén-c-met o del péptido c-met) o específicos para el péptido con SEQ ID n.º 2 (fragmento de adipofilina o péptido de adipofilina). Con estos CTL se pudieron destruir células tumorales diana, las cuales expresaban las proteínas correspondientes y, además, provenían de distintas líneas celulares tumorales de diferentes pacientes. Los inventores pudieron demostrar, además, que los mencionados CTL también lisaron, por ejemplo, células dendríticas previamente sensibilizadas (cargadas) con los correspondientes péptidos. Con estos experimentos, los inventores demostraron que, con los péptidos conforme a la presente invención como epítomos, linfocitos T humanos pudieron ser activados *in vitro*. Por lo tanto, los inventores demostraron que los CTL obtenidos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un paciente y específicos para un péptido determinado, pudieron destruir células del mismo tipo de tumor *de otro paciente*. Los inventores también demostraron que con estos CTL se pudieron lisar células *de otros tipos de tumor*.

En una forma de realización preferida, los péptidos también se pueden aplicar para la estimulación de una respuesta inmune, presentando los ID de secuencia n.º 1 a n.º 79 y en los que al menos un aminoácido es sustituido por otro aminoácido con propiedades químicas parecidas.

Estos son, con referencia a los correspondientes subtipos de MHC, por ejemplo los aminoácidos de anclaje, que pueden ser sustituidos por aminoácidos con propiedades químicas parecidas. De esta forma, se puede intercambiar, en el caso de péptidos asociados al subtipo MHC HLA-A*02, por ejemplo en la posición 2 la leucina por la isoleucina, la valina o la metionina, y viceversa; y, en el C-terminal, la leucina por la valina, la isoleucina y la alanina, que presentan cadenas laterales no polares.

También es posible utilizar péptidos con ID de secuencia n.º 1 a n.º 79, que presentan, al menos, otro aminoácido en N- y/o C-terminal o en los que se ha borrado, al menos, un aminoácido.

Además, pueden utilizarse péptidos con ID de secuencia n.º 1 a n.º 79, en los que al menos un aminoácido se ha modificado químicamente.

El/los aminoácido(s) cambiante(s) se escoge(n) de tal forma que la variación no influye en la inmunogenicidad del péptido, es decir, que presenta una afinidad de unión a la molécula MHC similar y capacidad de estimulación de los linfocitos T.

Conforme a la presente invención, el péptido puede ser utilizado para el tratamiento de enfermedades tumorales y/o enfermedades adenomatosas.

ES 2 317 379 T3

Entre las enfermedades tumorales que se pueden tratar se encuentran los cánceres de riñón, mama, páncreas, estómago, testículo y piel. La enumeración de enfermedades tumorales es sólo un ejemplo, es decir, no limita el campo de aplicación.

5 Los inventores pudieron demostrar mediante experimentos propios que los péptidos conforme a la invención son adecuados para dicha utilización. Se demostró que CTL generados expresamente, específicos para determinados péptidos, pudieron destruir de forma efectiva y selectiva células tumorales.

10 Para la aplicación de antígenos asociados a tumores en una vacuna tumoral, son posibles varias formas de aplicación. De esta forma, Tighe y col., (1998, *Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint*, "Immunol. Today" 19(2):89-97) describían que el antígeno puede ser administrado como proteína recombinante con los adyuvantes o los vehículos apropiados o como ADNc codificante para el antígeno en vectores plasmídicos. En estos casos, el antígeno debe ser empleado y presentado en el cuerpo del paciente por células presentadoras de antígenos (APC), con el fin de que se desencadene una respuesta inmune.

15 Melief y col. (1996, *Peptide-based cancer vaccines*, "Curr. Opin. Immunol." 8:651-657) muestran otra posibilidad: la utilización de péptidos sintéticos como vacuna.

20 En una forma de realización preferida, el péptido se aplica con adyuvantes o en su forma aislada.

Se puede utilizar como adyuvante, por ejemplo, el factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF).

25 Otros ejemplos de adyuvantes son el hidróxido de aluminio o emulsiones de aceites minerales como, por ejemplo, el adyuvante de Freund, la saponina o los compuestos de silicio.

La utilización de adyuvantes ofrece la ventaja de que la respuesta inmune desencadenada por el péptido se puede reforzar y/o que el péptido se estabiliza.

30 En otra forma de realización, el péptido se aplica unido a una célula presentadora de antígeno.

Esta medida presenta la ventaja de que los péptidos pueden ser presentados al sistema inmune, especialmente a los linfocitos T citotóxicos (CTL). De esta forma, los CTL pueden reconocer a las células tumorales y destruirlas selectivamente. Como células presentadoras de antígenos son apropiadas para dicha aplicación, por ejemplo, las células dendríticas, los monocitos o los linfocitos B.

40 Las células se cargan con los péptidos *ex vivo*, por ejemplo. Por otro lado, también existe la posibilidad de transfectar las células con el ADN codificante de los péptidos o el ARN correspondiente para llevar a la expresión de los péptidos en las células.

Los inventores pudieron mostrar en experimentos propios que es posible cargar células dendríticas (DC) con péptidos específicos y que estas células dendríticas cargadas activan CTL específicas de péptidos. Esto significa que el sistema inmunológico puede ser estimulado para desarrollar CTL contra los tumores, que expresan los péptidos correspondientes.

45 Las células presentadoras de antígenos portadoras del péptido pueden utilizarse para ello de forma directa, o bien ser activadas antes de su aplicación, por ejemplo, con la proteína de choque térmico gp96. Esta proteína de choque térmico induce la expresión de moléculas MHC de clase I y de moléculas coestimulantes como la B7 y estimula además la producción de citocinas. De esta forma, se estimula de forma global el desencadenamiento de respuestas inmunes.

50 En otra forma de realización preferida, los péptidos son utilizados para la marcación de leucocitos, especialmente de linfocitos T.

55 Esta aplicación es ventajosa cuando los péptidos se utilizan para descubrir si en una población de CTL existen CTL dirigidos específicamente contra un péptido.

El péptido también se puede aplicar como marcador en la evaluación de un tratamiento contra una enfermedad tumoral.

60 En inmunizaciones u otros tratamientos también se puede aplicar el péptido para la monitorización. Por lo tanto, el péptido no sólo es útil para el tratamiento, sino también para el diagnóstico.

65 En otra forma de realización preferida, los péptidos se aplican para la preparación de un anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse de manera convencional mediante la inmunización de animales con una inyección de los péptidos y la posterior tinción de la inmunoglobulina.

ES 2 317 379 T3

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por protocolos estándar, como se describe, por ejemplo, en "Methods Enzymol." (1986), 121, *Hybridoma technology and monoclonal antibodies*.

5 En otro de sus aspectos, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene uno o más péptidos.

Esta composición se puede administrar por vía parenteral, como subcutánea, intradérmica o intramuscular, o por vía oral. Para ello, los péptidos son suspendidos o disueltos en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente acuoso. Además, la composición puede contener coadyuvantes como, por ejemplo, amortiguadores, aglutinantes, agentes de acoplamiento, etc.

Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias inmunoestimulantes como, por ejemplo, citocinas. Se puede encontrar una descripción completa de adyuvantes para una composición de este tipo en A. Kibbe, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3ª Ed, 2000, "American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press".

15 El medio puede aplicarse en la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades tumorales y/o adenomatosas.

El medio farmacéutico que contiene al menos uno de los péptidos con ID de secuencia n.º 1 a n.º 79 se administra a un paciente con una enfermedad tumoral a la que se está asociada el péptido o antígeno en cuestión. De esta forma, puede desencadenarse una respuesta inmune específica de tumor en base a CTL específicos de tumor.

La cantidad de péptido o péptidos existente en la composición farmacéutica se da en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ello, los péptidos contenidos en la composición también pueden unirse, al menos, a dos tipos distintos de HLA.

25 En otro de sus aspectos, la presente invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los péptidos con ID de secuencia n.º 1 a n.º 79.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADN o ARN y, asimismo, se pueden aplicar en la inmunoterapia del cáncer. Para ello, el péptido expresado por la molécula de ácidos nucleicos induce una respuesta inmune contra las células tumorales que expresan el péptido.

Conforme a la presente invención, las moléculas de ácidos nucleicos también pueden encontrarse en un vector.

35 Además, la invención se refiere a células que, con ayuda de la molécula de ácidos nucleicos, la cual codifica los péptidos, se modificaron genéticamente de tal forma que producen un péptido con ID de secuencia n.º 1 a n.º 79.

Para ello, las células son transfectadas con el ADN codificante de los péptidos o el ARN correspondiente, de tal forma que los péptidos son expresados en las células. Para dicha aplicación son apropiadas como células presentadoras de antígenos, por ejemplo, las células dendríticas, los monocitos o los linfocitos B.

Se entiende que las características mencionadas con anterioridad y las que se aclararán más adelante no sólo se aplican en la combinación dada, sino también en su forma aislada, sin que por ello se abandone el marco de la presente invención.

45 A continuación se presentan y explican, en los ejemplos siguientes y las figuras incluidas, ejemplos de realización de la invención. Muestran los siguiente:

Fig. 1 la detección de linfocitos T CD8⁺ específicos de queratina 18;

50 Fig. 2a-d la inducción de reacciones de CTL *in vitro* específicas de péptido-c-met (SEQ ID n.º 1), Fig. 2a+b o de péptido-adipofilina (SEQ ID n.º 2), Fig. 2c+d;

Fig. 3a-f las lisis específica de antígeno de las líneas celulares que expresan c-met o adipofilina mediante CTL, inducida por CTL inducidos por péptido-c-met- (SEQ ID n.º 1), Fig. 3a-d, o péptido-adipofilina (SEQ ID n.º 2), Fig. 3e-f;

60 Fig. 4a-c ensayos de inhibición de lisis con células tumorales marcadas con ⁵¹Cr y células T2 no marcadas, sensibilizadas con el péptido, mediante CTL inducidos por el péptido-c-Met (SEQ ID n.º 1), Fig. 4a+b o péptido-adipofilina (SEQ ID n.º 2), Fig. 4c;

Fig. 5a+b la lisis de DC autólogas, transfectadas con ARN del tumor, mediante CTL inducidos por el péptido-c-met (SEQ ID n.º 1), Fig. 5a, o el péptido-adipofilina (SEQ ID n.º 2), Fig. 5b;

65 Fig. 6 los CTL autólogos específicos de adipofilina inducidos *in vitro* reconocen las células tumorales de un paciente con leucemia linfática crónica, pero no células B o células dendríticas autólogas.

Ejemplo 1

1.1. Muestras de pacientes

5 El departamento de urología de la Universidad de Tubinga facilitó dos muestras de pacientes que presentaban tumor de células del riñón confirmado histológicamente. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento preoperatorio. El paciente n.º 1 (en adelante, RCC01) presentaba la siguiente tipificación HLA: HLA-A*02 A*68 B*18 B*44; el paciente n.º 2 (en adelante, RCC13), HLA-A*02 A*24 B*07 B*40.

10 1.2. Aislamiento del péptido ligado a MHC de clase I

Las muestras de tumor sometidas a choque térmico se procesaron como se describe en Schirle, M. y col. (*Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach*, 2000, "European Journal of Immunology", 30:2216-2225). Los péptidos se aislaron con protocolos estándar mediante el uso del anticuerpo monoclonal W6/32, específico para la molécula HLA de clase I, o del anticuerpo monoclonal BB7.2, específico para HLA-A2. Barnstable, C.J. y col. (*Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis*, 1978, "Cell", 14:9-20) y Parham, P. & Brodsky, F.M. (*Partial purification and some properties of BB7.2. A cytotoxic monoclonal antibody with specificity for HLA-A2 and a variant of HLA-A28*, 1981, "Hum. Immunol.", 3:277-299) describen la preparación y uso de estos anticuerpos.

20 1.3. Espectrometría de masas

Los péptidos obtenidos a partir del tejido tumoral del paciente RCC01 se separaron mediante HPLC en fase invertida (sistema SMART, μ RPC C2/C18 SC 2.1/19, Amersham Pharmacia Biotech) y las fracciones obtenidas se analizaron mediante nano espectrometría de masas ESI. Se procedió como se describe en Schirle, M. y col, *Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach*, 2000, "European Journal of Immunology", 30:2216-2225.

Los péptidos obtenidos a partir de tejido tumoral del paciente RCC13 se identificaron, como se ha mencionado, mediante LC MS capilar, pero con ligeras modificaciones: 100 μ l de muestra se cargaron, desmineralizaron y preconcentraron en una precolumna de 300 μ m * 5 mm C18 μ (LC Packings). El disolvente y la muestra se administraron con una bomba de inyección (PHD 2000, Harvard Apparatur, Inc.) con una inyección impermeabilizada de 100 μ l (1710 RNR, Hamilton) a una velocidad de 2 μ l/min. Para la separación de los péptidos se conectó una columna de preconcentración a 75 μ m * 250 mm C-18 (LC Packings). Finalmente, se efectuó un gradiente binario con 25-60% B en 70 min, en el que se redujo la tasa de flujo de 12 μ l/min a, aproximadamente, 300 μ m/min, mediante el uso de una conexión TEE (ZT1C, Valco) y una columna de 300 μ m * 150 mm C-18.

Con el fin de asegurar que el sistema estaba libre de péptidos sobrantes, se realizó una medición de una muestra vacía. Se efectuaron fragmentaciones en línea, como se ha descrito, y los espectros de los fragmentos fueron analizados manualmente. Los análisis de las bases de datos (NCBIInr, EST) se efectuaron con MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

1.4. Identificación de 77 ligandos MHC de clase I de tejido tumoral del paciente RCC01

45 En la tabla 1 adjunta se presentan los ligandos unidos a HLA-A*02, HLA-A*68, HLA-B*18 o HLA-B*44. Los péptidos que estaban asociados a HLA-A*02 presentan el motivo peptídico específico de alelo: así, en la posición 2 había leucina, valina, isoleucina, alanina o metionina y en el C-terminal, leucina, valina isoleucina o alanina. La mayoría de los ligandos procedían de las llamadas proteínas de mantenimiento, aunque también se identificaron ligandos de proteínas asociados a tumores.

50 Los ligandos asociados a HLA-A*68 se identificaron por sus aminoácidos de anclaje treonina, isoleucina, valina, alanina o leucina en la posición 2 y arginina o lisina en el C-terminal. Esto señalaba hacia el subtipo HLA-A*6801. Entre los péptidos asociados a HLA-A*68 se incluyeron dos ligandos de adipofilina, MTSALPEIQK y MAGDIYSVFR, además del ETIPLTAEKL procedente de ciclina D1 asociada a tumor. De la anexina II procedía el péptido TIV-NILTNR. Esta proteína se presenta como inmunógena con respecto a las moléculas MHC de clase II en pacientes con melanoma (véase Heinzel y col., *The self peptide annexin II [208 - 223] presented by dendritic cells sensitizes autologous CD4+ T lymphocytes to recognize melanoma cells*, 2001, "Cancer Immunol. Immunother." 49:671-678). Los otros ligandos presentaban ácido glutamínico en la posición 2, que es un aminoácido de anclaje para el subtipo HLA-B*44. El motivo peptídico del HLA-B*18 todavía no se conoce, por lo que los ligandos de estas dos moléculas HLA-B no se pueden distinguir.

1.5. Ligandos MHC de clase I de tejido tumoral del paciente RCC13

65 También para este tejido tumoral se pudieron identificar los mismos ligandos que se identificaron para el paciente RCC01 y los que procedían del proto-oncogén met (c-met) y la queratina 18. Eran los péptidos con SEQ ID n.º 1 y 3. Además, se pudieron obtener otros ligandos de este tejido tumoral. De esta forma se identificó, por ejemplo, un ligando procedente de la nicotinamida-N-metiltransferasa (NNMT), un gen que en más de 95% de todos los tumores de riñón aparece sobreexpresado. Además, se solaparon otros ligandos con el repertorio de péptidos de RCC01.

ES 2 317 379 T3

1.6. Comprobación de los linfocitos T específicos de queratina 18 en el repertorio normal de linfocitos T CD8⁺

Las células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos se tiñeron con tetrámeros de HLA-A*0201, contruidos con péptidos de adipofilina, queratina 18 o proto-oncogén met (c-met): Para la preparación de los tetrámeros se constituyeron moléculas HLA-A*0201 recombinantes *in vitro* con los péptidos SVASTITGV (SEQ ID n.º 2, adipofilina), ALLNIKVKL (SEQ ID n.º 3, queratina 18) o YVDPVITSI (SEQ ID n.º 1, proto-oncogén met (c-met), se limpiaron con filtrado de gel, se biotinilaron y se mezclaron con estreptavidina para el ligado de los monómeros.

De forma sorprendente, se encontró una población significativa de linfocitos T CD8⁺ específica para la queratina 18 en cuatro de 22 pacientes sanos. En la figura 1 se muestran los resultados del teñido doble mediante representación de puntos, en donde la fila central muestra los resultados del teñido con queratina 18. Entre el 0,02% y el 0,2% de los linfocitos T CD8⁺ era específico para la queratina 18. En la fila inferior de la representación de puntos se puede apreciar que esta unión era específica del tetrámero de queratina 18.

15 Ejemplo 2

Con el fin de analizar la presentación de los péptidos con la SEQ ID n.º 1 (YVDPVITSI) (fragmento peptídico del proto-oncogén c-met) y la SEQ ID n.º 2 (fragmento peptídico de la adipofilina) mediante células tumorales y el reconocimiento del péptido mediante CTL, se indujeron CTL *in vitro* específicos del péptido c-met (péptido con SEQ ID n.º 1) y CTL específicos del péptido de adipofilina (SEQ ID n.º 2). Para ello se utilizaron células dendríticas (DC) procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes HLA-A*02⁺ sanos.

2.1. Obtención de células dendríticas

Las células dendríticas se aislaron de PBMC de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll/Paque (Biochrom, Berlín, Alemania). La sangre heparinizada se obtuvo a partir de preparaciones de capa de leucocitos de donantes sanos del banco de sangre de la Universidad de Tubinga. Las células se colocaron en placas de 6 pocillos (Falcon, Heidelberg, Alemania) (1 x 10⁷ células/3 ml por pocillo) en medio RP10 (RPMI 1640, complementado con un 10% de suero fetal de ternero inactivado por calor y con antibióticos). Tras una incubación de 2 horas a 37°C y con un 5% de CO₂, se quitaron las células no adheridas y se cultivaron en medio RP10 los monocitos adheridos. Se añadieron al medio las siguientes citocinas: GM-CSF humano recombinante (factor estimulante de colonias granulocito-macrófago; Leukomax, Novartis; 100 ng/ml), interleucina IL-4 (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania; 1000 IU [ml]) y TNF- α (factor α de necrosis tumoral) (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania; 10 ng/ml).

35 2.2. Síntesis de los péptidos

Por ejemplo, se sintetizaron dos péptidos unidos a HLA-A*02 (c-Met [SEQ ID n.º 1, YVDPVITSI] o adipofilina [SEQ-ID n.º 2, SVASTITGV], como se identificaron los mencionados anteriormente) mediante la utilización de grupos protectores F-moc (9-Fluorenilmetiloxycarbonilo) en un sintetizador de péptidos (432A, Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania) y se analizaron mediante HPLC en fase invertida y espectrometría de masas. De esta forma, se pudieron preparar suficientes cantidades del péptido identificado.

45 2.3. Inducción de una respuesta de CTL específica de antígeno mediante la aplicación de péptidos sintéticos restringidos a HLA-A*02

Para la inducción de CTL se sensibilizaron durante 2 horas las DC obtenidas en el paso 2.1 (5 x 10⁵) con los péptidos obtenidos en el paso 2.2. con SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 2, cada uno con 50 μ g/ml, se lavaron y se incubaron con 2,5 x 10⁶ PBMC autólogas en medio RP10. Después de 7 días de incubación, las células se volvieron a estimular con PBMC autólogas sensibilizadas con péptidos. Los días 1, 3 y 5 se añadió 1 ng/ml de interleucina IL-2 (R&D Systems) recombinante humana. La actividad citotóxica de los CTL inducidos de esta manera se examinó el 5º día, tras la última reestimulación, mediante un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr (véase más abajo, en 2.4 [ensayo CTL]).

55 2.4. Ensayo CTL

Para los ensayos de CTL se utilizaron como células diana células tumorales, células sensibilizadas con péptido y de distintas líneas celulares y DC autólogas. Las células sensibilizadas con péptido se sensibilizaron durante 2 horas con 50 μ g/ml de péptido (SEQ ID n.º 1 o SEQ ID n.º 2). Todas las células diana se marcaron en medio RP10 (RPMI 1640, complementado con un 10% de suero fetal de ternero inactivado por calor y con antibióticos) durante 1 hora a 37°C con [⁵¹Cr]cromato de sodio (⁵¹Cr). Finalmente, se repartieron 10⁴ células por pocillo en una placa de 96 pocillos con suelo redondeado. Se añadieron distintas cantidades de CTL hasta alcanzar un volumen de 200 μ l, con una incubación final de 4 horas a 37°C. Después se recogieron los resultados (50 μ l/pocillo) y se hizo un recuento en un contador de placas beta. El porcentaje de la lisis específica se calculó de la siguiente forma: 100 x (liberación experimental - liberación espontánea/liberación máxima - liberación espontánea). La liberación espontánea y la liberación máxima se fijaron en presencia de medio o de Triton X-100 al 2%.

2.5. Resultados de la inducción de CTL

a) Actividad citotóxica de los CTL frente a DC sensibilizadas por péptidos

5 En la figura 2 se muestran los resultados del ensayo de liberación de Cr⁵¹ (véase el epígrafe 2.4. más abajo) con referencia a la actividad citotóxica de CTL inducidos (véase el epígrafe 2.3. más abajo) frente a células T2 o dendríticas. La línea celular T2 es HLA-A*02⁺ y carente de TAP (transportador asociado al procesamiento antigénico); (los transportadores de péptidos TAP transportan fragmentos peptídicos de un antígeno proteico desde el citosol hasta el retículo endoplasmático, donde se asocia a moléculas MHC).

10 En las figuras 2a y 2b se muestra la actividad citotóxica de los CTL, inducidos mediante la utilización del péptido con la SEQ ID n.º 1, frente a células T2 y dendríticas. Ambos tipos de célula fueron previamente sensibilizados con el péptido c-met con SEQ ID n.º 1 (cuadrícula rellena de negro) o con un péptido irrelevante (*Survivin* [Sv]; ELTLGEFLKL; SEQ ID n.º 80) o VIH (ILKEPVHGV; Pol. péptido HIV-1 con transcripción inversa, posición de los ácidos nucleicos 476-484; SEQ ID n.º 81). En las figuras 2c y 2d se muestra la actividad citotóxica de los CTL, inducidos mediante la utilización del péptido con SEQ ID n.º 2, frente a células T2 y dendríticas, que previamente fueron sensibilizadas con el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2.

15 La lisis específica reflejada en la liberación de ⁵¹Cr se muestra en las figuras 2a a 2d y en los diagramas de lisis de CTL de las figuras 3 a 5, frente a diferentes proporciones de células efectoras (CTL) y células diana (células marcadas con ⁵¹Cr, para lisar).

20 Como se puede ver en las figuras 2a a 2d, se pudo mostrar, con una línea celular de CTL obtenida tras 2 semanas de reestimulación, una destrucción de las células específica de antígeno. Sólo se destruyeron, mediante una cantidad en aumento de CTL, las células que presentaban el péptido de c-met con SEQ ID n.º 1 (figuras 2a y 2b) o el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 (figuras 2c y 2d) (véanse en las figuras 2a a 2d las curvas correspondientes con las cuadrículas en negro). Las células de control cargadas con péptidos irrelevantes no fueron destruidas (las curvas con cuadrículas vacías). De esta forma, se pudo mostrar la especificidad de la actividad citolítica.

30

b) Actividad citotóxica de CTL frente a líneas celulares de tumor

35 En una etapa posterior, se volvió a utilizar un ensayo de liberación de ⁵¹Cr para evaluar si los CTL -que son específicos para el péptido de c-met con SEQ ID n.º 1 o para el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2- reconocen y lisan células tumorales que expresan endógenamente el proto-oncogén c-met o adipofilina.

40 Para ello se aplicaron las siguientes líneas celulares HLA-A*02 positivas marcadas con ⁵¹Cr: HCT 116 (cáncer de intestino; obtenida de el Prof. G. Pawelec, Tubinga, Alemania), A 498, MZ 1257 y MZ 1774 (carcinoma de células renales; obtenida de el Prof. A. Knuth, Fráncfort, Alemania), MCF-7 (cáncer de mama; adquirida de la ATCC, *American Type Culture Collection*), Mel 1479 (melanoma; obtenida de el Prof. G. Pawelec, Tubinga, Alemania) y U 266 (mieloma múltiple; obtenida de el Prof. G. Pawelec, Tubinga, Alemania). Estas líneas celulares expresan el proto-oncogén c-met y la adipofilina como estructuras diana (*targets*).

45 Las líneas celulares B Croft (VEB [virus de Epstein-Barr]); HLA-A*02⁺; obtenida de O.J. Finn, Pittsburgh, EUA) y SK-OV-3 (tumor ovárico; HLA-A*03⁺; obtenida de O.J. Finn, Pittsburgh, EUA) se utilizaron en los análisis como controles negativos. Las células K 562 (que se pueden obtener, por ejemplo, en la *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, DSMZ; ACC 10) se utilizaron para determinar la actividad de las células asesinas naturales (NK), ya que esta línea celular está altamente sensibilizada frente a estas células asesinas.

50 Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RP10 (RPMI 1640, complementado con un 10% de suero fetal de ternero inactivado por calor y antibióticos).

55 Con las líneas celulares de tumor mencionadas anteriormente y los CTL inducidos como se describe en el epígrafe 2.3, se efectuaron los ensayos de liberación de ⁵¹Cr (véase el epígrafe 2.4).

Las figuras 3a a 3f muestran los resultados de estos ensayos de CTL: en las figuras 3a a 3d se muestran los CTL inducidos mediante la utilización del péptido de c-met con SEQ ID n.º 1; en las figuras 3e y 3f se muestran los CTL inducidos mediante la utilización del péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2.

60 Como se puede ver en las figuras 3a a 3f, los CTL, específicos para el péptido c-met con SEQ ID n.º 1 (Fig. 3a a 3d) o para el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 (Fig. 3e y 3f), lisaron de forma eficaz células tumorales que expresaban tanto HLA-A*02 como c-met o adipofilina (también en la Fig. 3a la línea celular HCT 116, en la Fig. 3b la línea celular A 498, en la Fig. 3c las líneas celulares MZ 1257 y MEL 1479 y en la Fig. 3d las líneas celulares MCF-7 y U 266; en la Fig. 3e las líneas celulares A 498, U 266 y MCF-7, en la Fig. 3f las líneas celulares MZ 1774, Mel 1479 y MZ 1257). La lisis específica se midió -como se dio anteriormente en el epígrafe 2.4.- mediante la liberación de ⁵¹Cr. Por el contrario, la línea celular de control SK-OV-3 (HLA-A*02-negativa) no fue lisada por los CTL inducidos con el péptido con SEQ ID n.º 1 ni por los CTL inducidos por el péptido con SEQ ID n.º 2. Esto demuestra que ambos péptidos deben ser presentados en relación con las moléculas HLA-A*02 en las células tumorales, con el fin de lisar

ES 2 317 379 T3

las células diana de forma efectiva. Además, de esta forma se comprobó la especificidad antigénica y la restricción de MHC de los CTL.

Además, los CTL inducidos *in vitro* por el péptido con SEQ ID n.º 1 no reconocieron la línea celular K562 (véanse las Fig. 3a, 3b y 3d), lo que demuestra que la actividad citotóxica no es proporcionada por células asesinas naturales (NK).

c) Ensayos de inhibición

Con el fin de seguir verificando la especificidad antigénica y la restricción de MHC de los CTL inducidos *in vitro*, se efectuaron ensayos de inhibición con líneas celulares de inhibidores no marcadas con ⁵¹Cr (fríos).

Con ello se analizó la capacidad de las líneas celulares sensibilizadas con péptidos para inhibir o competir con la lisis de células tumorales. Para ello se aplicó un exceso de inhibidor (es decir, de células sensibilizadas no marcadas). La proporción del inhibidor (células sensibilizadas con péptidos) y la diana (células tumorales) fue de 20:1. En la lisis de las líneas celulares del inhibidor no se pudo liberar ⁵¹Cr, ya que las líneas celulares del inhibidores no estaban marcadas.

Como inhibidor se aplicó la línea celular T2 (HLA-A*02; deficiente de TAP; véase el epígrafe 2.5.a). La línea celular T2 se sensibilizó antes de cada ensayo con los péptidos relevantes (SEQ ID n.º 1 o 2) o con un péptido de control irrelevante (Survivin [Sv], SEQ ID n.º 80).

Los resultados de estos ensayos se muestran en las figuras 4a a 4c: en las figuras 4a y 4b se aplicaron CTL que fueron inducidos con el péptido de c-met con SEQ ID n.º 1; en la figura 4c, CTL que fueron inducidos por el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2.

En las figuras 4a y 4b se evaluó la lisis de las líneas celulares U 266 y A 498 marcadas con ⁵¹Cr, sin línea celular de inhibidor (cada curva con cuadrículas negras); con la línea celular T2 del inhibidor, sensibilizada con un péptido irrelevante (Survivin; SEQ ID n.º 80; control negativo, las curvas con los triángulos rellenos); y con la línea celular T2 del inhibidor, sensibilizada con el péptido de c-met con SEQ ID n.º 1 (curvas con los rombos en blanco).

Sin la existencia de las células del inhibidor, se observó una lisis de las células tumorales mediante CTL (véanse en las figuras 4a a 4d las curvas con las cuadrículas rellenas de negro). Como se deduce de las figuras 4a y 4b, con un exceso de blanco inhibidor no tuvo lugar la lisis de las células tumorales (y por lo tanto, la liberación de ⁵¹Cr), siempre que el blanco inhibidor estaba sensibilizado con el péptido c-met con SEQ ID n.º 1 (véanse las curvas con los rombos en blanco). La actividad de los CTL se orientó hacia el exceso de células T2 sin marcar, de forma que se lisaron éstas, y no las células tumorales. Las células T2, sensibilizadas con un péptido irrelevante (Survivin; SEQ ID n.º 80), no pudieron inhibir la lisis de las células tumorales por los CTL, de forma que se pudo medir el ⁵¹Cr liberado (véanse en las figuras 4a y 4b las curvas con los triángulos rellenos de negro).

Se pudo observar algo parecido al utilizar CTL inducidos por la aplicación del péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 (véase la figura 4c):

La restricción MHC y la especificidad antigénica de la actividad citotóxica, transmitida a través de los CTL inducidos por adipofilina, pudo confirmarse mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal específico de HLA-A*02 y en un ensayo de inhibición con un inhibidor sin marcar (frío): Los resultados de este experimento se muestran en la figura 4c. Las células tumorales A 498 se bloquearon mediante la adición del anticuerpo específico de HLA-A*02 (anticuerpo monoclonal BB7.2, IgG2b, obtenido de S. Stefanovic, Tubinga), de forma que no se lisaron por la adición de CTL y no se liberó ⁵¹Cr (véase en la figura 4c la curva con símbolos de triángulos en blanco). Como control se utilizó un anticuerpo inespecífico que no bloqueaba la molécula HLA-A*02 (ChromPure Maus IgG, Dianova, Alemania; véase en la Fig. 4c la curva con las cuadrículas rellenas). Para estos experimentos de inhibición, se incubaron las células en las placas de 96 pocillos durante 30 min. con 10 µg/ml de anticuerpos.

Además, se demostró que la línea celular T2 de competición, que se sensibilizó con el péptido irrelevante Survivin con SEQ ID n.º 80 (T2/SV), no pudo inhibir la lisis de la línea celular tumoral A 498 producida por los CTL (véase en la figura 4c la curva con los círculos en negro), pero que la línea celular del inhibidor T2 (T2/AD) sensibilizada con el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 pudo inhibir la lisis de la línea celular del tumor, de forma que, al final, no se pudo medir ninguna liberación de ⁵¹Cr (véase en la figura 4c la curva con los símbolos x).

d) Lisis específica de DC transfectadas

En un paso posterior, se analizó la actividad citotóxica de los CTL en un experimento autólogo. Para ello se utilizaron DC autólogas, obtenidas de la misma PBMC que la utilizada para la inducción de CTL (véase el epígrafe 2.2.), como células diana. Antes de efectuar los ensayos de CTL se realizó la electroporación de las DC con ARN, que, o bien se aisló anteriormente de líneas celulares de tumor o bien mostraba ARN de control (EGFP-ARN transcrito *in vitro* [enhanced Green fluorescent Protein-RNA]; plásmido utilizado: pSP64 Poly(A) EGFP II, obtenido de Van Tendeloo,

ES 2 317 379 T3

Amberes, Bélgica). El ARN completo se aisló de las células tumorales con el kit QIAGEN Rneasy Mini (QIAGEN, Hilden, Alemania) conforme a los datos del fabricante. La cantidad y pureza del ARN se fijó fotométricamente y se guardó en partes alícuotas a -80°C.

5 Antes de la electroporación el sexto día, se lavaron DC inmaduras dos veces con medio X-VIVO 20 sin suero (BioWhittaker, Walkersville, EUA) y se volvieron a suspender en una concentración final de 2×10^7 células/ml. Finalmente, se mezclaron 200 μ l de la suspensión celular con 10 μ g del ARN total y se sometieron a electroporación en una cubeta de 4 mm mediante Easyject Plus™ (Peqlab, Erlangen, Alemania) (Parámetros: 300 V, 150 μ F, 1540 Ω , tiempo de pulsación: 231 ms). Después de la electroporación, las células se traspasaron de inmediato a medio RP10 y se devolvieron al incubador. Más del 80% de las células eran viables tras la electroporación.

15 Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 5a y 5b. En la figura 5a se aplicaron CTL inducidos mediante la utilización del péptido c-met con SEQ ID n.º 1; en la figura 5b se aplicaron CTL inducidos mediante la utilización del péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2.

20 Tras efectuarse el ensayo de CTL con CTL inducidos por el péptido de c-met con SEQ ID n.º 1 (véase el epígrafe 2.4.), se pudo observar una lisis específica de DC, electroporadas con ARN de líneas celulares de tumor que expresaban c-met (A 498 y MCF-7) (véanse en la figura 5a las curvas con los símbolos en negro). Por el contrario, las DC que fueron electroporadas con ARN de la línea celular tumoral Croft que no expresaba el c-met no fueron lisadas (véase la curva con los rombos en blanco).

25 Los CTL inducidos por el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2, lisaron las DC, que fueron electroporadas con ARN de la línea celular A-498 que expresaba adipofilina (véase en la figura 5b la curva con los triángulos en negro). Además, se lisaron DC que fueron sensibilizadas con el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 (véase en la figura 5b la curva con los rombos en negro). Por el contrario, las DC que fueron electroporadas con el (EGFP)ARN de control no se lisaron (véase en la figura 5b la curva con los triángulos en blanco).

30 Esto demuestra que -después de la transfección de las DC con ARN de células tumorales positivas de c-met o adipofilina- los péptidos identificados, es decir, el péptido de c-met con SEQ ID n.º 1 y el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 fueron procesados y presentados.

e) Inducción de CTL específicos de adipofilina en un paciente con leucemia linfática crónica

35 En otro experimento, se generaron, a partir de PBMC de un paciente HLA-A-*0201⁺ con leucemia linfática crónica (CLL) CTL específicos para el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2. El paciente se encontraba en remisión tras un tratamiento con fludarabina. Además, se aplicaron en un ensayo linfocitos CLL autólogos primarios y DC de dicho paciente como blancos marcados con ⁵¹Cr, en el que se transmitió una liberación de ⁵¹Cr mediante los CTL inducidos por péptidos. Como se muestra en la figura 6, tanto las DC autólogas de este paciente, que se sensibilizaron con el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 (DC+AD), como los linfocitos CLL autólogos (linfocitos CLL) fueron lisados por los CTL inducidos por el péptido. Por el contrario, las DC, sensibilizadas con el péptido irrelevante Survivin con SEQ ID n.º 80, no fueron lisadas (DC+SV). Los linfocitos B no malignos y la línea celular K 562 tampoco fueron lisados por los CTL.

45 La especificidad de la respuesta de los CTL se comprobó en un ensayo de inhibición del blanco, en el que se aplicó como células del inhibidor la línea celular T2 (véase más arriba), que estaba sensibilizada con el péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 o con el péptido irrelevante Survivin con SEQ ID n.º 80. Los CTL inducidos mediante la utilización del péptido de adipofilina con SEQ ID n.º 2 también lisaron aquí las líneas celulares del inhibidor existentes en exceso, que fueron sensibilizadas con el péptido relevante con SEQ ID n.º 2, de forma que las células tumorales marcadas con ⁵¹Cr no fueron lisadas en este caso (véase en la figura 6 la curva con las casillas en blanco).

50 En resumen, los inventores pueden demostrar que los péptidos identificados producen sustancias muy prometedoras en la inmunoterapia de una variedad de enfermedades (tumorales).

55

60

65

ES 2 317 379 T3

TABLA 1

	Secuencia	Posición/Tipo de gen	N.º de reg.	SEQ ID n.º
5				
	Paciente RCC01			
10	HLA-A*02			
15	1. YVDPVITSI	654-662 met proto-oncogen	J02958	SEQ ID n.º 1
20	2. SVASTITG V	129-137 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID n.º 2
25	3. ALLNIKVK L	365-373 keratin 18	M26326	SEQ ID n.º 3
30	4. ALFDGDP HL	1-9 KIAA0367	AB002365	SEQ ID n.º 4
35	5. RLLDYVVN I	679-687 hypothetical protein FLJ20004	AB040951	SEQ ID n.º 5
40	6. ALANGIEE V	101-109 apolipoprotein L, 3	AY014906	SEQ ID n.º 6
45	7. QLIDKWW QL	593-601 SEC14 (S.cerevisiae)-like 1	D67029	SEQ ID n.º 7
50	8. ALSDLEITL	389-397 mitogen inducible 2	Z24725	SEQ ID n.º 8
55	9. ILDTGTIQL	174-182 kidney- and liver-specific gene	AB013094	SEQ ID n.º 9
60	10. SLLGGDV VSV	27-36 delta sleep inducing peptide, immunoreactor	AF153603	SEQ ID n.º 10
65				

ES 2 317 379 T3

5	11.	FLDGNELT L	167-175 chloride intracellular channel 1	U93205	SEQ ID n.º	11
10	12.	NLLPKLHI V	179-187 chloride intracellular channel 1	U93205	SEQ ID n.º	12
15	13.	ALASHLIE A	507-515 EH-domain containing 2	AF181263	SEQ ID n.º	13
20	14.	SLYGGTITI	296-304 hypothetical protein FLJ11189	AK000697	SEQ ID n.º	14
25	15.	FLLDKKIG V	218-226 chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	AF026166	SEQ ID n.º	15
30	16.	FLDGNEM TL	178-186 chloride intracellular channel 4	AF097330	SEQ ID n.º	16
35	17.	AIVDKVPS V	147-155 coat-protein gamma-cop	AF100756	SEQ ID n.º	17
40	18.	DVASVIVT KL	241-250 signal recognition particle 54kD	U51920	SEQ ID n.º	18
45	19.	LASVSTVL	130-137 hemoglobin, alpha 2	AF230076	SEQ ID n.º	19
50	20.	VMAPRTL VL	3-11 HLA-A		SEQ ID n.º	20
55	21.	LLFDRPM HV	267-275 hnRNP M	L03532	SEQ ID n.º	21
60	HLA-A*68					
65	22.	MTSALPII QK	62-71 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID n.º	22

ES 2 317 379 T3

5	23.	MAGDIYSV FR	349-358 adipose differentiation-related protein	X97324	SEQ ID n.º	23
10	24.	ETIPLTAE KL	115-124 cyclin D1/PRAD1	X59798	SEQ ID n.º	24
15	25.	DVMVGPF KLR	934-943 A kinase (PRKA) anchor protein 2	AJ303079	SEQ ID n.º	25
20	26.	TIIDILTKR	64-72 annexin A1	X05908	SEQ ID n.º	26
25	27.	TIVNILTNR	55-63 annexin A2	BC001388	SEQ ID n.º	27
30	28.	TIIDIITHR	385-393 annexin A6	J03578	SEQ ID n.º	28
35	29.	SIFDGRVV AK	107-116 putative membrane protein	AB020980	SEQ ID n.º	29
40	30.	STIEYVIQ R	115-123 Sec23 (<i>S. cerevisiae</i>) homolog B	BC005032	SEQ ID n.º	30
45	31.	ELIKPPTIL R	132-141 adaptor-related protein complex 3	AF092092	SEQ ID n.º	31
50	32.	EIAMATVT ALR	248-258 aldolase A, fructose-biphosphate	X12447	SEQ ID n.º	32
55	33.	ETIGEILKK	95-103 hnRNP K	BC000355	SEQ ID n.º	33
	34.	SLADIMAK R	86-94 ribosomal protein L24	BC000690	SEQ ID n.º	34
	HLA-B*44 o HLA-B*18					
60	35.	EEIAFLKK L	229-237 vimentin	M14144	SEQ ID n.º	35

65

ES 2 317 379 T3

5	36.	DEAAFLER L	92-100 caldesmon 1	M64110	SEQ ID n.º	36
10	37.	DEMKVLV L	545-552 spectrin, beta, non-erythrocytic 1	M96803	SEQ ID n.º	37
15	38.	DEVKFLTV	191-198 annexin A4	M82809	SEQ ID n.º	38
20	39.	NENSLFKS L	935-943 clathrin, heavy polypeptide (Hc)	D21260	SEQ ID n.º	39
25	40.	DEFKVVV V	373-380 coat protein, gamma-cop	AF100756	SEQ ID n.º	40
30	41.	EEVKLIKK M	137-145 ferritin, light polypeptide	M11147	SEQ ID n.º	41
35	42.	DEVKLPK L	158-166 polymerase I and transcript release factor	AF312393	SEQ ID n.º	42
40	43.	TERELKVA Y	637-645 hypothetical protein FLJ20004	AB040951	SEQ ID n.º	43
45	44.	NEFSLKG VDF	86-95 ets-1	J04101	SEQ ID n.º	44
50	45.	NEQDLGIQ Y	169-177 catenin alpha 1	D13866	SEQ ID n.º	45
55	46.	EERIVELF	306-313 signal transducer and activator of transcription 3	BC000627	SEQ ID n.º	46
60	47.	EEIREAFR VF	84-93 calmodulin 3	J04046	SEQ ID n.º	47
65	48.	DEYIYRHF F	344-352 cell cycle progression 8 protein	AF011794	SEQ ID n.º	48

ES 2 317 379 T3

5	49.	DELELHQ RF	308-316 adenovirus 5 E1A binding protein	X86098	SEQ ID n.º	49
10	50.	SEVKFTVT F	80-88 galectin 2	M87842	SEQ ID n.º	50
15	51.	IETIINTF	12-19 calgranulin B	M26311	SEQ ID n.º	51
20	52.	KENPLQF KF	61-69/72-80 villin 2 (ezrin)/(radixin)	J05021/ L02320	SEQ ID n.º	52
25	53.	DEVRTLTY	41-48 hnRNP methyltransferase, S. cerevisiae-like 2	Y10807	SEQ ID n.º	53
30	54.	GEAVVNR VF	43-51 large multifunctional protease 2, LMP2	Z14977	SEQ ID n.º	54
35	55.	EEVLIPDQ KY	385-394 F-box and leucine-rich repeat protein 3A	AF126028	SEQ ID n.º	55
40	56.	DEGRLVL EF	163-171 sterol O-acyltransferase 1	L21934	SEQ ID n.º	56
45	57.	DEVELIHF	838-845 chromatin-specific transcription elongation factor	AF152961	SEQ ID n.º	57
50	58.	VEVLLNYA Y	83-91 NS1-binding protein	AF205218	SEQ ID n.º	58
55	59.	TENDIRVM F	120-128 CUG triplet repeat, RNA-binding protein 1	AF267534	SEQ ID n.º	59
60	60.	LEGLTVVY	62-69 coatomer protein complex subunit zeta 1	AF151878	SEQ ID n.º	60
65						

ES 2 317 379 T3

5	61.	NELPTVAF	192-199 hypothetical protein	AK001475	SEQ ID n.º	61
10	62.	EEFGQAF SF	77-85 MHC, class II, DP alpha 1	X03100	SEQ ID n.º	62
15	63.	VEAIFSKY	33-40 hnRNP C (C1/C2)	M29063	SEQ ID n.º	63
20	64.	DERTFHIF Y	277-285 myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	M69181	SEQ ID n.º	64
25	65.	TEKVLAHV Y	206-214 aldolase B, fructose-bisphosphate	K01177	SEQ ID n.º	65
30	66.	VESPLSVS F	159-167 hypothetical protein FLJ22318	AK025971	SEQ ID n.º	66
35	67.	SEAGSHT LQW	MHC-I		SEQ ID n.º	67
40	68.	DEGKVIRF	56-63 EST reading frame-1	BF431469	SEQ ID n.º	68
Paciente RCC13						
HLA-A*02						
45	69.	ALAAVWTE V	frameshift, DDX3 reading frame +2	AF061337	SEQ ID n.º	69
50	70.	TLIEDILGV	209-217 transient receptor protein 4 associated protein	AL132825	SEQ ID n.º	70
55	71.	ALFGALFL A	2-10 phospholipid transfer protein	L26232	SEQ ID n.º	71
60	72.	VLATLVLL L	72-80 EST	AA483794	SEQ ID n.º	72

65

ES 2 317 379 T3

5	73.	TLDDLIAA V	325-333 hypothetical protein FLJ10042	AK000904	SEQ ID n.º 73	
10	74.	YLDNGVW FV	316-324 damage-specific DNA binding protein 1 (127kD)	U18299	SEQ ID n.º 74	
15	75.	SVFAGWV GV	581-589 guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	U58855	SEQ ID n.º 75	
20	76.	SLINVGLIS V	48-57 acidic protein rich in leucines	BC000476	SEQ ID n.º 76	
25	77.	ALADGVQ KV	176-184 apolipoprotein L, 1)	AF323540	SEQ ID n.º 77	
30	HLA-A*24					
35	78.	TYGEIFEK F	107-115 NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, (B14.5b)	AF070652	SEQ ID n.º 78	
40	79.	YYMIGEIQ KF	203-211 nicotinamide-n-methyltransferase	U08021	SEQ ID n.º 79	

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido asociado a tumor con la secuencia de aminoácidos SVASTITGV (SEQ ID n.º 2), en donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano de clase I.
2. El péptido conforme a la reivindicación 1, **caracterizado** porque un aminoácido puede ser sustituido por otro aminoácido con propiedades químicas parecidas.
- 10 3. El péptido conforme a las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado** porque en N- y/o C-terminal existe otro aminoácido.
4. El péptido conforme a una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque un aminoácido se ha eliminado.
- 15 5. El péptido conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque al menos un aminoácido se ha modificado químicamente.
6. La utilización del péptido conforme a las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales y/o enfermedades adenomatosas.
- 20 7. La utilización del péptido conforme a las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades tumorales y/o enfermedades adenomatosas.
8. La utilización conforme a las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizada** porque la enfermedad es cáncer renal, de mama, de páncreas, de estómago, de vejiga y/o de testículo.
- 25 9. La utilización conforme a las reivindicaciones 7 o 8, **caracterizada** porque el péptido es aplicado junto con un adyuvante.
- 30 10. La utilización conforme a las reivindicaciones 7 o 8, **caracterizada** porque el péptido se aplica unido a una célula presentadora de antígeno.
11. La utilización del péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de un anticuerpo.
- 35 12. Una composición farmacéutica que contiene el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
13. Una molécula de ácidos nucleicos que codifica el péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 14. Un vector que contiene la molécula de ácidos nucleicos conforme a la reivindicación 13.
15. Células que, con ayuda de la molécula de ácidos nucleicos conforme a la reivindicación 13 o con ayuda del vector conforme a la reivindicación 14, son modificadas genéticamente de tal forma que producen un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

45

50

55

60

65

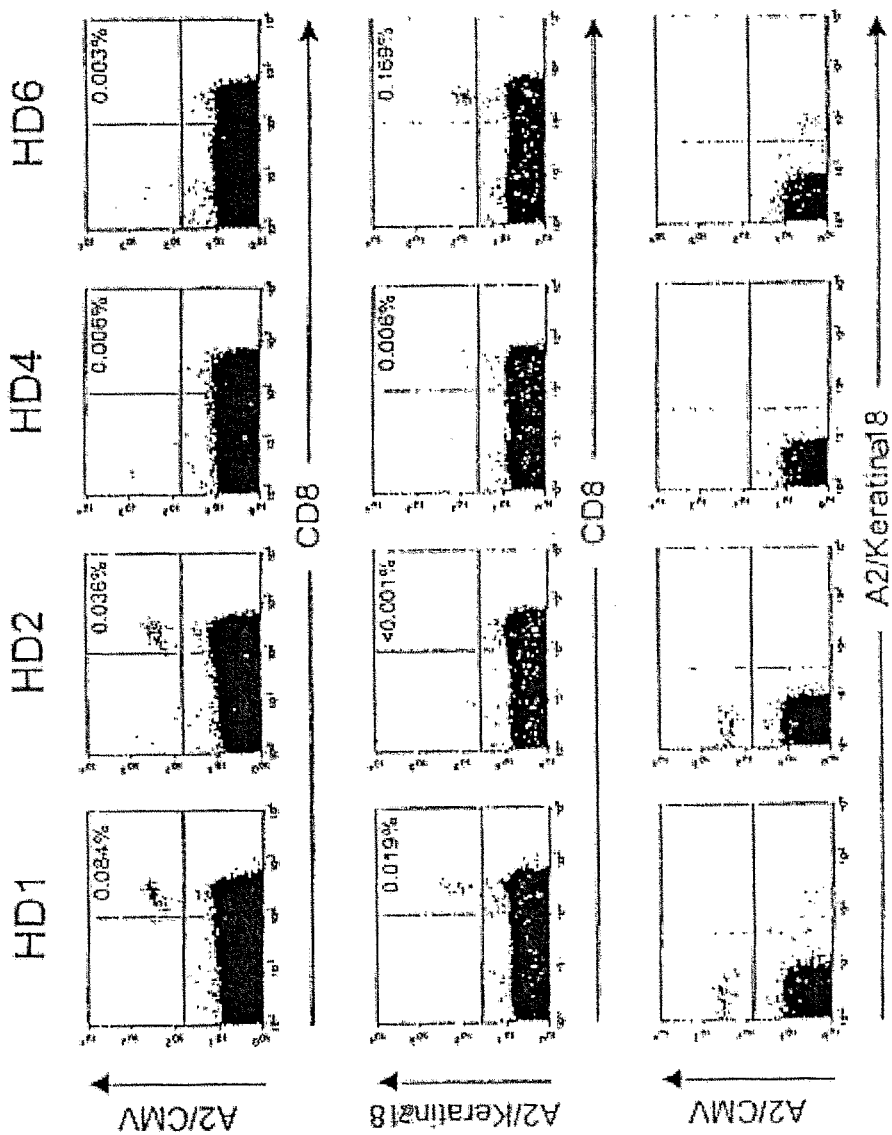


Figura 1

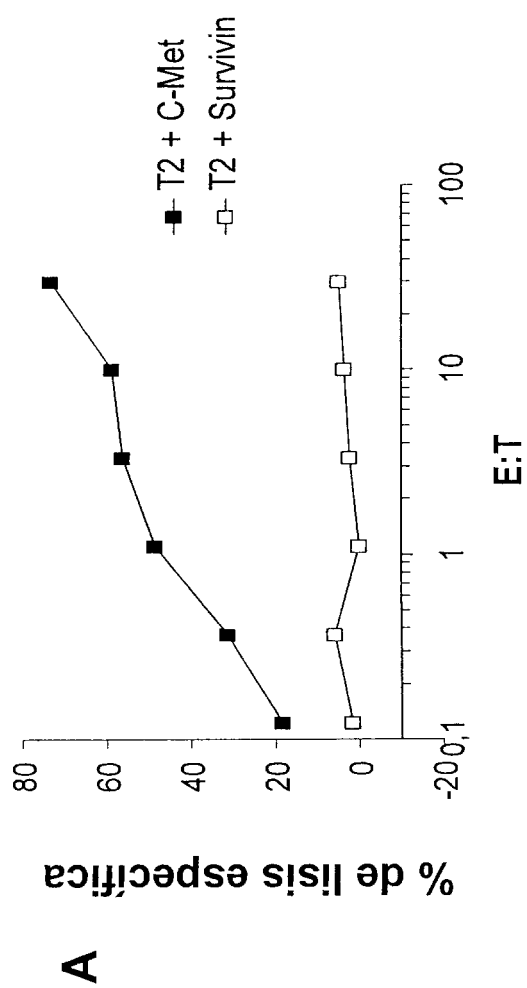


Figura 2 a

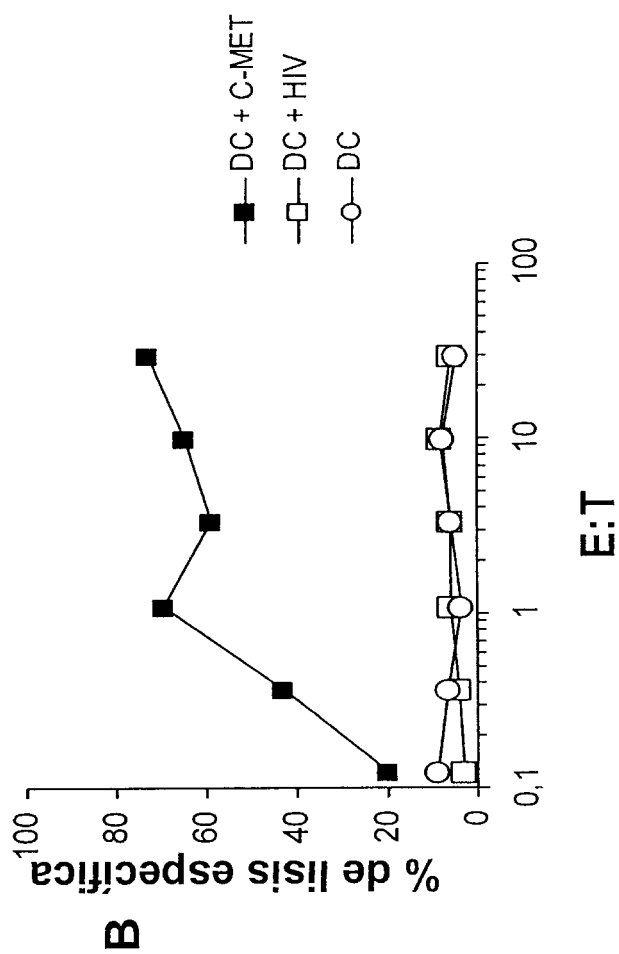


Figura 2 b

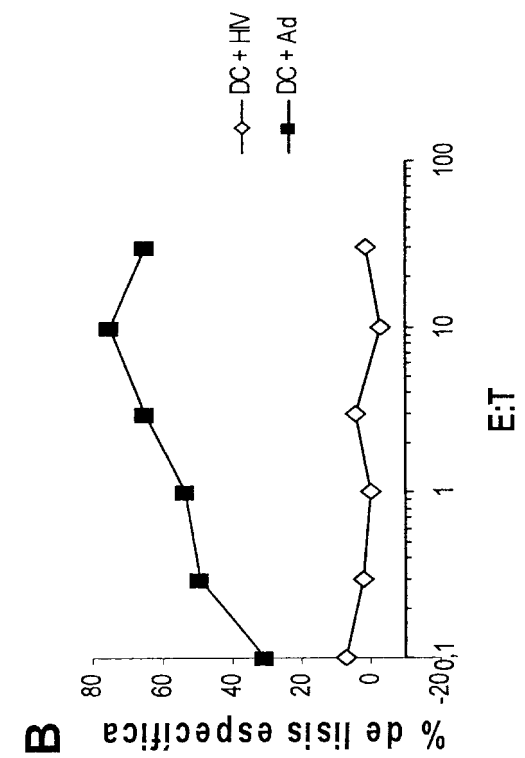


Figura 2d

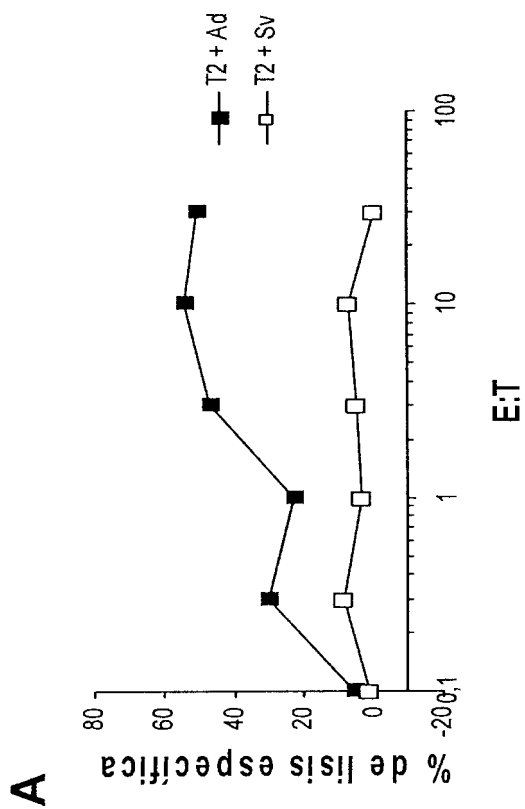


Figura 2c

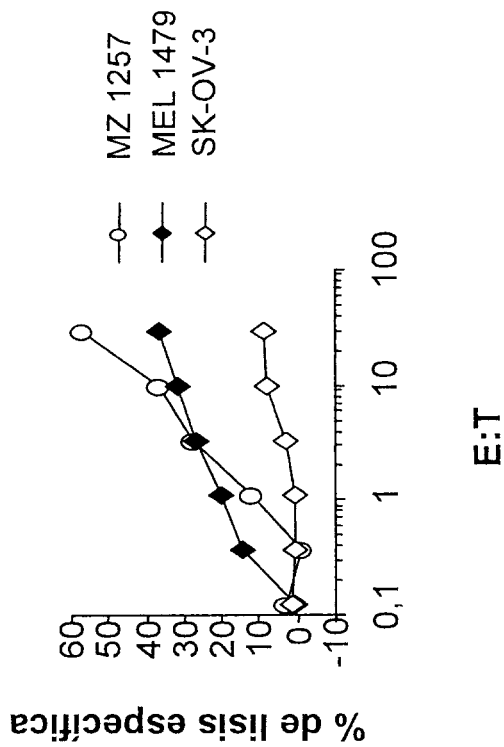
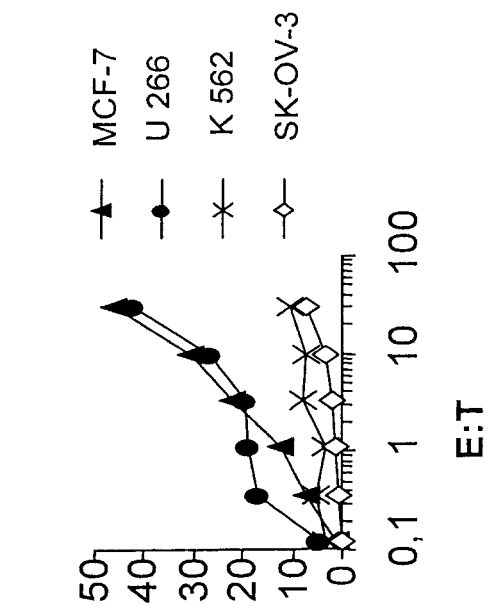
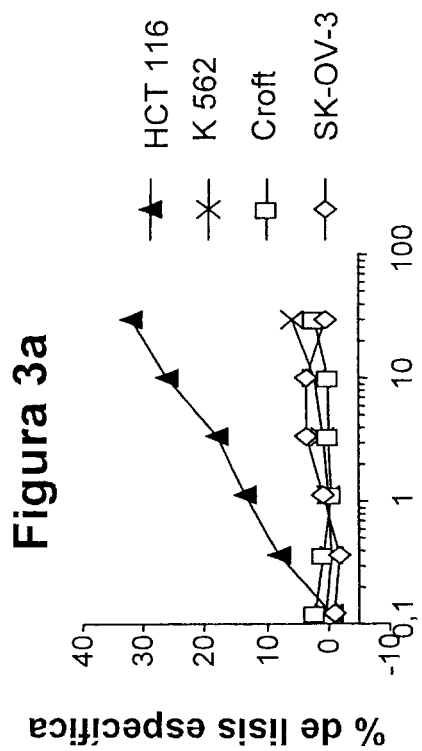
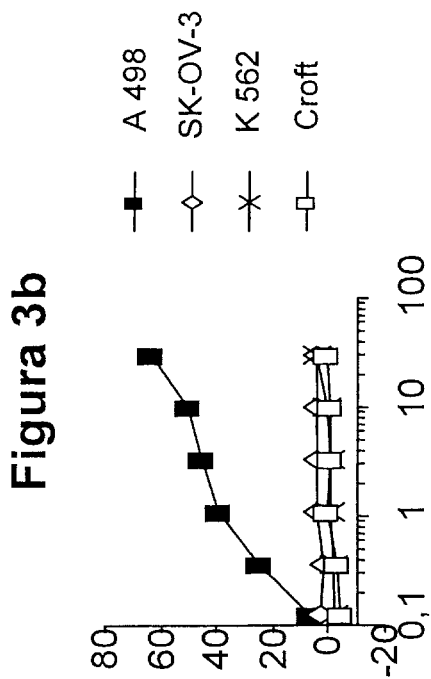


Figura 3f

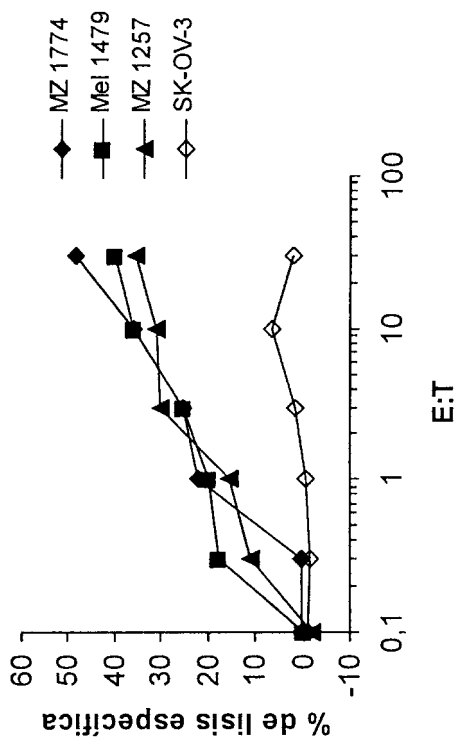
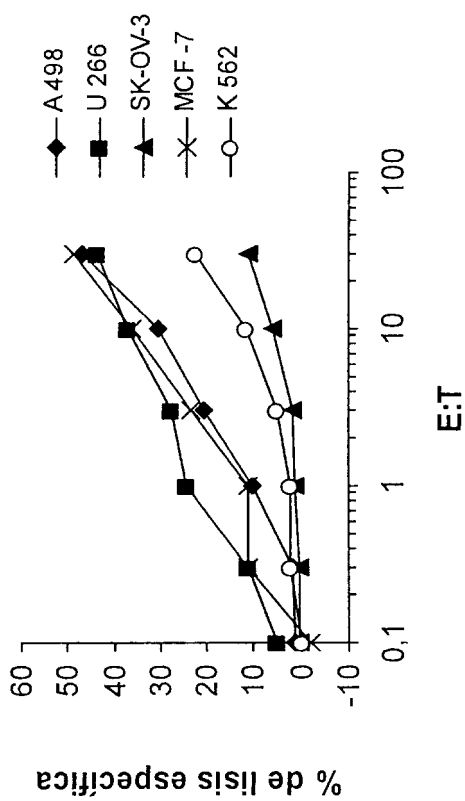


Figura 3d



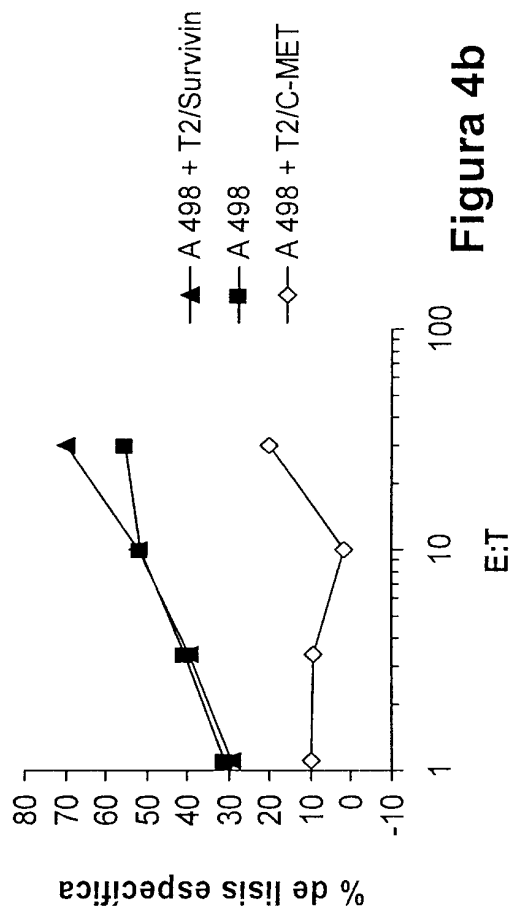
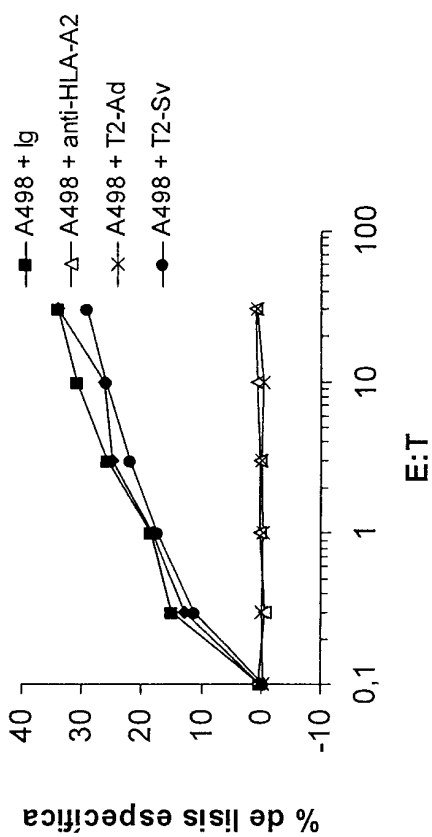
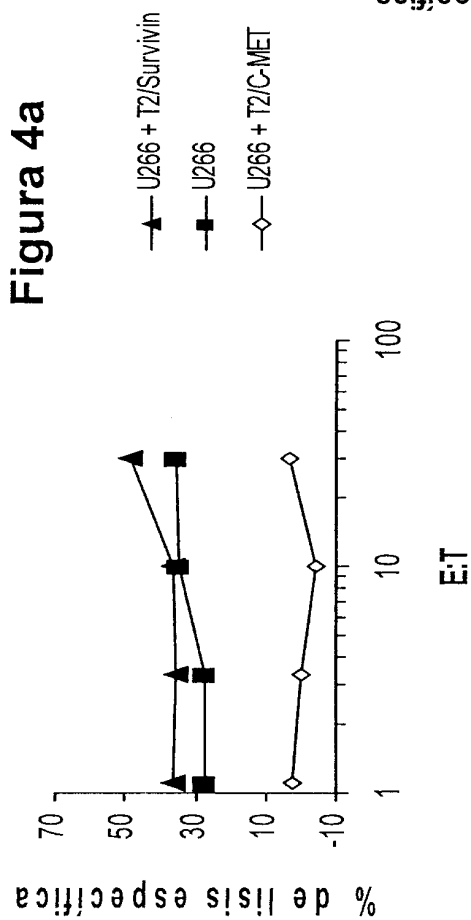


Figura 4c

Figura 5a

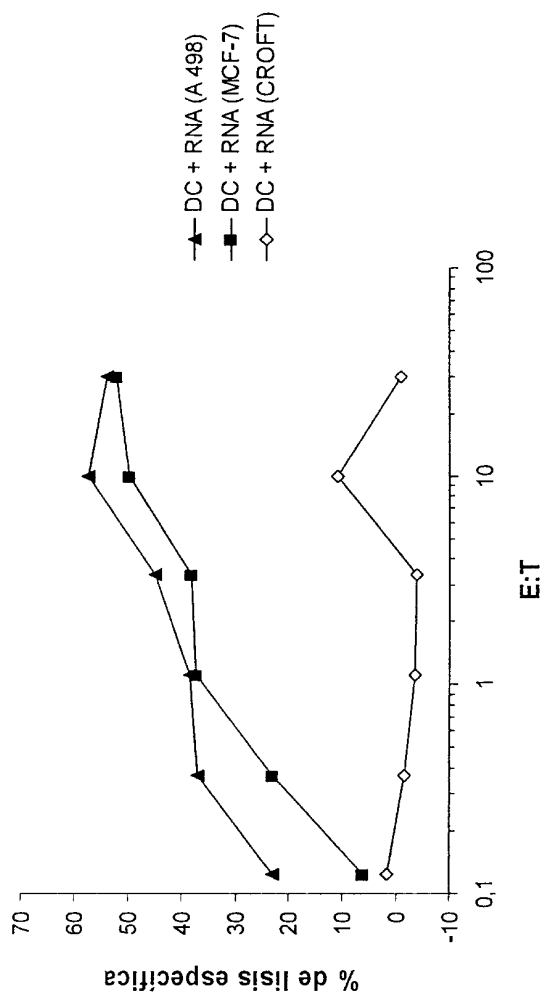
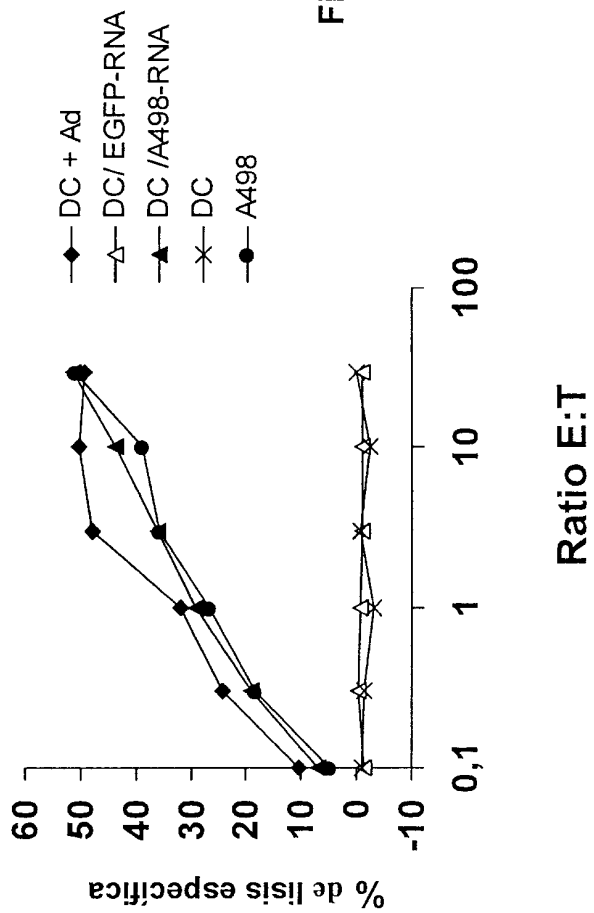


Figura 5b



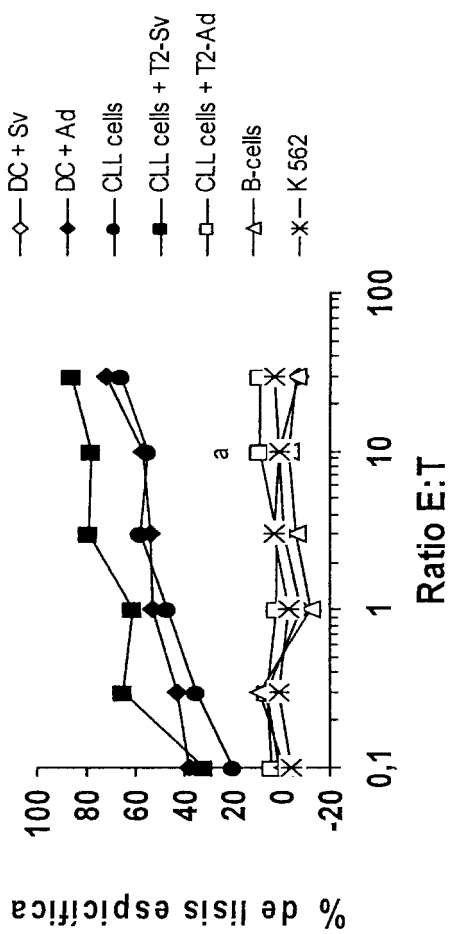


Figura 6

ES 2 317 379 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Immatics Biotechnologies GmbH

5 <120> Péptidos asociados a tumor unidos a moléculas MHC

<130> FB15156/A

10 <160> 81

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 1
Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
25 1 5

<210> 2
<211> 9
30 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2
35 Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val
1 5

<210> 3
40 <211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 3
Ala Leu Leu Asn Ile Lys Val Lys Leu
1 5

50 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
55 <213> *Homo sapiens*

<400> 4
60 Ala Leu Phe Asp Gly Asp Pro His Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
65 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 317 379 T3

<400> 5

Arg Leu Leu Asp Tyr Val Val Asn Ile

5 1 5

<210> 6

<211> 9

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

15 Ala Leu Ala Asn Gly Ile Glu Glu Val

 1 5

20 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

30 Gln Leu Ile Asp Lys Val Trp Gln Leu

 1 5

35 <210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 8

Ala Leu Ser Asp Leu Glu Ile Thr Leu

45 1 5

<210> 9

50 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 9

Ile Leu Asp Thr Gly Thr Ile Gln Leu

60 1 5

<210> 10

<211> 10

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 317 379 T3

<400> 10
Ser Leu Leu Gly Gly Asp Val Val Ser Val
5 1 5 10
<210> 11
10 <211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
15 <400> 11
Phe Leu Asp Gly Asn Glu Leu Thr Leu
20 1 5
<210> 12
<211> 9
25 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 12
Asn Leu Leu Pro Lys Leu His Ile Val
35 1 5
<210> 13
<211> 9
40 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 13
45 Ala Leu Ala Ser His Leu Ile Glu Ala
1 5
50 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
55 <400> 14
60 Ser Leu Tyr Gly Gly Thr Ile Thr Ile
1 5
<210> 15
65 <211> 9
<212> PRT

ES 2 317 379 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

5 Phe Leu Leu Asp Lys Lys Ile Gly Val
1 5

10 <210> 16

<211> 9

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

20 Phe Leu Asp Gly Asn Glu Met Thr Leu
1 5

<210> 17

25 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 17

35 Ala Ile Val Asp Lys Val Pro Ser Val
1 5

<210> 18

40 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 18

50 Asp Val Ala Ser Val Ile Val Thr Lys Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 8

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

60 Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu
1 5

65 <210> 20

<211> 9

ES 2 317 379 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 20

Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu
1 5

10

<210> 21
<211> 9

15 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

20

Leu Leu Phe Asp Arg Pro Met His Val
1 5

25

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 22

35 Met Thr Ser Ala Leu Pro Ile Ile Gln Lys
1 5 10

40 <210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 23

50 Met Ala Gly Asp Ile Tyr Ser Val Phe Arg
1 5 10

55 <210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 24

Glu Thr Ile Pro Leu Thr Ala Glu Lys Leu
1 5 10

65

<210> 25

ES 2 317 379 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 25

Asp Val Met Val Gly Pro Phe Lys Leu Arg

10

1 5 10

<210> 26

15 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 26

Thr Ile Ile Asp Ile Leu Thr Lys Arg

25

1 5

<210> 27

<211> 9

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 27

Thr Ile Val Asn Ile Leu Thr Asn Arg

40

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

50 Thr Ile Ile Asp Ile Ile Thr His Arg

1 5

55 <210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

<400> 29

Ser Ile Phe Asp Gly Arg Val Val Ala Lys

65

1 5 10

ES 2 317 379 T3

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

10 Ser Thr Ile Glu Tyr Val Ile Gln Arg
 1 5

15 <210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20

<400> 31

25 Glu Leu Ile Lys Pro Pro Thr Ile Leu Arg
 1 5 10

<210> 32
30 <211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 32

40 Glu Ile Ala Met Ala Thr Val Thr Ala Leu Arg
 1 5 10

<210> 33
<211> 9
45 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 33

55 Glu Thr Ile Gly Glu Ile Leu Lys Lys
 1 5

<210> 34
<211> 9
60 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

65 Ser Leu Ala Asp Ile Met Ala Lys Arg
 1 5

ES 2 317 379 T3

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

10 Glu Glu Ile Ala Phe Leu Lys Lys Leu
 1 5

15 <210> 36

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

25 Asp Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Leu
 1 5

<210> 37

30 <211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 37

40 Asp Glu Met Lys Val Leu Val Leu
 1 5

<210> 38

<211> 8

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

50 Asp Glu Val Lys Phe Leu Thr Val
 1 5

55 <210> 39

<211> 9

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 39

65 Asn Glu Asn Ser Leu Phe Lys Ser Leu
 1 5

ES 2 317 379 T3

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

10 Asp Glu Phe Lys Val Val Val Val
1 5

15 <210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 41

25 Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys Met
1 5

30 <210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
35 <400> 42

40 Asp Glu Val Lys Leu Pro Ala Lys Leu
1 5

45 <210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
50 <400> 43

50 Thr Glu Arg Glu Leu Lys Val Ala Tyr
1 5

55 <210> 44
<211> 10
<212> PRT
60 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

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

ES 2 317 379 T3

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

10 Asn Glu Gln Asp Leu Gly Ile Gln Tyr
 1 5

15 <210> 46

<211> 8

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

25 Glu Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe
 1 5

<210> 47

30 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 47

40 Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe
 1 5 10

<210> 48

<211> 9

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 48

50 Asp Glu Tyr Ile Tyr Arg His Phe Phe
 1 5

55 <210> 49

<211> 9

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

65 Asp Glu Leu Glu Leu His Gln Arg Phe
 1 5

ES 2 317 379 T3

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

10 Ser Glu Val Lys Phe Thr Val Thr Phe
1 5

15 <210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 51

25 Ile Glu Thr Ile Ile Asn Thr Phe
1 5

30 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
35 <400> 52

40 Lys Glu Asn Pro Leu Gln Phe Lys Phe
1 5

45 <210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
50 <400> 53

55 Asp Glu Val Arg Thr Leu Thr Tyr
1 5

60 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
65 <400> 54

65 Gly Glu Ala Val Val Asn Arg Val Phe
1 5

ES 2 317 379 T3

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

10 Glu Glu Val Leu Ile Pro Asp Gln Lys Tyr
 1 5 10

15 <210> 56

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 56

25 Asp Glu Gly Arg Leu Val Leu Glu Phe
 1 5

<210> 57

30 <211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 57

40 Asp Glu Val Glu Leu Ile His Phe
 1 5

<210> 58

<211> 9

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

50 Val Glu Val Leu Leu Asn Tyr Ala Tyr
 1 5

55 <210> 59

<211> 9

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

65 Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Met Phe
 1 5

ES 2 317 379 T3

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

10 Leu Glu Gly Leu Thr Val Val Tyr
 1 5

15 <210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20

<400> 61

25 Asn Glu Leu Pro Thr Val Ala Phe
 1 5

<210> 62
30 <211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 62

40 Glu Glu Phe Gly Gln Ala Phe Ser Phe
 1 5

<210> 63
<211> 8
45 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 63

50 Val Glu Ala Ile Phe Ser Lys Tyr
 1 5

55 <210> 64
<211> 9
<212> PRT
60 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

65 Asp Glu Arg Thr Phe His Ile Phe Tyr
 1 5

ES 2 317 379 T3

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

10 Thr Glu Lys Val Leu Ala Ala Val Tyr
 1 5

15 <210> 66

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

25 Val Glu Ser Pro Leu Ser Val Ser Phe
 1 5

<210> 67

30 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 67

 Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Trp
40 1 5 10

<210> 68

45 <211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 68

 Asp Glu Gly Lys Val Ile Arg Phe
55 1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 317 379 T3

<400> 69

Ala Leu Ala Ala Val Val Thr Glu Val
5 1 5

<210> 70

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 70

Thr Leu Ile Glu Asp Ile Leu Gly Val
20 1 5

<210> 71

<211> 9

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 71

30 Ala Leu Phe Gly Ala Leu Phe Leu Ala
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 72

45 Val Leu Ala Thr Leu Val Leu Leu Leu
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 73

60 Thr Leu Asp Asp Leu Ile Ala Ala Val
1 5

<210> 74

65 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 317 379 T3

<400> 74

5 Tyr Leu Asp Asn Gly Val Val Phe Val
1 5

<210> 75

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 75

20 Ser Val Phe Ala Gly Val Val Gly Val
1 5

<210> 76

<211> 10

25 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

30

Ser Leu Ile Asn Val Gly Leu Ile Ser Val
1 5 10

35

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

40 <213> *Homo sapiens*

<400> 77

45

Ala Leu Ala Asp Gly Val Gln Lys Val
1 5

50 <210> 78

<211> 9

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 78

60 Thr Tyr Gly Glu Ile Phe Glu Lys Phe
1 5

<210> 79

65 <211> 9

<212> PRT

ES 2 317 379 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 79

5 Tyr Tyr Met Ile Gly Glu Gln Lys Phe
1 5

10 <210> 80

<211> 10

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

20 Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu
1 5 10

25 <210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanes Immundefizienz Virus

30

<400> 81

35 Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val
1 5

40

45

50

55

60

65