

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 596**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/863 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08000554 .9**
96 Fecha de presentación: **30.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1932915**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2008**

54 Título: **Materiales y procedimientos relacionados con estrategias de vacunación mejoradas**

30 Prioridad:
30.07.2001 GB 0118532

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2012

73 Titular/es:
**ISIS INNOVATION LIMITED
EWERT HOUSE, EWERT PLACE SUMMERTOWN
OXFORD OX2 7SG, GB**

72 Inventor/es:
**Cerundolo, Vincenzo;
Palmowski, Michael J. y
Man-Lik Choi, Edward**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 381 596 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

Materiales y procedimientos relacionados con estrategias de vacunación mejoradas.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a materiales y procedimientos para mejorar las estrategias de vacunación. En particular, pero no exclusivamente, la invención se refiere a protocolos de vacunación de "sensibilización-refuerzo" en los que el sistema inmunitario es inducido por una composición de sensibilización y reforzado mediante la administración de una composición de refuerzo.
- 10 **[0002]** Los recientes avances en la capacidad para el seguimiento de la frecuencia de las respuestas de CTL a antígenos en ensayos ex vivo están mejorando rápidamente la capacidad para comparar diferentes protocolos de vacunación. En particular, el uso de complejos tetrámeros solubles de MHC de clase I/péptido (tetrámeros) proporciona una oportunidad para acelerar mucho el desarrollo de nuevas vacunas permitiendo el análisis rápido y preciso de respuestas de CTL humanos ¹⁻³.
- 15 **[0003]** Ha quedado claro que los protocolos de vacunación de sensibilización-refuerzo heterólogos, basados en inyecciones repetidas de vectores sin reacciones cruzadas, que codifican la misma proteína antigénica, dan como resultado respuestas de CTL fuertes, probablemente debidas a la concentración de la respuesta inmunitaria hacia los epítomos contenidos en las proteínas diana recombinantes ⁴. Resultados recientes han demostrado que la combinación de sensibilización con ADN plasmídico y el refuerzo con virus vaccinia defectuosos recombinantes MVA genera niveles altos de inmunidad específica ⁵⁻¹⁰.
- 20 **[0004]** Los alfavirus se han estudiado ampliamente como vectores víricos en protocolos de vacunación ¹¹⁻¹⁵. El alfavirus incompetente para la replicación, virus del bosque de Semliki (SFV), ha demostrado ser capaz de inducir anticuerpos y CTL dirigidos contra los antígenos extraños codificados ^{14,15}. El pequeño tamaño del genoma del SFV ¹⁶, hace que este virus sea muy atractivo para las estrategias de vacunación, ya que la expresión de un número pequeño de proteínas estructurales víricas maximiza las posibilidades de generar una respuesta inmunitaria específica contra las proteínas recombinantes, más que contra las proteínas estructurales víricas.
- 30 **[0005]** Varios estudios han demostrado que los virus y las células tumorales eluden respuestas inmunitarias específicas mutando o eliminando proteínas antígenas ^{17,18}. Con el fin de minimizar la generación de variantes de virus o tumores con pérdida de antígeno, las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna deben ser específicas para una amplia variedad de epítomos diferentes, posiblemente codificados por diferentes proteínas. Este razonamiento ha conducido a la generación de vacunas que codifican cadenas de epítomos de CTL, dirigidas a
- 35 aumentar simultáneamente CTL con diferente especificidad. La vacunación de ratones transgénicos A2 ha mostrado que múltiples epítomos codificados en construcciones de poliepítomos, pueden sensibilizar cada uno CTL específicos, lo que sugiere la viabilidad de este procedimiento para ensayos clínicos de inmunoterapia ¹⁹⁻²². Sin embargo, debido a las limitaciones técnicas de los ensayos para el seguimiento directo de las respuestas de CTL en estos ratones, faltan pruebas de que las construcciones polivalentes sean capaces de aumentar los CTL de muchas
- 40 especificidades a niveles eficaces.
- [0006]** Hay esperanza de que las vacunas de poliepítomos serán capaces de inducir respuestas amplias basadas en linfocitos T citotóxicos (CTL) en seres humanos. La administración de una pluralidad de epítomos está dirigida al aumento simultáneo de CTL con diferente especificidad. Aunque dichas construcciones polivalentes han
- 45 demostrado ser capaces de sensibilizar simultáneamente CTL de múltiples especificidades en animales, lo cual es claramente ventajoso, sigue sin estar claro si son capaces de reforzar posteriormente cada una de estas respuestas de CTL en niveles eficaces.
- [0007]** Se sabe que algunos epítomos son más eficaces en la producción de una respuesta inmunitaria que
- 50 otros. Algunos epítomos se pueden describir como dominantes, es decir, provocan una respuesta de CTL fuerte, mientras que otros se pueden describir como subdominantes, ya que provocan una respuesta más débil. Sin embargo, cuando se intenta producir una respuesta inmunitaria contra una amplia variedad de epítomos, es importante que los epítomos subdominantes no se ignoren en favor de los epítomos más dominantes.
- 55 **[0008]** Durante la etapa de sensibilización de un régimen de vacunación, los epítomos más dominantes provocan una respuesta de CTL mayor que los epítomos más débiles. Esto significa que después de un suceso de sensibilización inicial contra una pluralidad de epítomos, la respuesta de CTL es inevitablemente mayor para las especies más dominantes y menor para las especies subdominantes. Sin embargo, los autores de la presente invención han encontrado que la situación empeora cuando la misma pluralidad de epítomos se administra como una
- 60 construcción de poliepítomos durante la fase de refuerzo. Parece que esto es cierto incluso cuando el poliepítomo se proporciona en un vector/vehículo diferente que el de la fase de sensibilización. Los autores de la invención han encontrado que durante la etapa de refuerzo, la respuesta de CTL contra los epítomos más dominantes aumenta a una velocidad mayor que la respuesta de CTL contra el epítomo subdominante, en la medida en que el aumento de

la respuesta de CTL contra los epítomos subdominantes es significativamente menor. Esto significa que los CTL producidos contra los epítomos dominantes aumentan más a expensas de los CTL producidos contra los epítomos subdominantes. Como consecuencia, la proporción de CTL producidos contra los epítomos dominantes aumenta mientras que la proporción de los CTL producidos contra los epítomos subdominantes solo aumenta ligeramente.

5 Esto significa que la fase de refuerzo estrecha la respuesta inmunitaria en favor de la proliferación de CTL aumentados en la etapa de sensibilización inicial.

[0009] Los autores de la presente invención han determinado sorprendentemente un nuevo régimen de sensibilización-refuerzo que ayuda a superar el efecto potencialmente negativo de la fase de refuerzo en una pluralidad de epítomos dominantes y subdominantes.

[0010] Notablemente, los autores de la invención han encontrado que se puede reforzar de forma más uniforme a niveles eficaces una respuesta de CTL amplia si, después de la etapa de sensibilización, los epítomos se usan individualmente para reforzar la respuesta en contraposición a ser administrados como una sola construcción de poliepítomos. Mediante el refuerzo con los epítomos individuales, los autores de la invención han encontrado que los CTL producidos contra los epítomos dominantes no son reforzados a expensas de los CTL producidos contra los epítomos subdominantes. Sino que son reforzados igualmente.

[0011] Específicamente, y como se ilustra más adelante, los autores de la invención han usado ADN y vectores víricos que codifican una cadena de epítomos de melanoma, para demostrar que las vacunaciones de sensibilización-refuerzo dan como resultado el aumento de un repertorio estrecho de CTL. En la etapa de refuerzo, los autores de la invención encontraron que la competición de CTL para el reconocimiento de células presentadoras de la construcción de poliepítomos favorece la respuesta hacia los CTL que han aumentado más eficazmente durante la sensibilización. A diferencia de esto, los autores de la invención han encontrado que se obtiene el aumento simultáneo de los CTL específicos contra determinantes dominantes y subdominantes cuando las APC presentaban los epítomos por separado durante la fase de refuerzo. Esto se podía lograr, por ejemplo, por inyección de una mezcla de virus que codifique cada uno un antígeno separado, o por inyección de una mezcla de APC presentadoras de los epítomos por separado.

[0012] Por lo tanto, la invención proporciona materiales para inducir una respuesta basada en CTL específica pero amplia contra una pluralidad de epítomos, en la que se usa la construcción de poliepítomos Mel3 (Tabla 1) en la fase de sensibilización de un régimen de vacunación, pero se usan inmunógenos que codifican o comprenden los epítomos individualmente para la fase de refuerzo.

[0013] La invención proporciona además una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la construcción Mel3 mostrada en la tabla 1.

[0014] La invención proporciona además una secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de la tabla 1.

[0015] La invención también proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la tabla 1.

[0016] Además, la invención proporciona uno o más vehículos que comprenden las secuencias del polinucleótidos o de aminoácidos de la invención.

[0017] La presente invención surge de la determinación de que la fase de refuerzo es considerablemente más eficaz en la inducción de una respuesta basada en CTL específica pero amplia contra una pluralidad de epítomos, si esos epítomos se administran de forma individual.

[0018] En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8⁺, contra una pluralidad de epítomos en un individuo, comprendiendo dicho medicamento una composición de sensibilización que comprende una construcción de poliepítomos que codifica o comprende dicha pluralidad de epítomos, y una composición de refuerzo que comprende una pluralidad de construcciones individuales cada una comprendiendo uno de dicha pluralidad de epítomos; en el que dicha construcción de poliepítomos se muestra en la tabla 1.

[0019] De acuerdo con este aspecto adicional, la construcción puede ser un péptido (proteína/polipéptido) o una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho péptido. Se prefiere que las construcciones se administren usando un vehículo capaz de presentar los epítomos eficazmente al sistema inmunitaria del individuo. Por lo tanto, cuando la construcción es una secuencia de ácido nucleico, esta puede estar contenida en un vector de expresión de ácido nucleico, es decir, un plásmido o vector vírico. Estos vectores pueden estar contenidos igualmente en una célula tal como una célula presentadora de antígeno (APC).

[0020] Cuando la construcción es un péptido, puede ser preferible usar una célula, más preferiblemente una APC como vehículo, ya que estas células son capaces de presentar péptidos de forma eficaz al sistema inmunitario. Los ejemplos de APC incluyen células dendríticas y linfocitos.

5

[0021] La administración de las construcciones a un individuo usando vehículos se describe con más detalle más adelante.

[0022] La composición de sensibilización puede comprender uno o más vectores de ácidos nucleicos, conteniendo cada uno un ácido nucleico que codifica una pluralidad de epítomos como se muestra en la tabla 1. Alternativamente, la composición de sensibilización puede comprender péptidos o antígenos que contienen una pluralidad de epítomos como se muestra en la tabla 1.

[0023] En este aspecto adicional, la composición de sensibilización comprende una cadena de epítomos, es decir una construcción de poliepítomos. Sin embargo, el medicamento puede incluir alternativamente una o más construcciones que codifican o comprenden uno o más de la pluralidad de epítomos. Sin embargo, en esta situación, se prefiere que el régimen de sensibilización-refuerzo sea un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo. En otras palabras, si la composición de sensibilización comprende epítomos individuales, la composición de refuerzo preferiblemente lleva o presenta sus epítomos individuales usando vehículos diferentes y sin reacciones cruzadas.

15
20

[0024] Por ejemplo, cuando se usan construcciones de ácido nucleico, se pueden usar diferentes vectores víricos en la fase de sensibilización y refuerzo. Igualmente, para las construcciones de péptidos, se pueden usar diferentes células APC entre la fase de sensibilización y refuerzo, p. ej., linfocitos B para la sensibilización y células dendríticas para el refuerzo.

25

[0025] Esta es una realización preferida de la invención, pero debe apreciarse que los regímenes de sensibilización-refuerzo homólogos también están considerados en el presente documento, en particular cuando se usan construcciones peptídicas.

[0026] También se prefiere que todas las construcciones de ácido nucleico de sensibilización sean construcciones recombinantes, por ejemplo, cualquier construcción genética como construcciones víricas recombinantes, construcciones de ADN, construcciones de ARN o células transfectadas o transducidas con dichas construcciones. Además, la composición de sensibilización puede comprender péptidos o proteínas separados y células que se cargan de forma extra o intracelular con dichos péptidos o proteínas. Los péptidos pueden formar parte de una construcción de fusión con una proteína vehículo o adyuvante. Estas se pueden producir como proteínas de fusión.

30
35

[0027] Cuando las composiciones de sensibilización o refuerzo comprenden péptidos o proteínas, estos se pueden suministrar usando células presentadoras de antígeno (APC), por ejemplo células dendríticas o linfocitos (linfocitos B), pulsadas con péptido y/o proteína (incluyendo el suministro intracelular de péptidos o proteínas en las APC). Las APC, una vez pulsadas con péptidos o proteínas también se pueden infectar con virus con el fin de ayudar a activar la APC, es decir, en este caso el virus actúa como un adyuvante para el péptido.

40

[0028] También se pueden usar partículas tales como perlas se sepharosa o perlas de quitina para imitar las APC y presentar complejos de péptido/MHC y moléculas coestimuladoras para la estimulación del sistema inmunitario.

45

[0029] También se pueden pulsar exosomas u otros cuerpos subcelulares derivados de las APC con el péptido y/o proteína (incluyendo el suministro intracelular de péptidos o proteínas en los exosomas) para suministrar los epítomos peptídicos.

[0030] También se puede administrar el péptido o proteína directamente al individuo, preferiblemente en sitios separados. El péptido o proteína administrados de esta forma se acompañan preferiblemente con un adyuvante en la fase de sensibilización o refuerzo.

50

[0031] Cuando se proporciona un vector de ácido nucleico como vehículo, es preferible que el ácido nucleico que codifica los epítomos esté operativamente unido a secuencias reguladoras para producir dicho antígeno en el individuo, por expresión del ácido nucleico.

55

[0032] Puesto que la composición de sensibilización presenta una pluralidad de epítomos contenidos en la construcción MeI3 (tabla 1), el sistema inmunitario del individuo induce una respuesta de CTL amplia pero específica.

60

[0033] A diferencia de la composición de sensibilización, la composición de refuerzo presenta los epítomos siempre de forma individual. Esto supera el problema determinado por los autores de la invención, de que las respuestas de

CTL de memoria preexistente reducen significativamente la respuesta de CTL contra otros epítomos contenidos en la misma construcción durante la fase de refuerzo.

[0034] La composición de sensibilización o la composición de refuerzo, cuando se usan construcciones de ácido nucleico, pueden comprender además cualquier vehículo para llevar la construcción de ácido nucleico que codifica los epítomos, p. ej., un vector vírico, tal como vectores adenovíricos, vectores de virus del Herpes simple, vector del virus vaccinia. El vector vírico pueden ser un vector modificado, deficiente para la replicación, p. ej., virus Ankara modificado (MVA), o puede ser un vector del virus de la viruela aviar, p. ej. de la viruela de las aves de corral, viruela del canario, etc. Los vectores preferidos incluyen el alfavirus incompetente para la replicación, virus del bosque de Semliki (SFV). Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la materia.

[0035] La composición de cebado puede comprender ADN que codifica el antígeno. El ADN puede estar en forma de un plásmido circular que no es capaz de replicación en células de mamíferos. La expresión del antígeno preferiblemente será dirigida por un promotor activo en células de mamíferos, p. ej., promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV IE).

[0036] La respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+ se puede sensibilizar usando una vacuna de ADN, Ty-VLP o virus vaccinia Ankara modificado recombinante (MVA). En los ejemplos proporcionados más adelante, los autores de la invención describen realizaciones de la invención usando un virus vaccinia MVA recombinante de ADN plasmídico desnudo, y virus del bosque de Semliki (SFV) durante la fase de cebado. Sin embargo, el experto en la materia apreciará que se pueden usar igualmente otros vectores, víricos o de otro tipo.

[0037] Como se ha mencionado antes, se prefiere usar un vehículo diferente sin reactividad cruzada, tal como un vector de expresión de ácido nucleico, p. ej., un vector vírico, para presentar el epítomo durante la fase de refuerzo, al usado durante la fase de sensibilización. En los ejemplos proporcionados más adelante, se usó ADN plasmídico como un vector vehículo durante la fase de sensibilización y se usaron vectores vaccinia, MVA y/o SFV como vehículos durante la fase de refuerzo. Puesto que se usarán múltiples vectores como vehículos durante la fase de refuerzo, estos pueden ser iguales o diferentes.

[0038] También se describe en el presente documento un nuevo régimen de vacunación que se puede usar como un procedimiento de vacunación de un individuo contra patógenos, incluyendo autoantígenos o antígenos tumorales. Más adelante se ilustra el uso de los antígenos NY-ESO-1, tirosinasa y melan-A. Sin embargo, otros antígenos serán conocidos o serán determinados por el experto en la materia.

[0039] Además, se describe en el presente documento un modelo de vacunación para ensayar y establecer estrategias o regímenes de vacunación. Por lo tanto, el modelo de vacunación permite establecer regímenes de vacunación que maximizan una respuesta basada en CTL específica pero amplia contra una pluralidad de epítomos.

[0040] Es habitual ensayar regímenes de vacunas en animales de laboratorio tales como ratones antes del ensayo en seres humanos en ensayos clínicos. En el pasado se han usado ratones transgénicos para ensayar respuestas contra antígenos o epítomos particulares. Es importante proporcionar un entorno biológico que sea tan equivalente como sea posible al entorno humano. Por lo tanto, se producen ratones transgénicos que tienen capacidad de expresar moléculas MHC humanas. En los ejemplos proporcionados más adelante, los autores de la invención han usado dos formas de ratones transgénicos.

[0041] En primer lugar, han usado ratones transgénicos HHD A2 que expresan una molécula de histocompatibilidad de clase I monocatenaria transgénica en la que el extremo C de $\beta 2m$ humano está covalentemente unido al extremo N de una cadena pesada quimérica (dominios transmembrana e intracitoplasmáticos HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$, H-2D^b $\alpha 3$). Los genes H-2D^b y $\beta 2m$ de ratón de estos ratones se han alterado por recombinación homóloga, dando como resultado la carencia completa de expresión en la superficie celular detectable por serología de las moléculas de histocompatibilidad de clase I de ratón.

[0042] En segundo lugar, los autores de la invención han usado ratones A2-K^b que expresan una cadena pesada quimérica (dominios transmembrana y citoplasmáticos HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$, H-2K^b $\alpha 3$), en asociación no covalente con $\beta 2m$ de ratón.

[0043] Por lo tanto, ambos ratones transgénicos expresan una MHC quimérica en la que los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ derivan de MHC A2 humana y el dominio $\alpha 3$ es de H-2K^b o H-2D^b murino. Estos ratones se denominan ratones transgénicos A2. Sin embargo, la presente invención se puede llevar a cabo igualmente en ratones transgénicos HLA-A1, HLA-A3 o HLA-A4, es decir, cualquier otro modelo murino que exprese moléculas de clase I humanas de una forma similar a como lo hacen los ratones transgénicos A2.

[0044] También se describe en el presente documento un procedimiento para ensayar un régimen de vacunación que comprende las etapas de administrar una composición primaria a un animal de ensayo, comprendiendo dicha composición primaria un ácido nucleico que codifica una pluralidad de epítomos que se van a ensayar, posteriormente administrar una composición de refuerzo, comprendiendo dicha composición de refuerzo una pluralidad de vectores de ácido nucleico que contienen uno de dicha pluralidad de epítomos que se ensayan; y determinar la respuesta de CTL contra cada uno de los epítomos que se ensayan.

[0045] Preferiblemente, el animal de ensayo será un animal transgénico que proporcione un entorno inmunitario tan cercano como sea posible al entorno inmunitario humano. El animal de ensayo preferido es un ratón transgénico A2 como se describe en el presente documento.

[0046] Como se ha discutido antes, el vector de sensibilización preferiblemente es un plásmido de ADN o vector vírico. Sin embargo, los vectores de refuerzo preferiblemente son diferentes del vector de sensibilización. En una realización preferida el vector de sensibilización es ADN y el vector de refuerzo se selecciona del grupo de virus vaccinia, MVA y/o SFV. El SFV es el vector preferido para la fase de refuerzo, ya que los autores de la invención han determinado que se logran resultados excelentes cuando se usan después del vector de sensibilización de ADN o con MVA como vector de refuerzo. El SFV no tiene reacciones cruzadas con MVA y por lo tanto estos vectores inmunógenos se pueden usar juntos de forma eficaz. Los autores de la invención también han encontrado que las construcciones de ácido nucleico, sean parte de un vector vírico o no, se pueden administrar asociadas con una célula de mamífero, de modo que los antígenos sean presentados en su superficie. Dichas células se conocen como células presentadoras de antígeno (APC) cuando el antígeno se presenta en su superficie. Por lo tanto, el término APC incluye células tales como células tumorales. El uso de las APC para llevar la construcción es particularmente preferido durante la etapa de refuerzo. Por lo tanto, los posibles reaccionantes de refuerzo incluyen APC, tales como células dendríticas o linfocitos transfectados o transducidos con la construcción de ácido nucleico vírico o no vírico o células tumorales que presentan antígeno.

[0047] Se prevé que la administración de una composición de sensibilización sea seguida por composiciones de refuerzo, siendo diferentes entre sí la composición de sensibilización y la composición de refuerzo, p. ej., como se ilustra a continuación. Sin embargo, se pueden administrar una segunda y tercera composición de refuerzo en el procedimiento de la presente invención, como se ha mencionado antes. En una realización, un régimen de inmunización triple usa ADN que expresa una pluralidad de epítomos contenidos en la construcción Mel3 (tabla 1); seguido de SFV como una primera composición de refuerzo, en el que se usan una pluralidad de vectores de SFV cada uno comprendiendo uno de la pluralidad de epítomos de sensibilización; seguido del MVA como una tercera composición de refuerzo en la que se usa una pluralidad de vectores de MVA, cada uno comprendiendo uno de la pluralidad de epítomos de sensibilización. Alternativamente, la composición de refuerzo de SFV se puede administrar después de la composición de refuerzo de MVA.

[0048] Igualmente, cuando los péptidos se administran directamente, también se pueden usar APC pulsadas con péptidos, exosomas o miméticos de APC, para varias etapas de refuerzo secuenciales. Esto se puede lograr mediante inyecciones secuenciales.

[0049] En todos los casos, se prefiere administrar (p. ej., por inyección) la composición de sensibilización y de refuerzo varias veces para asegurar el suministro satisfactorio.

[0050] A la sensibilización con vectores que expresan una pluralidad de epítomos contenidos en la construcción Mel3, le puede seguir una mezcla de virus recombinantes (es decir, SFV o MVA) que comprenden uno o más de la pluralidad de epítomos de sensibilización y seguido por un refuerzo adicional basado en la inyección de péptidos, que codificando cada uno de ellos uno de la pluralidad de epítomos de sensibilización.

[0051] Ahora se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras que acompañan.

Breve descripción de las figuras

[0052]

Tabla 1, construcción del epítomo poly-CTL. El gen del epítomo poly-CTL (mel3) se construyó como una sola cadena de epítomos. El casete de Mel3 se clonó en cuatro vectores distintos: ADN desnudo, virus vaccinia WR, MVA y SFV.

Fig. 1. Procesamiento y presentación eficaces de CTL mel3. Se infectaron linfocitos B positivos para HLA A2 y HLA A1 con mel3.MVA y se usaron como dianas de clones de CTL específicos contra cada epítomo contenido en la construcción de mel3.poly-CTL. Encima de cada panel se muestran la especificidad de cada clon de CTL y el porcentaje de lisis específica. Las células diana se pulsaron con péptido relevante (+ péptido), no se pulsaron (-

péptido), se infectaron con MVA mel3 (MVA.mel3) o un virus vaccinia irrelevante (vac irr). Se usaron CTL específicos de NP 366-374 de ratón como células efectoras contra fibroblastos MC57 de ratón infectados con mel3.MVA.

Cada barra corresponde a una relación de efector a diana diferente: barras negras 10:1, barras blancas 3:1, barras rayadas 1:1.

Fig. 2. Frecuencia ex vivo de CTL específicos de NP 366-374 en ratones inmunizados con estrategias de vacunación de sensibilización y refuerzo homólogas y heterólogas. Cada panel corresponde a un procedimiento de vacunación diferente.

10

Fig. 3. Sensibilización-refuerzo de ratones A2/Kb con DNA.mel3 seguido de MVA.mel3.

A. Generación simultánea de CTL restringidos por Db y A2 en ratones transgénicos A2/Kb. Los ratones se sensibilizaron por vía i.m. con DNA-mel3 y se reforzaron 10 días después por vía i.v. con MVA-mel3. Se llevó a cabo el análisis ex vivo de tetrámeros de DB/NP366-374 y de A2/melan-A 26-35. Se muestra la frecuencia de células positivas para los tetrámeros en cada ratón vacunado después de 3 días desde el refuerzo de MVA.

B. Efecto de la respuesta de CTL de memoria preexistente específica contra un solo determinante contenido en la construcción del poliepitopo de CTL. Se inmunizaron ratones A2/Kb por vía i.n. con virus influenza y posteriormente se les inyectó DNA.mel3 seguido de MVA.mel3. Se llevó a cabo el análisis ex vivo de tetrámeros de Db/NP366-374 y A2/melan-A 26-35. Se muestra la frecuencia de células positivas para los tetrámeros en cada ratón vacunado después de 3 días desde el refuerzo de MVA.

Fig. 4. Jerarquía de CTL dirigidos por vacuna de sensibilización-refuerzo. Se sensibilizaron ratones HHD con DNA.mel3 y se reforzaron con vac.Mel3 (A), MVA.mel3 (B) o SFV.mel3 (C). Se midieron simultáneamente las frecuencias de las respuestas específicas de melan-A, tirosinasa y NY-ESO-1 mediante tinción de tetrámeros ex vivo. A los ratones sensibilizados con DNA.mel3 y reforzados con SFV.mel3 (grupo C) se les inyectaron esplenocitos marcados con fluorocromo pulsados con el péptido melan-A, tirosinasa o NY-ESO-1. Se muestra el porcentaje de muerte in vivo (D).

30

Fig. 5. La inmunodominancia de CTL específicos de melan-A se puede superar mediante el refuerzo con poli-vaccinia o mediante transferencia adoptiva de esplenocitos infectados in vitro. Ratones HHD sensibilizados con DNA.mel3 se reforzaron con una mezcla de virus vaccinia que codificaban la tirosinasa de longitud completa y NY-ESO-1 de longitud completa (A). Alternativamente, se inyectó a los ratones HHD sensibilizados con DNA.mel3 tres partes alícuotas de esplenocitos infectados por separado in vitro con virus vaccinia con tirosinasa de longitud completa, NY-ESO-1 de longitud completa y mel3 (B, paneles a, b y c) o con esplenocitos infectados con virus vaccinia con mel3 (B, paneles d, e y f). Se midió simultáneamente la frecuencia de las respuestas específicas de melan-A, tirosinasa y NY-ESO-1 mediante tinción de tetrámeros ex vivo.

Fig. 6. El refuerzo con poli-virus supera la inmunodominancia de CTL específicos de melan-A₂₆₋₃₅. Ratones HHD sensibilizados con DNA.mel3 se reforzaron con una mezcla de virus vaccinia que codificaban la tirosinasa de longitud completa, NY-ESO-1 de longitud completa y SFV.mel3 (A) o con SFV.mel3 (B). Se midieron simultáneamente las frecuencias de las respuestas específicas de melan-A₂₆₋₃₅, tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ y NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ mediante tinción de tetrámeros ex vivo. Se muestra la tinción de un solo ratón de seis. C y D: Se inyectaron a cada ratón esplenocitos marcados con fluorocromo pulsados con el péptido de melan-A₂₆₋₃₅, tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ o NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ y se calculó el % de lisis in vivo. El panel C corresponde a la muerte in vivo en ratones HHD sensibilizados con DNA.mel3 reforzados con una mezcla de virus vaccinia que codificaban la tirosinasa de longitud completa, NY-ESO-1 de longitud completa y SFV.mel3, mientras que el panel D corresponde a la muerte in vivo de ratones HHD sensibilizados con DNA.mel3 reforzados con SFV.mel3.

50

Fig. 7. El experimento muestra tinciones del tetrámero A2K^b de ratones sensibilizados con MVA.mel3 y reforzados con células dendríticas (DC) pulsadas con péptidos. Se muestran dos grupos de ratones: el grupo A (3 ratones) recibió DC pulsadas con una mezcla de 3 péptidos (melan-A, tirosinasa y NY-ESO-1) y el grupo B (4 ratones) recibió una mezcla de DC pulsadas con péptidos individuales. En la parte izquierda de la figura, se muestra una respuesta individual a tres epitopos de un ratón en cada grupo. En la parte derecha de la figura se muestra el porcentaje medio de CTL positivos para tetrámeros en cada grupo. Las barras de error indican la desviación típica de la media. El experimento muestra que las DC pulsadas con péptidos pueden reforzar eficazmente respuestas de CTL polivalentes sensibilizadas por MVA recombinante (comparar las figuras 4A, B y C). El experimento demuestra además que una mezcla de DC pulsadas con péptidos por separado para el refuerzo es más eficaz en el refuerzo de una respuesta polivalente comparado con las DC pulsadas con una mezcla de los péptidos.

60

Descripción detallada

Materiales y procedimientos

Construcción de ADN plasmídico

- 5 **[0053]** El vector de ADN pSG2, usado a lo largo del estudio, se obtuvo de pRc/CMV (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) mediante eliminación del fragmento BamHI que contiene el origen de replicación de SV40 y marcador de resistencia a la neomicina y sustituyendo el promotor de CMV con una versión más larga del mismo promotor que contiene el intrón A. El plásmido resultante contiene el promotor de CMV con el intrón A para la expresión en células eucariotas, seguido de un sitio de clonación múltiple y la secuencia de poli-A de la hormona del crecimiento bovina.
- 10 El plásmido no es capaz de replicación en células de mamífero. El gen que codifica la secuencia de mel3 (tabla 1) se introdujo en el sitio de clonación múltiple usando procedimientos estándar. El ADN plasmídico para inyección se purificó usando cromatografía de intercambio aniónico (Qiagen, Hilden, Alemania) y se diluyó en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a 1 ml de ADN/ml.

15 Generación de virus vaccinia y MVA recombinantes

- [0054]** Los MVA recombinantes y no recombinantes se propagaron de forma rutinaria y se valoraron en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) cultivados en medio esencial mínimo complementado con suero de ternero fetal al 10 % (FCS). Los MVA recombinantes se hicieron como se ha descrito por clonación de la cadena de polipéptidos de mel3 (tabla 1) en el vector lanzadera de virus vaccinia pSC11. Los CEF infectados con MVA con una multiplicidad de 0,05 ufp por célula se transfectaron con lipofectina (Gibco) y plásmido lanzadera como se ha descrito²³. El promotor P7.5 del virus vaccinia dirige la expresión del polipéptido. El MVA recombinante se purificó en placa 8 veces.
- 20
- 25 **[0055]** Se hicieron virus vaccinia (cepa WR) que expresaban mel3, NY-ESO-1 de longitud completa (proporcionado generosamente por Dennis L. Panicali, Therion Biologics Corporation, MA 02142, Estados Unidos) o tirosinasa, por clonación de la construcción de polipéptidos mel3, el ADNc de longitud completa de NY-ESO-1 y tirosinasa en el gen de timidina quinasa usando el vector pSC11 como se ha descrito previamente²⁴.

30 Generación de SFV recombinante

- [0056]** La cadena de polipéptidos mel3 se clonó en el vector de transferencia pSFV4.2-mel3. El ARN producido a partir de este vector se usó para construir partículas de SFVmel3 recombinantes. Se hicieron cepas de SFV recombinantes y se purificaron como se ha descrito previamente¹⁶.

35

Generación de clones de CTL humanos y ensayos de CTL

- [0057]** Se aislaron clones de CTL humanos como se ha descrito²⁵. Brevemente, los cultivos de CTL con tinción positiva doble de tetrámero/CD8 se separaron como células individuales en placas de 96 pocillos con fondo en U, previamente revestidas con anticuerpo dirigido contra CD3 y dirigido contra CD28 ambos 100 ng/ml en PBS, que contenían 10^5 linfocitos B irradiados en medio Iscove complementado con suero humano al 5 %, IL-2 100 U/ml. Los clones que proliferaban se expandieron hasta $> 10^7$ células y se usaron como efectores para ensayos de liberación de Cr⁵¹ estándar. Los autores de la invención usaron linfocitos B JY infectados con MVA mel3 como dianas para los CTL restringidos por HLA A2; linfocitos B XY para epítomos restringidos por HLA-A1 y células MC57 positivas para H-2b como dianas para la nucleoproteína de influenza restringida por D^b. Se valoraron los clones de CTL en diluciones de tres veces contra las dianas.
- 45

Síntesis de tetrámeros

- 50 **[0058]** Se sintetizaron complejos de HLA-A2.1/péptido tetrámeros fluorescentes como se ha descrito previamente¹. Los complejos de A2-Kb/péptido se sintetizaron de forma análoga usando una cadena pesada quimérica del dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la molécula A2.1 y el dominio $\alpha 3$ de la molécula H-2D^b con microglobulina $\beta 2$ humana.

Aislamiento de PBL y cadenas de tetrámeros

55

- [0059]** Se aislaron PBL recientes de sangre recogida de la vena de la cola usando tampón de lisis de glóbulos rojos (Invitrogen, Paisley, Reino Unido). Para las tinciones de tetrámeros se volvieron a suspender 3×10^5 células en 20 μ l de RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO) complementado con FCS al 10 %. Las células se incubaron con tetrámero durante 15 min a 37 °C. Después los PBL se incubaron con anticuerpo de rata dirigido contra CD8 α de ratón (Pharmingen, San Diego, CA) durante 15 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces en PBS y se volvieron a suspender en PBS para el análisis por FACScan (Becton Dickenson, Mountain View, CA).
- 60

Animales y protocolos de inmunización

[0060] Ratones HHD que expresan una molécula de histocompatibilidad de clase I monocatenaria transgénica en la que el extremo C de $\beta 2m$ humano está covalentemente unido al extremo N de una cadena pesada quimérica (dominios transmembrana e intracitoplasmáticos HLA-A2.1 $\alpha 1$ - $\alpha 2$, H-2D^b $\alpha 3$)²⁰. Los genes H-2D^b y $\beta 2m$ de ratón de estos ratones se han alterado por recombinación homóloga, dando como resultado la carencia completa de expresión en la superficie celular detectable por serología de las moléculas de histocompatibilidad de clase I de ratón. Los ratones A2-K^b expresan una cadena pesada quimérica (dominios transmembrana y citoplasmático HLA-A2.1 alfa 1- alfa 2, H-2K^b alfa 3) en asociación no covalente con $\beta 2m$ de ratón. Expresan además un conjunto completo de moléculas de histocompatibilidad de ratón de clase 1a y 1b derivadas de C57BL/6 (H-2^b). Todos los ratones transgénicos A2 usados se criaron en las instalaciones animales de los autores de la invención. Los ratones hembra C57/BL6 de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de Harlan Orlac (Shaws Farm, Blackthorn, Reino Unido) El ADN plasmídico (25-50 $\mu\text{g}/\text{músculo}$) se disolvió en PBS y se inyectó en cada uno de los músculos tibiales con anestesia general. 10 días después de inyección del ADN, los ratones se reforzaron con virus vaccinia recombinantes, que estaban diluidos en PBS a 10^6 - 10^7 ufp y se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola. Alternativamente, se infectaron por separado células de bazo recién aisladas (multiplicidad de infección de 5) con virus vaccinia con mel3, tirosinasa de longitud completa y NY-ESO-1 durante 90 min en RPMI complementado con BSA al 0,1 % a 37 °C. Las células se lavaron 3 veces y se volvieron a suspender en PBS estéril a una concentración de 6×10^7 células/ml se combinaron y se inyectaron en la vena lateral de la cola. Los ratones recibieron 6×10^6 células de bazo.

[0061] Ratones sensibilizados con virus influenza A (PR8) se infectaron por inyección de influenza vía intranasal (20 HAU/ratón). 30 días después se inyectó a los ratones DNA.mel3 seguido de MVA.mel3, como se ha descrito antes. Para la sensibilización o el refuerzo con SFV-mel3, se diluyeron 10^8 partículas de virus en PBS estéril y se inyectaron en la vena lateral de la cola.

Muerte in vivo

[0062] Células de bazo recientemente aisladas de ratones HHD se incubaron por separado en medio RPMI con diferentes péptidos a una concentración de 10^{-6} M durante 2 h. Después, cada grupo de células se etiquetó con una concentración diferente de éster de succinimidilo del diacetato de carboxifluoresceína (CFSE, Molecular Probes, Eugene, Oregón) para permitir el seguimiento simultáneo de las diferentes poblaciones in vivo²⁷, Hermans, I.F., Yang, J. y Ronchese, F. resultados no publicados. Las células marcadas se mezclaron y se inyectaron 10^7 células/ratón en la vena de la cola. Una población de control sin péptido que se había marcado con 5-(y-6)-((4-clorometil)benzoi)amino)tetrametilrodamina (CellTracker Orange, Molecular Probes, Eugene, Oregón) se coinyectó para evaluar la muerte de las dianas pulsadas con péptido con respecto a las células no pulsadas. Se extrajo sangre de los ratones en el momento de la inyección de las dianas marcadas con el fluorocromo para determinar sus frecuencias de CTL contra diferentes epítomos. Se siguió la desaparición de células con péptido/marcadas con fluorocromo usando análisis por FACS de PBMC recién aisladas 5 h después de inyección. El porcentaje de muerte se calculó con respecto a la población no pulsada marcada con Cell Tracker Orange. 100- (100x (%pulsadas/ %no pulsadas)). Se usó el software WinMDI 2.8 y CellQuest 3.3 para analizar los datos de FACS.

Resultados

[0063] Una cadena de epítomos de melanoma 5 HLA-A2 y 2 HLA-A1 se clonó en cuatro vectores distintos: a) un ADN plasmídico desnudo (mel3.DNA); b) virus vaccinia (mel3-vaccinia); c) virus vaccinia Ankara modificado (mel3.MVA); d) virus del bosque de Semliki (mel3-SFV). Para asegurar el seguimiento de las respuestas de CTL restringidas por moléculas de clase I humanas y de ratón, los autores de la invención introdujeron un epítomo adicional de la nucleoproteína de influenza (NP) restringida por moléculas de clase I H-2D^b. Puesto que habían mostrado previamente que la presentación del epítomo NP366-374 amino terminal puede ser afectada por los restos de aminoácidos vecinos²⁹, los autores de la invención decidieron expresar el epítomo NP366-379 de influenza en el extremo carboxilo terminal de la construcción del poliepítomos. La secuencia de las construcciones de poliepítomos usadas en el presente documento se muestran en la tabla 1.

55 Presentación eficaz de poliepítomos codificados por MVA

[0064] Se llevaron a cabo experimentos iniciales para comparar la afinidad de unión de A2 de cada epítomo contenido en la construcción de mel.3. Los resultados de estos experimentos demostraron que los epítomos del péptido mel3 tenían una amplia variedad de afinidades de unión por moléculas A2. El análogo peptídico melan-A 26-35²⁸ tenía la mayor afinidad de unión, mientras que los péptidos NY-ESO-1 157-165 y tirosina 1-9 tenían una afinidad significativamente menor, definida por su capacidad para inhibir con diferentes concentraciones la presentación del epítomo de la matriz de influenza 58-66 (no se muestran los datos). Los autores de la invención y

otros autores han demostrado previamente que los restos flanqueadores óptimos son importantes para asegurar la presentación de los epítomos restringidos por la clase I^{24,29}. Para establecer que los epítomos del péptido mel.3 eran procesados adecuadamente, y para evaluar que la competición por la unión a moléculas A2 no perjudica al reconocimiento por los CTL de los epítomos de menor afinidad, los autores de la invención infectaron células diana con virus vaccinia con mel.3 y demostraron que cada uno de los 7 epítomos contenidos en el casete del poliepítomo mel.3 era presentado simultáneamente a CTL específicos (fig. 1). Los autores de la invención habían mostrado previamente que la degradación dependiente del proteosoma perjudica la presentación del epítomo MAGE3 A2 271-279³⁰. Por lo tanto, fue sorprendente observar que la infección de células diana con virus vaccinia con mel3 era capaz de sensibilizarlas para la lisis por CTL específicos de MAGE3 271-279. Experimentos adicionales demostraron que el procesamiento del epítomo MAGE3 271-279 contenido en la construcción de mel3, a pesar de su procesamiento en la proteína MAGE3 de longitud completa, era resistente a lactacisteína e independiente de TAP (no se muestran los datos), de acuerdo con el procesamiento de la construcción mel.3 por proteasas residentes del retículo endoplásmico.

15 Respuestas de CTL específicos contra el NP 366-374 de influenza en ratones vacunados con vacunas codificadas por poliepítomos

[0065] La presentación eficaz del epítomo NP366-374 por células infectadas con virus vaccinia con mel3 llevó a los autores de la invención a evaluar en ratones C57/B6 la capacidad de diferentes estrategias de vacunación para inducir una respuesta fuerte de CTL específicos de NP366-374 (figura 2). El seguimiento ex vivo de la respuesta de CTL específicos de NP se llevó a cabo en PBL usando tetrámeros de Db/NP366-374 de influenza. Los autores de la invención compararon protocolos de vacunación de sensibilización y refuerzo homólogos frente a heterólogos (fig. 2) y analizaron las cinéticas de inducción de los CTL por sensibilización con ADN o MVA (no se muestran los datos). Los resultados de estos experimentos confirmaban que las estrategias de vacunación heterólogas eran capaces de inducir respuestas de CTL dirigidas por la vacuna de larga duración, con frecuencias de hasta 100 veces mayores que las frecuencias obtenidas por estrategias basadas en inyecciones repetidas del mismo sistema de suministro de antígeno (fig. 2).

30 Expansión de CTL restringidos por A2 en ratones transgénicos A2

[0066] Para ensayar la capacidad de las construcciones de poliepítomos mel.3 para sensibilizar respuestas de CTL restringidas por A2 in vivo, se sensibilizaron ratones transgénicos A2 con DNA-mel.3 y se reforzaron con MVA-mel.3, vaccinia-mel.3 o SFV-mel.3.

35 **[0067]** Los experimentos iniciales se llevaron a cabo usando ratones transgénicos A2.1, que expresan moléculas de A2.1 quiméricas que contienen el dominio Kb α_3 , y moléculas D^b y K^b endógenas (ratones A2/Kb)²⁶. Para permitir el seguimiento de las respuestas restringidas por A2 al mismo tiempo que la respuesta a NP366-374 de influenza restringida por D^p, los autores de la invención usaron nuevos tetrámeros A2/Kb, que también eran capaces de detectar los CTL relevantes directamente en PBL. La tinción simultánea con los tetrámeros de A2/Kb y D^p demostraba que la sensibilización de ratones A2/Kb con DNA-mel.3 seguido de MVA-mel.3, inducía respuestas de CTL específicas de melan-A 26-35 y de NP366-374 de influenza (fig. 3). En contraste con esto, las respuestas específicas a otros epítomos de mel.3 no eran detectables por tinciones de tetrámeros ex vivo (no se muestran los datos).

45 **[0068]** La capacidad para seguir simultáneamente respuestas de CTL contra el epítomo de NP 366-374 de influenza y el epítomo de melan-A 26-35, llevó a los autores de la invención a estudiar si la exposición previa al virus influenza podía comprometer la capacidad de los protocolos de sensibilización-refuerzo a aumentar los CTL específicos de melan-A 26-35 en ratones A2/Kb. Con el fin de generar una respuesta fuerte de CTL específicos de NP366-374, los ratones transgénicos A2 se inmunizaron con virus influenza y posteriormente recibieron DNA-mel.3 seguido de MVA-mel.3 (fig. 3). Los resultados de estos experimentos demostraron que el aumento de CTL específicos de NP366-374, antes de la vacunación con construcciones de poliepítomos mel.3, reducía significativamente el aumento de los CTL específicos de melan-A (fig. 3). El efecto inhibitorio de los CTL específicos de influenza preexistentes en la capacidad de la sensibilización-refuerzo con mel.3 para inducir respuesta de CTL específicos de melan-A (fig. 3) aumentaba la posibilidad de que la interferencia de linfocitos T durante las estrategias de vacunación heterólogas pudiera comprometer la inducción de una respuesta inmunitaria de amplia variedad. La presencia de moléculas de clase I endógenas de ratón estrecha significativamente el repertorio restringido por A2 en ratones A2/Kb, dificultando por lo tanto la capacidad de estudiar la interacción entre los CTL restringidos por A2 específicos para diferentes determinantes codificados por la vacuna.

60 **[0069]** Este razonamiento condujo a los autores de la invención al seguimiento de la jerarquía de las respuestas de CTL dirigidas por la vacuna tras los protocolos de sensibilización y refuerzo en ratones HDD transgénicos A2²⁰. Los ratones HDD, a diferencia de ratones transgénicos A2/Kb, expresan moléculas de clase I A2.1 unidas a

microglobulina β -2 humana en un contexto de Db^{-/-} y β -2m^{-/-}, y tienen un repertorio de linfocitos T restringidos por A2 mucho mayor que los ratones transgénicos A2/Kb²⁰.

5 La vacunación de sensibilización-refuerzo de ratones HHD induce una gran cantidad de CTL específicos de melanoma

[0070] La sensibilización de ratones HHD con DNA.mel3 condujo a la expansión de CTL específicos de melan-A a frecuencias detectables por tinción de tetrámeros ex vivo en todos los ratones vacunados (no se muestran los datos). A diferencia de esto, la expansión de CTL específicos de NY-ESO-1 y tirosinasa solo era detectable en una
10 proporción pequeña de ratones inmunizados, mientras que las respuestas a la tirosinasa 1-9 y Mage3 271-279 no eran detectables en tinciones de tetrámeros en la sangre (no se muestran los datos).

[0071] Experimentos adicionales confirmaron que las respuestas de CTL específicos de NY-ESO-1 eran sensibilizadas por inyección de DNA.mel3, como se muestra por la respuesta significativa de CTL específicos de NY-
15 ESO-1 en ratones sensibilizados con DNA.mel3 y reforzados con virus vaccinia que codifica NY-ESO-1 de longitud completa (no se muestran los datos). A diferencia de esto, la inyección de virus vaccinia con NY-ESO-1, sin la sensibilización con DNA.mel3, condujo a una frecuencia mucho menor de CTL contra NY-ESO-1. Se obtuvieron resultados similares tras la inyección de virus vaccinia con tirosinasa en ratones sensibilizados con DNA.mel3 (no se muestran los datos).

[0072] La observación de que los CTL específicos de melan-A 26-35 eran la respuesta dominante de CTL dirigida por la vacuna después de una sola vacunación con ADN, presentó la oportunidad de estudiar la interacción entre CTL específicos para diferentes determinantes codificados por la vacuna en protocolos de vacunación de sensibilización-refuerzo. Los autores de la invención observaron que el refuerzo de ratones HHD sensibilizados con
25 DNA.mel3, con vaccinia.mel3 (fig. 4a), MVA.mel3 (fig. 4b) o SFV.mel3 (fig. 4c), conducía al aumento de CTL específicos de melan-A, hasta 70 – 80 % de los linfocitos T CD8⁺ totales. Aunque las respuestas específicas contra los epítomos de NY-ESO-1 y tirosinasa eran significativamente menores que las respuestas específicas para melan-A, sus frecuencias estaban en el intervalo entre 2 y 30 % de los linfocitos T CD8⁺, confirmando que la sensibilización con ADN y el refuerzo con virus competentes para la replicación (es decir, Vac.mel3) o incompetentes
30 (MVA.mel3 y SFV.mel3) potencia significativamente la frecuencia de CTL específicos para tres epítomos específicos de melanoma diferentes. Los autores de la invención confirmaron que los CTL dirigidos por la vacuna eran citotóxicos, como muestra su capacidad para matar esplenocitos marcados con fluorocromo pulsados con péptidos relevantes in vivo (fig. 4d). Estos resultados demostraron que la respuesta acumulativa específica para melan-A, NY-ESO-1 y tirosinasa en ratones HHD sensibilizados con DNA.mel3 y reforzados con tres vectores víricos distintos daba cuenta
35 de la especificidad de la mayoría de la población de CD8⁺.

Competición de los CTL dirigidos por vacuna para APC que expresan mel.3

[0073] Puesto que los autores de la invención demostraron el efecto inhibitorio de una respuesta de CTL de memoria de influenza preexistente en la capacidad para inducir CTL específicos de melan-A (fig. 3), trataron de estudiar si el número alto de CTL específicos de melan-A, que dominaba la respuesta inmunitaria después de sensibilización con el ADN, era capaz de interferir con el aumento de CTL específicos de NY-ESO-1 y tirosinasa durante el refuerzo con virus.

[0074] Se sabe que la competición por el reconocimiento de antígenos en la superficie de las células presentadoras de antígenos conduce a la inmunodominancia de poblaciones de CTL de mayor frecuencia³¹⁻³³. Los autores de la invención razonaron que el número mayor de CTL para melan-A después de la sensibilización con DNA.mel3 podía conducir a la muerte rápida o protección de las APC infectadas con virus vaccinia con mel3 in vivo, dando como resultado una estimulación dificultada de los CTL específicos para los epítomos de NY-ESO-1 y
50 tirosinasa expresados por la misma población de APC.

[0075] Este razonamiento les condujo a evaluar si se podría obtener una frecuencia más alta de las respuestas de CTL específicos para NY-ESO-1 y tirosinasa separando las APC que expresaban proteínas NY-ESO-1 y tirosinasa de las APC que expresaban la construcción mel3. Los resultados de estos experimentos confirmaron esta hipótesis,
55 mostrada por: 1) el aumento de los CTL específicos de NY-ESO-1 y tirosinasa en ratones sensibilizados con DNA.mel3 y reforzados con una mezcla de virus vaccinia que codifican las proteínas tirosinasa de longitud completa y NY-ESO-1 de longitud completa (fig. 5a); 2) el aumento simultáneo de los CTL específicos de melan-A, NY-ESO-1 y tirosinasa tras transferencia adoptiva en ratones sensibilizados con DNA.mel3 de tres partes alícuotas de esplenocitos infectados ex vivo con virus vaccinia que codifican NY-ESO-1 de longitud completa, tirosinasa y la
60 construcción mel3 (fig. 5b, paneles a, b y c), mientras que la transferencia adoptiva de esplenocitos infectados con virus vaccinia con mel3 condujo al aumento de los CTL específicos de melan-A (fig. 5b, paneles d, e y f).

[0076] Los autores de la invención han demostrado que el refuerzo de ratones sensibilizados con DNA.mel3, con

una mezcla de virus recombinantes que codifican la tirosinasa de longitud completa, NY-ESO-1 de longitud completa y la construcción mel3, conduce al aumento simultáneo de CTL específicos de melan-A₂₆₋₃₅, NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ tirosinasa₃₆₉₋₃₇₇ (fig. 6a y b). La identificación de estrategias de vacunación satisfactorias para aumentar simultáneamente cantidades grandes de CTL con una especificidad amplia tiene aplicaciones clínicas importantes, ya que los autores de la invención mostraron que la inmunidad de linfocitos T inducida por este tipo de estrategias de refuerzo optimizadas proporciona una muerte in vivo más eficaz de las células diana que las vacunaciones basadas en estrategias de sensibilización y refuerzo de poliepitopos (fig. 6 c y d).

[0077] La inmunodominancia de los CTL específicos de melan-A se podía romper separando los antígenos durante el refuerzo. Cuando se usaron esplenocitos infectados por separado para reforzar una respuesta polivalente, los péptidos relevantes se presentaron por separado y se produjo el aumento simultáneo de CTL específicos de melan-A, tirosinasa y NY-ESO. Para simplificar este procedimiento, los autores de la invención usaron células dendríticas pulsadas con péptidos para reforzar una respuesta sensibilizada con MVA.mel3. Las células usadas para el refuerzo se pulsaron con una mezcla de péptidos (fig. 7a) o se pulsaron por separado (fig. 7b). Los autores de la invención mostraron que el pulsado por separado de las APC es superior al pulsado de las APC con una mezcla de péptidos. Este procedimiento también demuestra que las construcciones de poliepitopos codificadas en el virus vaccinia pueden sensibilizar eficazmente y las APC pulsadas con péptido pueden reforzar eficazmente una respuesta de CTL polivalente.

20 Discusión

[0078] Hay un gran impulso en el desarrollo de vacunas, ya que los avances recientes en el seguimiento de las respuestas de CTL específicas de antígeno en ensayos ex vivo están mejorando rápidamente la capacidad para comparar diferentes protocolos de vacunación. Con el fin de minimizar la generación de variantes tumorales y víricos con pérdida de antígeno, es importante asegurar la expansión de los CTL dirigidos por vacunas específicas para varios epítomos, incluyendo los determinantes tanto dominantes como subdominantes. Varias publicaciones han discutido las causas responsables de la inmunodominancia de los CTL específicos para antígenos víricos³⁴⁻³⁶ y antígenos de histocompatibilidad^{33, 37, 38}. Sin embargo, todavía queda por establecer cómo las estrategias óptimas pueden conducir al aumento simultáneo de CTL específicos para los epítomos dominantes y subdominantes.

[0079] Para abordar estas cuestiones, los autores de la invención diseñaron 4 vectores diferentes que codificaban una cadena de epítomos de CTL de melanoma (tabla 1), y compararon en ratones transgénicos A2 y ratones genéticamente intactos de tipo B6 la capacidad de las diferentes estrategias de vacunación para provocar respuestas de CTL específicas de la vacuna. Con el fin de identificar las estrategias capaces de aumentar los CTL específicos de determinantes dominantes y subdominantes, los epítomos peptídicos con afinidad de unión alta y baja por las moléculas A2 se unieron en la misma construcción. Más específicamente, los autores de la invención incluyeron el análogo de melan-A 26-35 modificado, que previamente había mostrado tener una inmunogenicidad potenciada in vivo²⁸, y el péptido NY-ESO-1 157-165, que mostró tener una afinidad de unión mucho menor por las moléculas A2³⁹ (tabla 1).

Jerarquía de los CTL dirigidos por vacunas en ratones vacunados con mel3

[0080] Los autores de la invención han desarrollado una nueva técnica basada en tetrámeros para el seguimiento directamente de la frecuencia de los CTL restringidos por A2 que aumentan en ratones transgénicos A2 vacunados en un régimen de sensibilización-refuerzo. Para aumentar la afinidad de unión de CD8 de ratón a moléculas A2, diseñaron moléculas A2 que contenían el dominio alfa 3 H-2K^b de ratón (moléculas A2/K^b), y demostraron que las moléculas A2K^b tetrámeras tienen una eficacia de tinción mayor para CTL restringidos por A2 de ratón y pueden identificar respuestas restringidas por A2 en una gran proporción de ratones transgénicos A2, comparado con moléculas A2 tetrámeras.

[0081] En el estudio de la respuesta inmunitaria en ratones A2Kb, los autores de la invención demostraron que la expresión de moléculas Db da como resultado una respuesta fuerte específica de NP366-374 de influenza, que dificulta significativamente el aumento de los CTL específicos para otros epítomos codificados por mel3. Con el fin de estudiar la interacción entre CTL restringidos por A2 específicos para diferentes determinantes codificados por la vacuna, los autores de la invención inmunizaron los ratones HDD transgénicos A2²⁰, que a diferencia de los ratones transgénicos A2Kb, expresan moléculas A2 en un contexto Db/-.

[0082] Aunque recientemente varias publicaciones han estudiado la respuesta inmunitaria en ratones transgénicos A2 vacunados con construcciones de poliepitopos^{19, 20, 40}, esta es la primera publicación en la que se ha seguido la jerarquía de los CTL dirigidos por vacunas de poliepitopos en ratones transgénicos A2 por tinción de tetrámeros ex vivo.

[0083] Los autores de la invención compararon varias estrategias de vacunación y confirmaron que las

inmunizaciones basadas en la inyección de vectores sin reacciones cruzadas (protocolos de sensibilización-refuerzo heterólogos) aseguran niveles mayores de respuestas inmunitarias específicas de las vacunas que las inmunizaciones basadas en las inyecciones de vectores homólogos (fig. 2). La presencia de anticuerpos neutralizantes contra proteínas estructurales víricas y la presencia de CTL específicos contra proteínas víricas pueden dar cuenta de las menores respuestas de CTL en ratones vacunados con inyecciones repetidas del mismo virus, comparado con las frecuencias de CTL tras la vacunación con vectores sin reacciones cruzadas (fig. 2). Se ha sugerido que el número limitado de proteínas codificadas por ADN plasmídico asegura que la sensibilización con ADN concentra la respuesta inmunitaria hacia la proteína recombinante, mientras que el refuerzo con virus expande satisfactoriamente esta respuesta, dando como resultado niveles altos de CTL específicos para la proteína recombinante. Sin embargo, los autores de la invención han mostrado que la sensibilización con MVA.mel3 o SFV.mel3 conduce a un aumento significativo de CTL específicos de NP366-374 tras el refuerzo con virus influenza o MVA.mel3, respectivamente (fig. 2), demostrando que la capacidad para sensibilizar CTL no es única de los vectores de ADN.

[0084] En ratones HHD transgénicos A2, debido a la falta de CTL restringidos por moléculas de clase I endógenas de ratón, la sensibilización y refuerzo heterólogos daba como resultado un gran aumento de CTL específicos de melan-A hasta 90 % de los linfocitos T CD8+ totales (fig. 4a), redirigiendo por lo tanto una gran proporción del repertorio restringido por A2 de ratones HHD hacia determinantes de CTL codificados por la vacuna. Varios factores pueden contribuir a la inmunodominancia de la respuesta de CTL específicos de melan-A. Es posible que una combinación de una mayor afinidad de unión por moléculas A2 y por TCR, junto con un procesamiento intracelular favorable, pueda desviar las respuestas de CTL hacia el epítipo de melan-A 36-35 en ratones sensibilizados con DNA.mel3.

[0085] Estudios previos han mostrado que la "eliminación" de respuestas de linfocitos T específicos contra epítipos no dominantes por respuestas de linfocitos T específicos de epítipos dominantes se observa solo cuando ambos tipos de determinantes están presentes en la misma APC^{32, 33, 38}. La inyección de un gran número de APC daba como resultado el aumento de linfocitos T específicos para los epítipos subdominantes⁴¹. Los autores de la invención han demostrado que la inmunodominancia del epítipo de melan-A 26-35 era superada por las estrategias de refuerzo basadas en la inyección de una mezcla de diferentes virus recombinantes (fig. 5a) o esplenocitos infectados in vitro por virus vaccinia individuales que codifican proteínas de longitud completa, en lugar de una construcción de poliepítipos (fig. 5b).

Implicaciones de las estrategias de vacunación en pacientes

[0086] Estos resultados son importantes ya que varios ensayos clínicos actualmente están usando protocolos de vacunación de sensibilización y refuerzo heterólogos con construcciones de poliepítipos. A la vez que los autores de la invención confirman la capacidad de los protocolos de sensibilización-refuerzo heterólogos para producir un número grande de CTL específicos de la vacuna, demuestran que durante los protocolos de sensibilización-refuerzo heterólogos, la frecuencia de las respuestas de CTL inmunodominantes aumenta significativamente frente a la frecuencia de las respuestas de CTL específicos para determinantes menos dominantes. Aunque hay numerosos mecanismos que pueden dar cuenta de un estrechamiento del repertorio de CTL que responde a una vacuna, los resultados de los autores de la invención están de acuerdo con un modelo de inmunodominancia basado en la competencia de linfocitos T por células presentadoras de antígeno (APC)^{32, 33, 38}. Hay que destacar que la inyección de vac.mel3 en ratones que no han recibido tratamiento previo, induce linfocitosis con un desplazamiento de la frecuencia de CD8+ de 0,5 % hasta 30 %, indicando una fuerte respuesta de CTL contra el virus vaccinia. De los linfocitos T CD8+ inducidos en la sangre, tantos como 50 % son específicos para melan-A 26-35 (no se muestran los datos), demostrando que melan-A 26-35 es uno de los epítipos más inmunodominantes expresados por el virus entre más de 200 proteínas del virus vaccinia responsables de la estructura, transcripción y replicación del virus. Esta observación tiene implicaciones clínicas importantes para el diseño de vacunas basadas en virus que codifican el epítipo de melan-A 26-35. El uso de SFV recombinante en protocolos de sensibilización-refuerzo es muy atractivo, ya que los autores de la invención han demostrado que los SFV se pueden usar tanto como vector de sensibilización en combinación con MVA (fig. 2) como para el refuerzo en combinación con ADN (fig. 4C). Estos resultados complementan una publicación reciente que demuestra en macacos la potenciación de las respuestas inmunitarias específicas del virus de inmunodeficiencia de simio inducidas por sensibilización con SFV recombinante y refuerzo con MVA 11.

[0087] Los autores de la invención demostraron que las respuestas de CTL de memoria preexistente reducen significativamente las respuestas de CTL específicas para otros epítipos contenidos en la misma construcción (fig. 3b). Puesto que varios grupos han usado epítipos de péptidos de influenza inmunodominantes como controles positivos durante ensayos de vacunación, el resultado de los autores de la invención sugiere que las vacunas basadas en ADN o virus no deberían codificar epítipos expresados por virus recurrentes, ya que la respuesta de CTL de memoria preexistente puede comprometer la inducción de respuestas de CTL específicos para otros determinantes de CTL codificados por la vacuna.

[0088] Los autores de la invención han mostrado además que la competición de los linfocitos T es probable que tenga una función en la modificación de las respuestas de linfocitos T en estrategias de vacunación de sensibilización-refuerzo. El trabajo de los autores de la invención sugiere que la presentación simultánea de diferentes epítomos a un repertorio asimétrico de CTL sensibilizados conduce al aumento dominante de una sola especificidad de CTL. Sin embargo, el refuerzo de la respuesta sensibilizada con APC presentando por separado los epítomos da como resultado el aumento comparable de los CTL de especificidades múltiples a niveles eficaces in vivo.

10 Referencias

[0089]

1. Altman, J.D. y col. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94 – 6. (1996).
2. Romero, P. y col. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1641 – 50. (1998).
3. Dunbar, P.R. y col. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr. Biol.* 8, 413 – 6. (1998).
4. Ramshaw, I.A. & Ramsay, A.J. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today* 21, 163 – 5. (2000).
5. Schneider, J. y col. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4, 397 – 402. (1998).
6. Hanke, T., Schneider, J., Gilbert, S.C., Hill, A.V. & McMichael, A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and Plasmodium falciparum: immunogenicity in mice. *Vaccine* 16, 426 – 35. (1998).
7. Hanke, T. & McMichael, A. Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol. Lett.* 66, 177 – 81. (1999).
8. Hanke, T. y col. Effective induction of HIV-specific CTL by multi-epitope using gene gun in a combined vaccination regime. *Vaccine* 17, 589 – 96. (1999).
9. Schneider, J. y col. Induction of CD8+ T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol. Rev.* 170, 29 – 38. (1999).
10. Amara, R.R. y col. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292, 69 – 74. (2001).
11. Nilsson, C. y col. Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Vaccine* 19, 3526 – 36. (2001).
12. Vidalin, O. y col. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitisCvirus core and E2 antigens. *Virology* 276, 259 – 70. (2000).
13. Berglund, P., Fleeton, M.N., Smerdou, C. & Liljestrom, P. Immunization with recombinant Semliki Forest virus induces protection against influenza challenge in mice. *Vaccine* 17, 497 – 507. (1999).
14. Mossman, S.P. y col.. Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. *J. Virol.* 70, 1953 – 60. (1996).
15. Zhou, X., Berglund, P., Zhao, H., Liljestrom, P. & Jondal, M. Generation of cytotoxic and humoral immune responses by nonreplicative recombinant Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3009 – 13. (1995).
16. Smerdou, C. & Liljestrom, P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J. Virol.* 73, 1092 – 8. (1999).
17. Dunbar, P.R. y col. A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies melanoma patients with an active tumor-specific immune response. *J. Immunol.* 165, 6644 – 52. (2000).
18. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. & Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* 74, 181 – 273 (2000).
19. Mateo, L. y col. An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy. *J. Immunol.* 163, 4058 – 63. (1999).
20. Firat, H. y col. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur. J. Immunol.* 29, 3112 – 21. (1999).
21. Loirat, D., Lemonnier, F.A. & Michel, M.L. Multi-epitopic HLA-A*0201-restricted immune response against hepatitis B surface antigen after DNA-based immunization. *J. Immunol.* 165, 4748 – 55. (2000).
22. Sandberg, J.K. y col. Human immunodeficiency virus type 1 Nef epitopes recognized in HLA-A2 transgenic mice in response to DNA and peptide immunization. *Virology* 273, 112 – 9. (2000).
23. Carroll, M.W. y col. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* 15, 387 – 94. (1997).
24. Gileadi, U., Gallimore, A., Van der Bruggen, P. & Cerundolo, V. Effect of epitope flanking residues on the presentation of N-terminal cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Eur. J. Immunol.* 29, 2213 – 22. (1999).
25. Dunbar, P.R. y col. Cutting edge: rapid cloning of tumor-specific CTL suitable for adoptive immunotherapy of

- melanoma. *J. Immunol.* 162, 6959 – 62. (1999).
26. Vitiello, A., Marchesini, D., Furze, J., Sherman, L.A. & Chesnut, R.W. Analysis of the HLA-restricted influenzaspecific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 173, 1007 – 15. (1991).
- 5 27. Barchet, W. y col. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8 (+) T cells in vivo. *Eur. J. Immunol.* 30, 1356 – 63. (2000).
28. Men, Y. y col. Assessment of immunogenicity of human Melan-A peptide analogues in HLA- A*0201/Kb transgenic mice. *J. Immunol.* 162, 3566 – 73. (1999).
29. Velders, M.P. y col. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established
10 tumors by an epitope string DNA vaccine. *J. Immunol.* 166, 5366 – 73. (2001).
30. Valmori, D. y col. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocytedefined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J. Exp. Med.* 189, 895 – 906. (1999).
31. Perkins, D.L., Berriz, G., Kamradt, T., Smith, J.A. & Geffer, M.L. Immunodominance: intramolecular competition between T cell epitopes. *J. Immunol.* 146, 2137 – 44. (1991).
- 15 32. Kedl, R.M. y col. T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 192, 1105 – 13. (2000).
33. Pion, S. y col. On the mechanisms of immunodominance in cytotoxic T lymphocyte responses to minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 27, 421 – 30. (1997).
34. Belz, G.T., Stevenson, P.G. & Doherty, P.C. Contemporary analysis of MHC-related immunodominance
20 hierarchies in the CD8+ T cell response to influenza A viruses. *J. Immunol.* 165, 2404 – 9. (2000).
35. Bousso, P., Lemaitre, F., Bilsborough, J. & Kourilsky, P. Facing two T cell epitopes: a degree of randomness in the primary response is lost upon secondary immunization. *J. Immunol.* 165, 760 – 7. (2000).
36. Chen, W., Anton, L.C., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I- restricted T cell responses to viruses. *Immunity* 12, 83 – 93. (2000).
- 25 37. Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 51 – 88 (1999).
38. Grufman, P., Wolpert, E.Z., Sandberg, J.K. & Karre, K. T cell competition for the antigen-presenting cell as a model for immunodominance in the cytotoxic T lymphocyte response against minor histocompatibility antigens. *Eur. J. Immunol.* 29, 2197 – 204. (1999).
- 30 39. Chen, J.L. y col. Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL. *J. Immunol.* 165, 948 – 55. (2000).
40. Woodberry, T. y col. Immunogenicity of a human immunodeficiency virus (HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8(+) cytotoxic T-cell epitopes. *J. Virol.* 73, 5320 – 5. (1999).
41. Sandberg, J.K. y col. Superdominance among immunodominant H-2Kb-restricted epitopes and reversal by
35 dendritic cell-mediated antigen delivery. *J. Immunol.* 160, 3163 – 9. (1998).

Tabla 1

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la construcción mel.3	Antígeno	Epítipo	Restricción
aga-tct-gcc-gcc-acc-			
atg-tta-cta-gct-gtt-ttg-tac-tgc-ctg- M L L A V L Y C L	Tirosinasa	1 – 9	(A2)
gaa-cta-gca-ggg-acc-ggc-ata-ttg-aca-gtg- E L A G I G I L T V	Melan-A	26 – 35 (*)	(A2)
tat-atg-gat-gga-aca-atg-tcc-cag-gta- Y M D G T M S Q V	tirosinasa	369 – 377	(A2)
gga-tct- G S	(conector)		
gaa-gtc-gat-cca-acc-gga-cat-ttg-tac- E V D P I G H L Y	Mage-3	167 – 175	(A1)
ttc-ctg-tgg-ggt-cca-aga-gcc-ctc-gtt- F L W G P R A L V	Mage-3	271 – 279	(A2)
gaa-gca-gac-ccc-acc-gga-cac-tcc-tat- E A D P T G H S Y	Mage-1	161 – 169	(A1)
gga-tct- G S	(conector)		
cag-ctt-tcc-ctg-ttg-atg-tgg-acc-acg-cag-tgc-ttt-ctg- Q L S L L M W I T Q C F L	NY-ESO-1	155 – 167	(A2)
gct-tca-aat-gaa-aac-atg-gat-gct-atg-tga A S N E N M D A M	Nucleoproteína de influenza	366 – 374	(Db)

(*) esta secuencia corresponde al análogo peptídico modificado en la posición 2 (Men y col.)

LISTA DE SECUENCIAS

[0090]

- 5 < 110 > Isis Innovation Limited
 Cerundolo, Vincenzo
 Palmowski, Michael J
 Man-Lik Choi, Edward
- 10 < 120 > Materiales y procedimientos relacionados con estrategias de vacunación mejoradas
 < 130 > JEC/BP6517478
 < 140 > Divisional de EP 02749089.5
 < 141 > 2002-07-30
- 15 < 150 > PCT/GB02/03496
 < 151 > 2002-07-30
 < 150 > GB 0118532.1
- 20 < 151 > 2001-07-30
 < 160 > 2
- 25 < 170 > PatentIn versión 3.1
 < 210 > 1
 < 211 > 261
 < 212 > ADN
- 30 < 213 > Secuencia artificial
 < 220 >
 < 223 > Construcción de poliepitopos de CTL
- 35 < 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (16)..(261)
 < 400 > 1
- | | |
|--|-----|
| agatctgccg ccacc atg tta cta gct gtt ttg tac tgc ctg gaa cta gca | 51 |
| Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Glu Leu Ala | |
| 1 5 10 | |
| | |
| ggg atc ggc ata ttg aca gtg tat atg gat gga aca atg tcc cag gta | 99 |
| Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val | |
| 15 20 25 | |
| | |
| gga tct gaa gtc gat cca atc gga cat ttg tac ttc ctg tgg ggt cca | 147 |
| Gly Ser Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr Phe Leu Trp Gly Pro | |
| 30 35 40 | |
| | |
| aga gcc ctc gtt gaa gca gac ccc acc gga cac tcc tat gga tct cag | 195 |
| Arg Ala Leu Val Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Gly Ser Gln | |
| 45 50 55 60 | |

40

ES 2 381 596 T3

ctt tcc ctg ttg atg tgg atc acg cag tgc ttt ctg gct tca aat gaa 243
 Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Ala Ser Asn Glu
 65 70 75

aac atg gat gct atg tga 261
 Asn Met Asp Ala Met
 80

- < 210 > 2
- 5 < 211 > 81
- < 212 > PRT
- < 213 > Secuencia artificial
- < 220 >
- 10 < 223 > Construcción de poliepitopos de CTL
- < 400 > 2

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile
 1 5 10 15

Leu Thr Val Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val Gly Ser Glu Val
 20 25 30

Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
 35 40 45

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr Gly Ser Gln Leu Ser Leu Leu
 50 55 60

Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala
 65 70 75 80

Met

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2.
5
2. Una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1.
3. Un plásmido de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la
10 reivindicación 1 o reivindicación 2.
4. Un vector de expresión de ácido nucleico que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 15 5. Un vector vírico que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
6. Un vector vírico de acuerdo con la reivindicación 5, que se selecciona del grupo que consiste en vector adenovírico, vector del virus Herpes simple, vector del virus vaccinia, vector del virus de la viruela aviar y vector de
20 alfavirus.
7. Un vector vírico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho vector alfavirus es el vector del virus del bosque de Semliki.
- 25 8. Un virus vaccinia Ankara modificado recombinante (MVA) que comprende la secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
9. Un plásmido de ADN de acuerdo con la reivindicación 3, para usar en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de CD8+ contra antígenos asociados a melanoma en un sujeto.
30
10. Un virus MVA recombinante de acuerdo con la reivindicación 8, para usar en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de CD8+ contra antígenos asociados a melanoma en un sujeto.
11. Un virus MVA recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, en el que a dicho sujeto se le ha
35 administrado previamente un plásmido de ADN de acuerdo con la reivindicación 3.
12. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO. 2.
13. Una célula que comprende el polipéptido de la reivindicación 12.
40
14. Una célula de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicha célula es una célula presentadora de antígeno.
15. Una célula de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha célula presentadora de antígeno es
45 una célula dendrítica o un linfocito.
16. Un vector de expresión de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 7, para usar en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de CD8+ contra antígenos asociados a melanoma en un
50 sujeto.
17. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 12, para usar en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de CD8+ contra antígenos asociados a melanoma en un sujeto.
18. Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para usar en un
55 procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria de CD8+ contra antígenos asociados a melanoma en un sujeto.
19. Un medicamento que comprende una composición de sensibilización y una composición de refuerzo para usar en un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, comprendiendo dicha
60 composición de sensibilización una construcción de poliepítopos que codifica o comprende una pluralidad de epítopos; comprendiendo dicha composición de refuerzo una pluralidad de construcciones individuales, cada una comprendiendo uno de dicha pluralidad de epítopos; en el que la construcción de poliepítopos se muestra en la SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

20. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha construcción de poliepítopos de sensibilización es una secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2.
- 5 21. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que dicha composición de refuerzo comprende construcciones de ácidos nucleicos individuales, cada una codificando uno de la pluralidad de epítopos.
22. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la composición de sensibilización comprende uno o más vehículos que llevan la construcción de poliepítopos.
- 10 23. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la composición de refuerzo comprende uno o más vehículos que llevan las construcciones de ácidos nucleicos.
24. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 22 o reivindicación 23, en el que el vehículo es un
15 vector de expresión de ácido nucleico.
25. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el vector de expresión del ácido nucleico es un vector vírico.
- 20 26. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en vector adenovírico, vector del virus Herpes simple, vector del virus vaccinia, vector del virus de la viruela aviar y vector de alfavirus.
27. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicho vector alfavirus es el vector del
25 virus del bosque de Semliki.
28. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la construcción de poliepítopos de sensibilización es un péptido, polipéptido o proteína que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 30 29. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que las construcciones de refuerzo son péptidos, polipéptidos o proteínas individuales, cada una comprendiendo uno de dicha pluralidad de epítopos.
30. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 28, en el que dicha composición de sensibilización
35 comprende además uno o más vehículos que llevan la construcción de poliepítopos.
31. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 29, en el que dicha composición de refuerzo comprende además uno o más vehículos que llevan las construcciones individuales.
- 40 32. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 30 o reivindicación 31, en el que el vehículo es una célula.
33. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 32, en el que la célula es una célula presentadora de antígeno.
- 45 34. Un medicamento de acuerdo con la reivindicación 33, en el que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica o un linfocito.
35. Un medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 34, en el que la
50 respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+ .
36. Una célula que comprende una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1.
37. Una célula de acuerdo con la reivindicación 36, en la que dicha célula es una célula presentadora de
55 antígeno.
38. Una célula de acuerdo con la reivindicación 37, en la que dicha célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica, un linfocito o una célula tumoral.

Figura 1

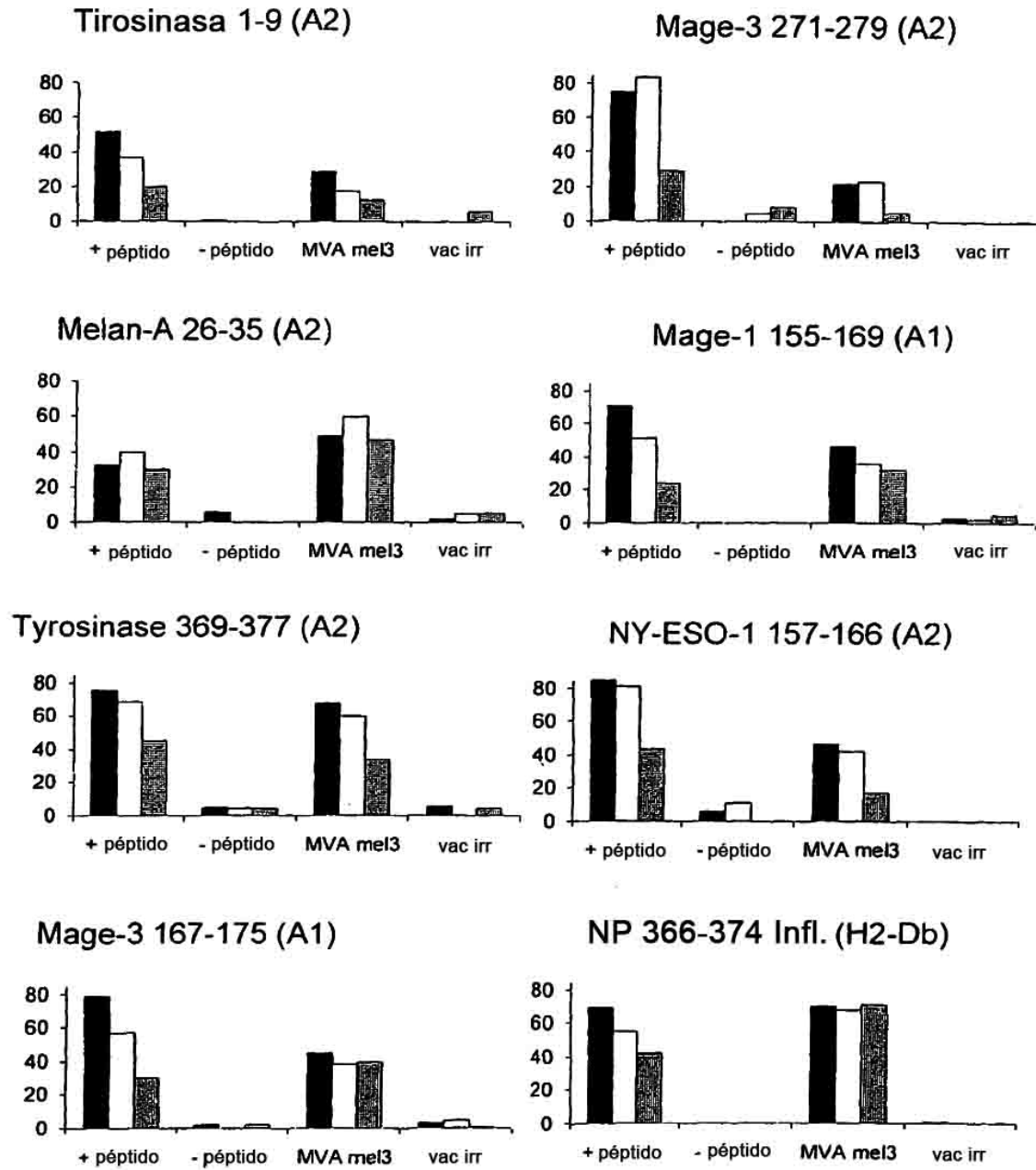


Figura 2

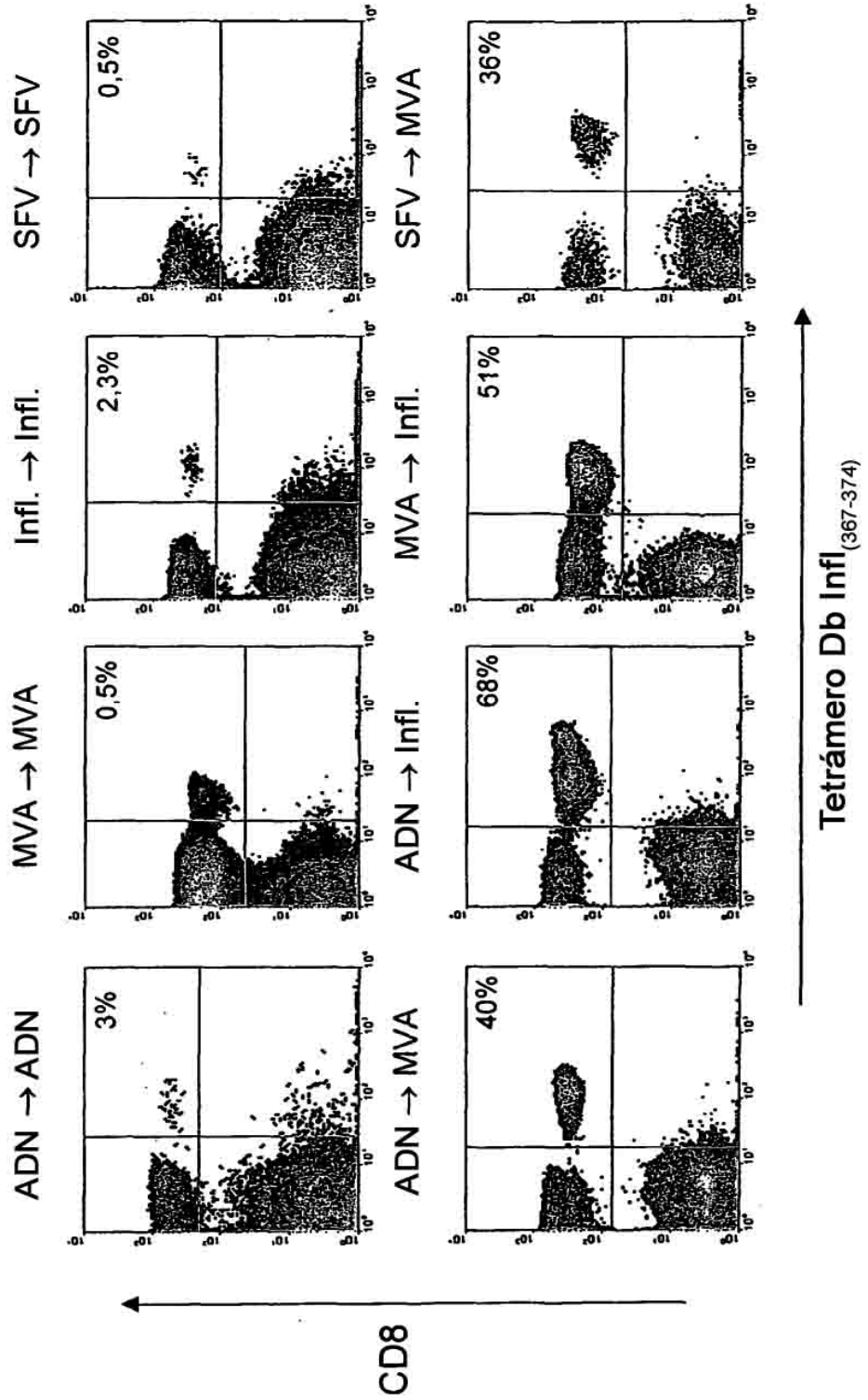
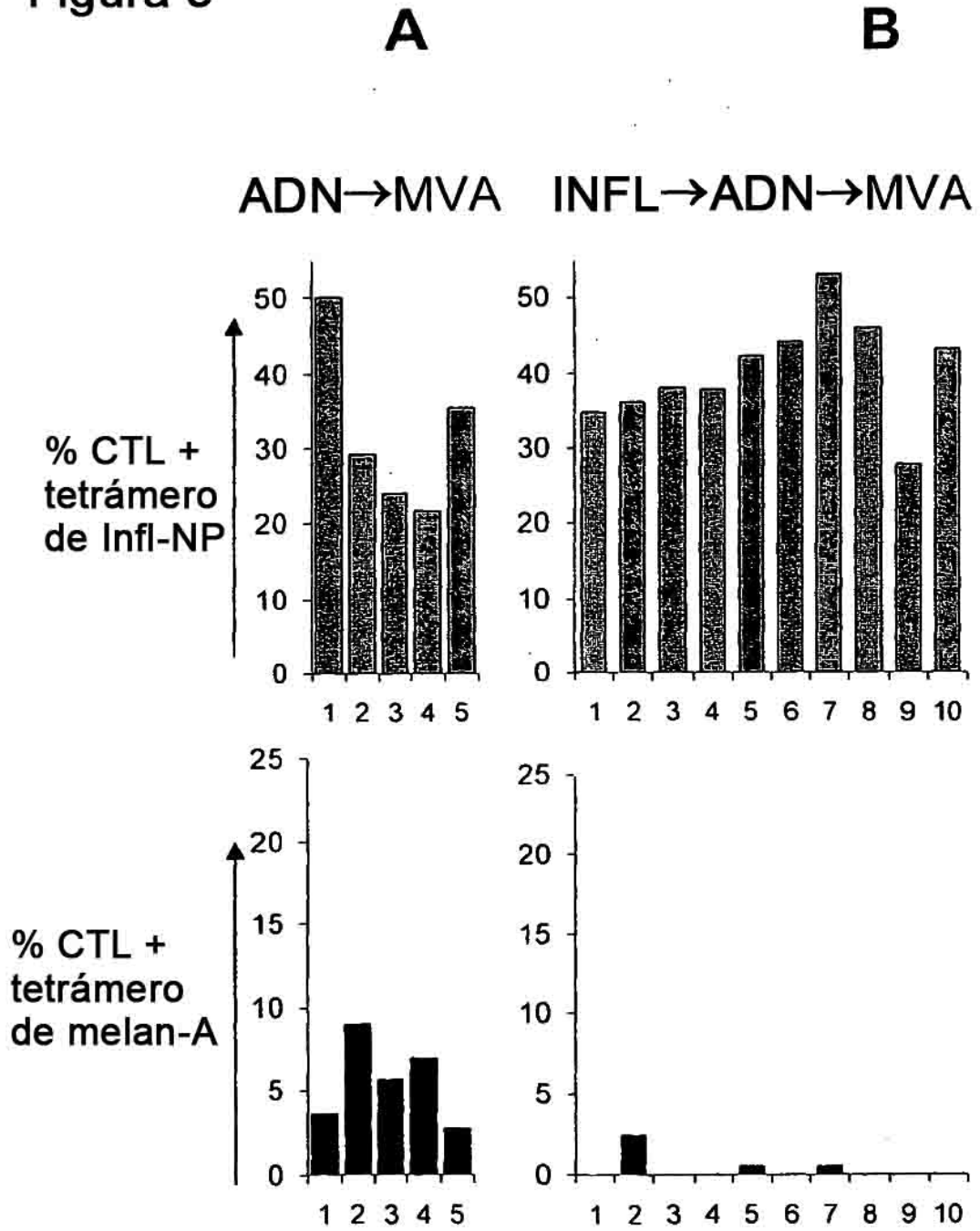


Figura 3



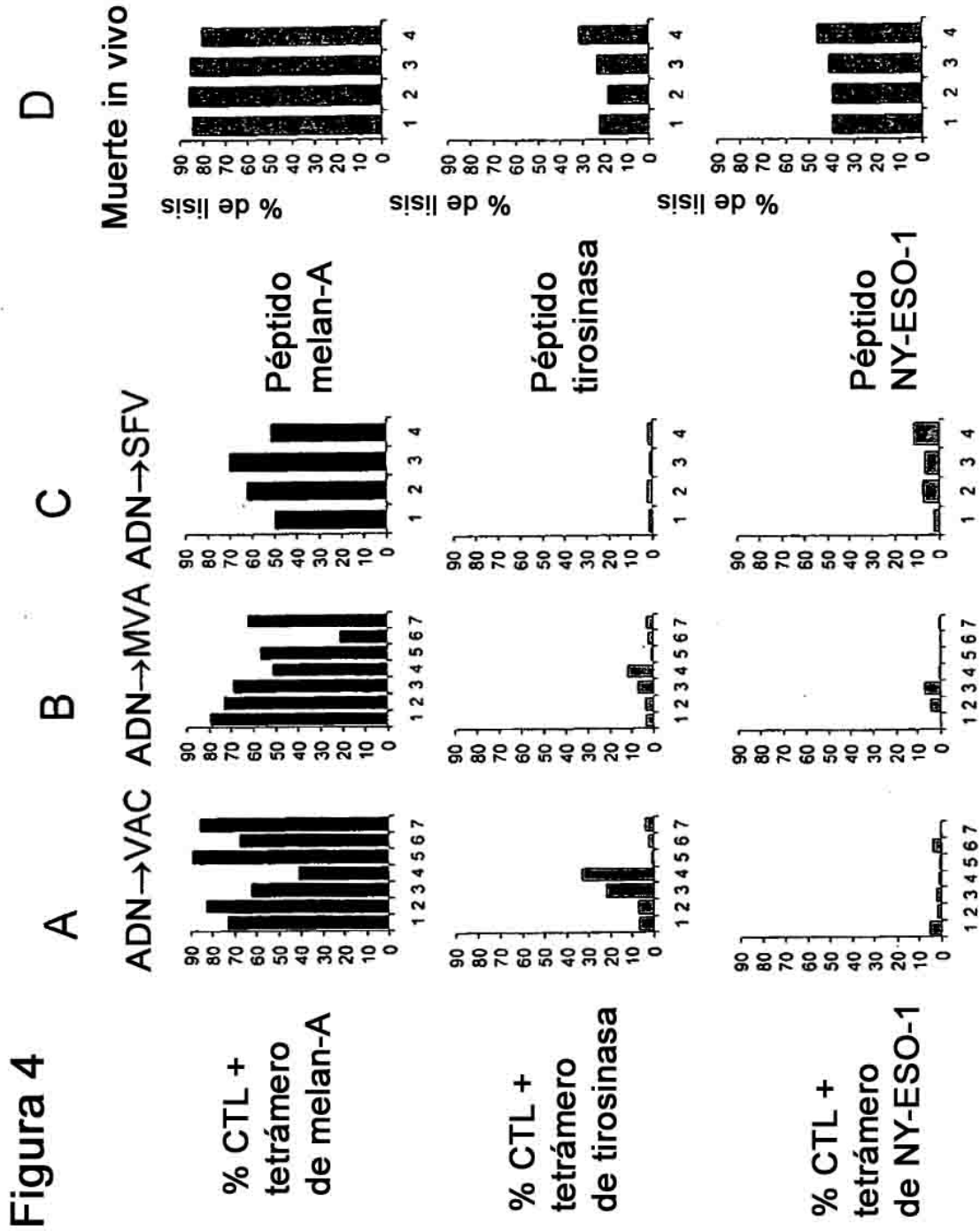


Figura 5

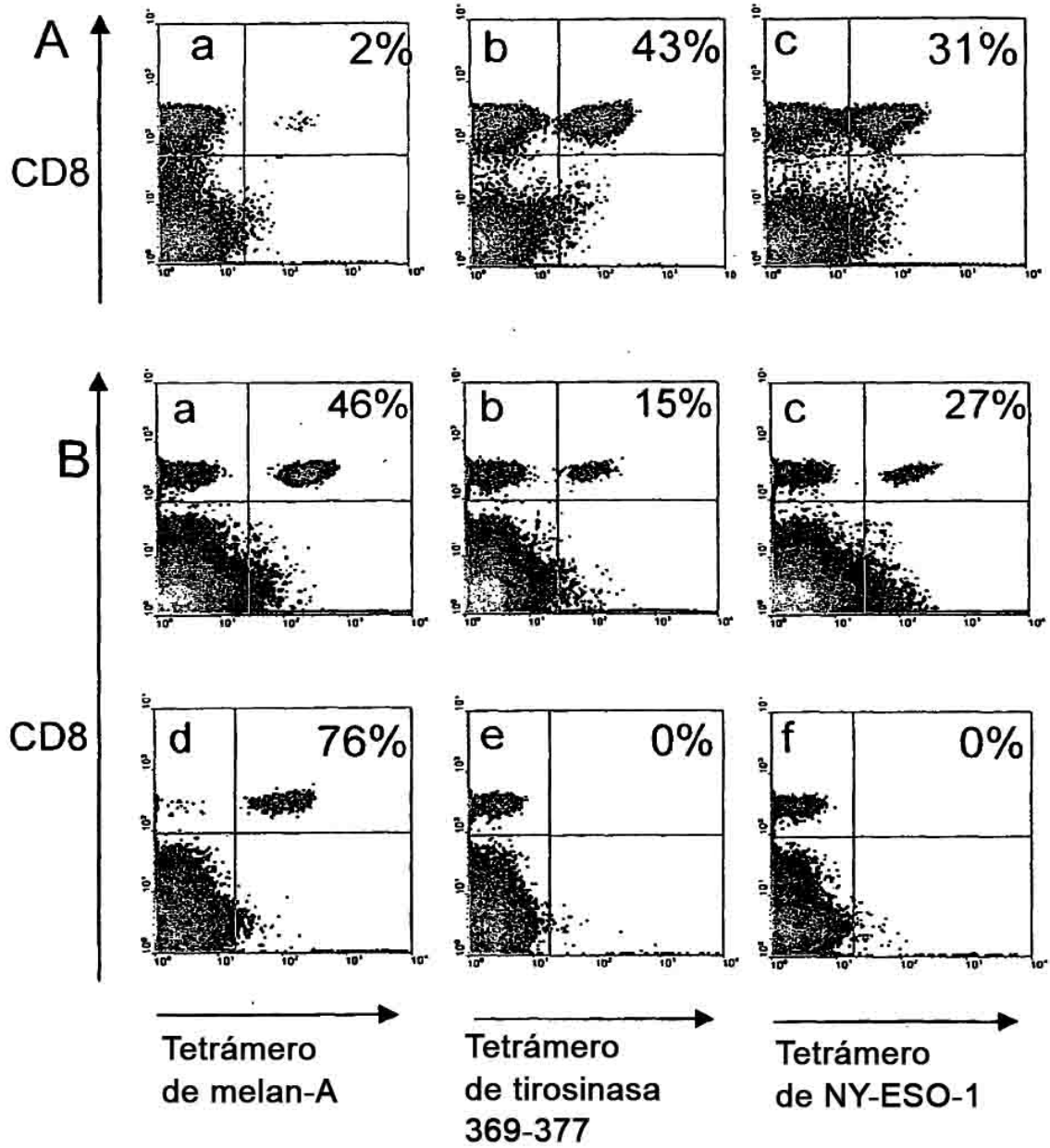


Figura 6A

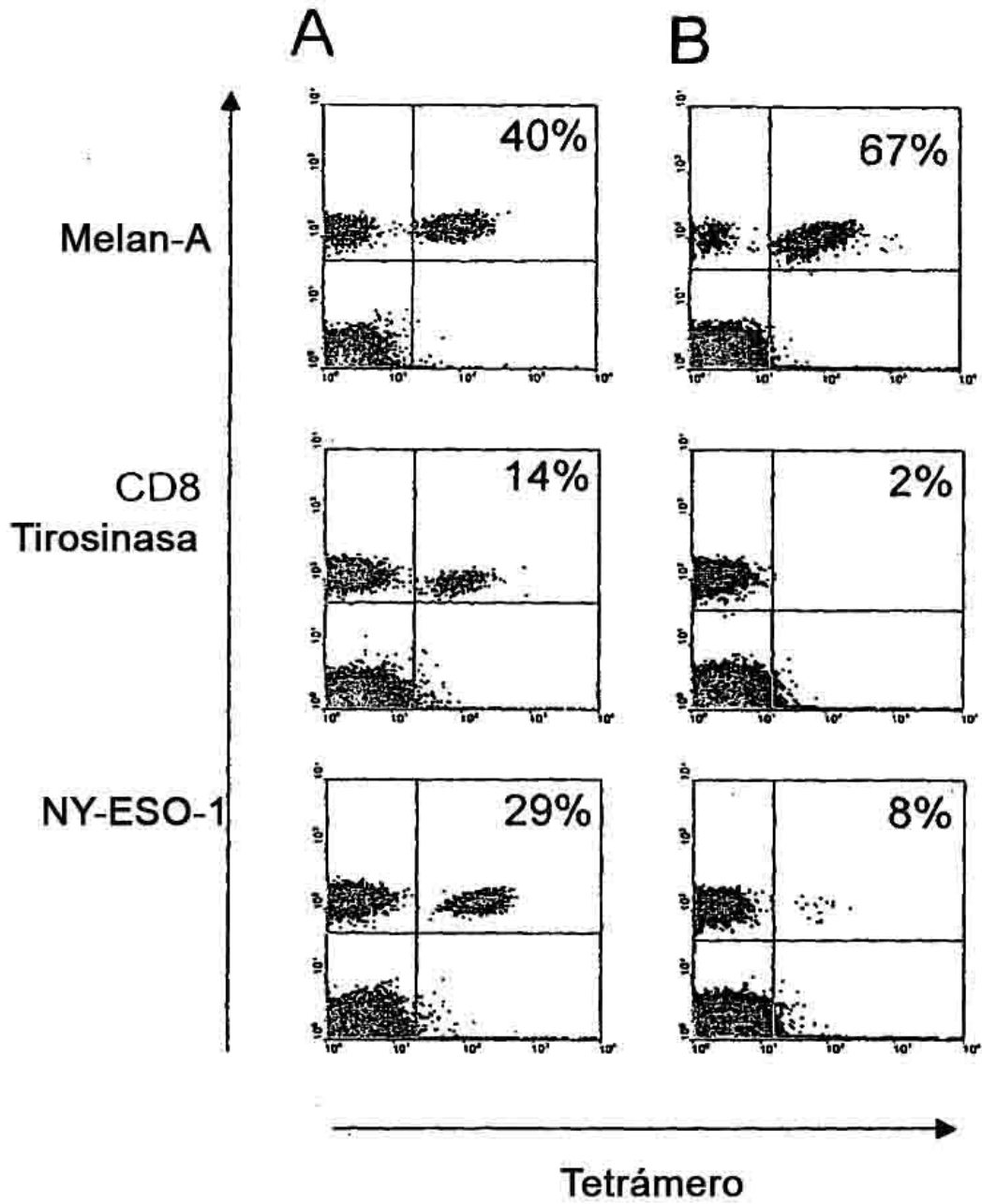


Figura 6B

