

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 138**

51 Int. Cl.:
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09005725 .8**
96 Fecha de presentación: **23.04.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2111867**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

54 Título: **NOVEDOSAS FORMULACIONES PARA VACUNAS DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A TUMORES, UNIDOS A MOLÉCULAS DEL ANTÍGENO DE LEUCOCITO HUMANO (HLA) DE CLASE I O II.**

30 Prioridad:
24.04.2008 US 47669 P
30.04.2008 EP 08008292

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2012

73 Titular/es:
IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH
PAUL-EHRLICH-STRASSE 15
72076 TÜBINGEN, DE

72 Inventor/es:
Lewandrowski, Peter y
Flohr, Christian

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 138 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

Novedosas formulaciones para vacunas de péptidos asociados a tumores, unidos a moléculas del antígeno de leucocito humano (HLA) de clase I o II.

- 5 La presente invención se refiere a novedosas formulaciones de péptidos asociados a tumores unidos a moléculas del antígeno de leucocito humano (HLA) de clase I o II, como vacunas para su uso con procedimientos inmunoterapéuticos. En concreto, la presente invención se refiere a formulaciones para la inmunoterapia del cáncer y, en particular, del cáncer renal. Además, la presente invención se refiere a compuestos de vacunas que provocan respuestas inmunológicas antitumorales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 En el documento WO 2007/028573 se describe una composición para ser inyectada, constituida por péptidos en forma de polvo, y un diluyente, constituido por hidrogenocarbonato de sodio, para la vacunación del carcinoma de células renales. Pero esta formulación tiene varias desventajas. La mayor desventaja consiste en su escasa solubilidad, lo que hace que su aplicación sea muy difícil para cualquier uso, como el uso clínico, por ejemplo.

- 15 Con el fin de disolver el polvo de la composición, el vial que contiene los péptidos que han de disolverse y el diluyente deben agitarse enérgicamente durante tres minutos y, a continuación, someterse a una homogeneización por ultrasonido durante un minuto y agitarse de nuevo durante un minuto más. No todos los médicos pueden aplicar este tratamiento en sus consultas, ya que, a menudo, carecen del equipo necesario, y es posible que la mezcla archivada no sea lo suficientemente homogénea para un uso efectivo.

- 20 Otro problema relacionado con esta composición es el hecho de que, teniendo en cuenta la velocidad de disolución de los ingredientes activos con hidrogenocarbonato de sodio en determinadas concentraciones, la solución resultante sólo puede ser utilizada durante unos 30 minutos.

Además, las características de la formulación mencionada cambian con el paso del tiempo, lo que hace casi imposible un uso seguro de la misma. Tras almacenar la formulación descrita durante 12 meses a temperaturas de entre -20 °C y +25 °C, no se pudo obtener una solución clara, incluso después de utilizar un homogeneizador durante varios minutos.

- 25 El documento US-A-6 897 288 presenta péptidos antigénicos derivados de los denominados polipéptidos MAGE-A12, y presentados mediante moléculas HLA. No obstante, la patente no presenta dato alguno sobre alguna composición que conste, además, de manitol y poloxámero 188, donde la proporción de peso péptidos:manitol:poloxámero 188 oscila entre 1:5:1,5 y 1:8:2,2.

- 30 El documento WO-A-2004/016643 está relacionado con péptidos de antígenos asociados a tumores de colon y próstata, así como con su uso en la terapia del cáncer de colon y de próstata. Los compuestos de las vacunas que se recogen en el mencionado documento no incluyen el manitol ni el poloxámero 188, donde la proporción del peso péptidos:manitol:poloxámero 188 oscila entre 1:5:1,5 y 1:8:2,2.

- 35 El documento EP-A-1 717 245 está relacionado con métodos inmunoterapéuticos para el tratamiento del cáncer, que incluyen epítomos de péptidos de linfocitos T colaboradores asociados al tumor en combinación con otros péptidos también asociados al tumor derivados de moléculas HLA de clase I o II del receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal humano (OFA/LR). Aunque se menciona la administración con/sin adyuvante, en transportadores aceptables, en excipientes o en amortiguadores, el documento no revela ni sugiere la presencia de manitol ni del poloxámero 188, donde la proporción del peso péptidos:manitol:poloxámero 188 oscila entre 1:5:1,5 y 1:8:2,2.

- 40 El documento EP-A-1 760 088, de forma similar al EP-A-1 717 245, publica el uso de los epítomos de péptidos de linfocitos T colaboradores asociados al tumor en combinación con péptidos asociados al tumor en compuestos de vacunas para la inmunoterapia del cancer. No obstante, a pesar de que se hace referencia a la disolución de los mencionados péptidos transportadores/excipientes/amortiguadores aceptables, el mencionado documento no revela ni sugiere la presencia de manitol ni del poloxámero 188, donde la proporción del peso péptidos:manitol:poloxámero 188 oscila entre 1:5:1,5 y 1:8:2,2.

- 45 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de formulaciones peptídicas novedosas con solubilidad mejorada y humidificación mejorada del liofilizado, con el fin de obtener una preparación segura y efectiva, en especial en el caso de una vacuna contra el cáncer. La presente invención cubre dicha necesidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 50 La presente invención, en un aspecto preferido de la misma, proporciona una formulación farmacéutica que comprende de 2 a 18 péptidos asociados a tumores, donde cada péptido tiene una longitud de 8 a 22 aminoácidos; en donde los mencionados péptidos muestran una solubilidad, en ácido acético al 90%, de al menos 2,7 mg/mL; manitol y poloxámero 188, en donde el ratio por peso del/de los mencionado(s) péptido(s):manitol:poloxámero 188 se encuentra entre los valores 1:5:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los extremos; o manitol y Tween[®] 80, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:Tween[®] 80 se encuentra en un rango entre 1:2:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los valores extremos.

- 5 Se prefiere una composición farmacéutica que conste de entre 2 y 18 péptidos asociados al tumor, preferiblemente de menos de 15, más preferiblemente de menos de 13, más preferiblemente de entre 2 y 12 y, con prioridad absoluta, de entre 3 y 12, donde cada péptido tiene una longitud de entre 8 y 22 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 16; donde los mencionados péptidos muestran una solubilidad, en ácido acético al 90%, de al menos 2,7 mg/mL; manitol y poloxámero 188, en donde el ratio por peso del/de los mencionado(s) péptido(s):manitol:poloxámero 188 se encuentra entre los valores 1:5:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los extremos; o manitol y Tween[®] 80, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:Tween[®] 80 se encuentra en un rango entre 1:2:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 10 En otro aspecto preferido de la presente invención, ésta proporciona una composición farmacéutica conforme a la reivindicación n.º 1, y comprende al menos dos péptidos, en donde dichos péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 10, o las secuencias SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 23; en el caso de que la composición comprenda al menos un péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 12 o SEQ ID N.º 13 o una variante o sal de las mismas; y, además, comprende manitol y poloxámero 188, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:poloxámero 188 se encuentra en un rango entre 1:5:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 15 En otro aspecto preferido de la presente invención, ésta proporciona una composición farmacéutica conforme a la reivindicación n.º 1, y comprende al menos dos péptidos, en donde dichos péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 10, o las secuencias SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 23; en el caso de que la composición comprenda al menos un péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 12 o SEQ ID N.º 13 o una variante o sal de las mismas; y, además, comprende manitol y Tween[®] 80, en donde el ratio por peso péptidos:manitol:Tween[®] 80 se encuentra en un rango de 1:2:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 20 Como ventaja, la formulación conforme a la invención es adecuada para formulaciones estables que contengan péptidos muy hidrofóbicos (por ejemplo IMA-CHI-001; SEQ ID N.º 23). Este péptido en particular, por ejemplo, es muy insoluble en agua y sólo ligeramente soluble en ácido acético al 90% (solubilidad de alrededor de 2,9 mg/mL). Sorprendentemente, ahora es posible formular el péptido conforme a la secuencia SEQ ID N.º 23 con cualquier otro péptido en otra formulación que podría ser usada para su aplicación en un ser vivo.
- 25 Por lo tanto, la aplicación describe una formulación para formular de 2 a 18 péptidos, y, en orden de preferencia, de 3 a 12, de 2 a 12, menos de 13 o menos de 15; con una longitud peptídica de 8 a 22 aminoácidos y, preferentemente de 9 a 16 aminoácidos, siempre que los péptidos muestren una solubilidad de 2,7 mg/mL, preferentemente de 2,9 mg/mL, en ácido acético al 90%; y que, además, comprende manitol y poloxámero 188, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:poloxámero 188 se encuentra en un rango de 1:5:1,5 a 1:8:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 30 En una modalidad preferida de la composición farmacéutica conforme a la presente invención, el ratio por peso de péptidos:manitol:poloxámero 188 se encuentra en un rango de entre 1:0:2 y 1:0:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 35 Otra modalidad preferida de la presente invención proporciona una composición farmacéutica como la mencionada anteriormente, y comprende al menos dos péptidos, en donde dichos péptidos comprenden un aminoácido seleccionado del grupo constituido por las secuencias SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 23; siempre que la composición comprenda al menos un péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 12 o SEQ ID N.º 13 o una variante o sal de las mismas; y, además, comprende manitol y Tween[®] 80, en donde el ratio preferido por peso de péptidos:manitol:Tween[®] 80 se encuentra en un rango de 1:5:0,5 y 1:5:2, incluyendo los valores extremos.
- 40 Preferentemente, los péptidos de la presente invención tienen una longitud total de entre 9 y 16 aminoácidos. Los péptidos pueden incluir enlaces no peptídicos.
- 45 En otras formas de realización preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden péptidos consistentes en las secuencias de aminoácidos expuestas en la secuencia SEQ ID N.º 1 y/o la secuencia SEQ ID N.º 2 y, además, comprenden al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 10.
- 50 En determinadas formas de realización preferidas, es posible que la composición farmacéutica comprenda, además, un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 11, siempre que dicho péptido no sea el correspondiente polipéptido completo asociado a un tumor. En otras formas de realización, es posible que la composición farmacéutica comprenda, además, un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 11.
- 55 En otras formas de realización preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden péptidos consistentes en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secuencias SEQ ID N.º 12 y/o la secuencia SEQ ID N.º 13 y, además, comprenden al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias SEQ ID N.º 14 a SEQ ID N.º 23. En determinadas formas de realización preferidas, es posible que esta composición farmacéutica comprenda, además, un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 11, siempre que dicho péptido no sea el correspondiente polipéptido completo asociado a un tumor. En otras formas de realización, es posible que la composición farmacéutica comprenda, además, un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 11.

En determinadas formas de realización, los péptidos que aparecen en la composición son seleccionados a partir de péptidos específicos de tejido, cáncer y/o pacientes.

5 En otras formas de realización preferidas, la composición farmacéutica puede comprender, además, al menos un adyuvante apropiado. Los adyuvantes son sustancias que mejoran o potencian la respuesta inmune de forma no específica (por ejemplo, las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T citotóxicos y linfocitos T colaboradores [T_H] ante un antígeno) y, por lo tanto, se consideran útiles para el medicamento de la presente invención. Los adyuvantes apropiados incluyen, sin limitarse a ellos: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870,893, CpG7909, CyaA, dSLIM, flagelina o ligandos TLR5 derivados de la flagelina, ligando FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta, o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune, LipoVac, MALP2, MF59, lípido A monofosforilo, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, PLG y micropartículas de dextrano, resiquimod, SRL172, virosomas y otras similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo Aquila's QS21, derivado de la saponina, extractos micobacterianos y mimetismo sintético de la pared celular bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Ribi's Detox, Quil o Superfos. Se prefieren adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Diversos adyuvantes inmunológicos (por ejemplo, el MF59) específicos de células dendríticas y su preparación ya han sido descritos anteriormente (Dupuis M y col, 1998; Allison 1998). También se pueden usar citocinas. Se ha encontrado una relación directa entre varias citocinas y su influencia en la migración de células dendríticas a tejidos linfoides (por ejemplo, TNF- α), la aceleración de la maduración de células dendríticas en células eficientes presentadoras de antígenos para linfocitos T (por ejemplo, GM-CSF, IL-1 y IL-4) (Patente estadounidense n.º 5.849.589, incorporada aquí específicamente por referencia), así como su función como inmunoadyuvantes (por ejemplo, IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich y col 1996).

Se ha informado que los oligonucleótidos CpG inmunoestimulantes mejoran los efectos de los adyuvantes en vacunas. Sin desear quedar vinculados por la teoría, los oligonucleótidos CpG actúan activando el sistema inmune innato (no adaptativo) mediante receptores Toll-Like (TLR), principalmente TLR9. La activación de los TLR9 desencadenada por los CpG mejora las respuestas humoral y celular específicas de antígeno a una amplia variedad de antígenos, incluyendo antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o destruidos, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares autólogas y conjugados de polisacáridos en vacunas tanto profilácticas como terapéuticas. Y, lo que es más importante, mejora la maduración y diferenciación de las células dendríticas, lo que da como resultado una activación mejorada de las células T_{H1} y una fuerte generación de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso en ausencia de linfocitos CD4 T colaboradores. El sesgo de T_{H1} inducido por estimulación de TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes de vacunas, como el alumo o el adyuvante de Freund incompleto (IFA), que normalmente fomenta un sesgo de T_{H2}. Los oligonucleótidos CpG muestran una actividad adyuvante aún mayor cuando son formulados o co-administrados junto con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarios para inducir una respuesta fuerte cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmune y permiten que las dosis de antígeno se reduzcan en dos órdenes de magnitud, aproximadamente, con respuestas de anticuerpos comparables a la dosis completa de vacuna sin CpG, en algunos experimentos (Krieg y col, 2006). La patente estadounidense n.º 6,406,705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos CpG, adyuvantes de ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmune específica de antígeno. Un antagonista de CpG TLR9 es dSLIM (double Stem Loop Immunomodulator), de Mologen (Berlín, Alemania), el cual es un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención. También es posible usar otras moléculas TLR de unión, como ARN, TLR 9, TLR 8 y/o TLR 7 de unión.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen CpG modificados químicamente (por ejemplo, CpR, Idera), análogos de dsARN como Poly(I:C) y AmpliGen, ADN o ARN bacteriano no CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas, como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti CTLA4 y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como adyuvantes. El experto en la materia puede determinar fácilmente, sin excesiva experimentación, las cantidades y concentraciones útiles en el contexto de la presente invención de los adyuvantes y aditivos. Se prefieren los adyuvantes dSLIM, interferón-alfa, interferón-beta, CpG7909, IC31, imiquimod, resiquimod, PeviTer, RNA, tadalafilo, temozolomida, y JuvImmune.

Se prefieren los adyuvantes dSLIM, BCG, OK432, imiquimod, resiquimod, GMCSF, interferon-alfa, PeviTer y JuvImmune, o combinaciones de los mismos.

55 En una modalidad preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es seleccionado de un grupo constituido por factores estimuladores de colonias, como el Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF, sargramostim), imiquimod, resiquimod e interferón-alfa.

En una modalidad preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es seleccionado de un grupo constituido por factores estimuladores de colonias, como el Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF, sargramostim), imiquimod y resiquimod.

60 En una modalidad preferida de la composición farmacéutica conforme a la presente invención, el adyuvante es imiquimod o resiquimod.

Esta composición se puede usar para administración parenteral como, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intramuscular o por vía oral. Los péptidos también pueden administrarse junto con sustancias estimulantes de la respuesta inmune, como las citocinas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser usadas como vacunas contra el cáncer.

- 5 La presente invención también abarca un kit que comprende al menos uno de los péptidos mencionados anteriormente y/o la composición farmacéutica mencionada anteriormente, bien preparados con anterioridad o bien en viales o contenedores separados para la adición en el sitio.

- 10 Se prefiere un kit que comprenda: (a) un contenedor que contenga una composición farmacéutica conforme a la invención, en solución o en forma liofilizada; (b) opcionalmente, un segundo contenedor que contenga un diluyente o solución reconstituyente para dicha formulación liofilizada y/o al menos un adyuvante; y (c) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución, o (ii) reconstitución y/o el uso de dicha forma liofilizada.

Se prefiere aún más un kit conforme a la invención, que comprenda una unidad o más de (i) un amortiguador, (ii) un diluyente, (iii) un filtro (iv) una aguja y (v) una jeringuilla.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 Figura 1: cromatograma HPLC analítica de péptidos (secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 11) que contiene beta-naftilalanina (NAL) como estándar interno.

Figura 2: estabilidad de la formulación n.º 1 (control) sin excipientes a +25 °C.

Figura 3: estabilidad de la formulación n.º 2 conforme a la invención con manitol y Lutrol® F68 (poloxámero 188) a +25 °C.

- 20 Figura 4: estabilidad de la formulación n.º 3 conforme a la presente invención con manitol y Tween® 80 a +25 °C.

Figura 5: estabilidad de la formulación n.º 4 conforme a la presente invención con manitol y Tween® 80 a +25 °C.

Figura 6: estabilidad de la formulación 1 (control) sin excipientes a +40 °C.

Figura 7: estabilidad de la formulación n.º 2 conforme a la invención con manitol y Lutrol® F68 (poloxámero 188) a +40°C.

- 25 Figura 8: estabilidad de la formulación n.º 3 conforme a la presente invención con manitol y Tween® 80 a +40°C.

Figura 9: estabilidad de la formulación n.º 4 conforme a la presente invención con manitol y Tween® 80 a +40°C.

- 30 Figura 10: efectos de los excipientes poloxámero 188 (Lutrol® F68 disponible en BASF, Ludwigshafen, Alemania) y manitol en la sensibilización in vivo de linfocitos T CD8+ T. Se sacrificaron ratones inmunizados 9 días después de su inmunización, se recolectaron células del bazo, se tiñeron con tetrámero y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células positivas de tetrámeros entre todos los linfocitos T CD8+ se muestra con barras de error que muestran la desviación estándar de los promedios. Los tres grupos inmunizados mediante péptidos son significativamente distintos de los controles negativos analizados por una prueba T de Student impar de dos colas ($p < 0,05$). Los grupos con y sin poloxámero 188 (Lutrol® F68)/manitol no difieren de forma significativa ($p = 0,49$).

Figura 11: proceso de manufactura descrito en el ejemplo 2

- 35 Figura 12: cromatograma HPLC analítica de péptidos (secuencias SEQ ID N.º 11 a 23) que contiene beta-naftilalanina (NAL) como estándar interno.

Figura 13: estabilidad «en uso» de péptidos de secuencias SEQ ID N.º 11 a 23 con manitol/Lutrol® F68

Figura 14: estabilidad «en uso» de péptidos de las secuencias SEQ ID N.º 11 a 23 sin excipientes

Figura 15: estabilidad de péptidos de secuencias SEQ ID N.º 11 a 22 con manitol/Lutrol® F68 a +25 °C

- 40 Figura 16: estabilidad de péptidos de secuencias SEQ ID N.º 11 a 22 con manitol/Lutrol® F68 a +5 °C

Figura 17: estabilidad de péptidos de secuencias SEQ ID N.º 11 a 22 con manitol/Lutrol® F68 a -20 °C

Figura 18: datos de estabilidad de 24 meses a -20 °C para la formulación mostrada en el ejemplo 2.

Figura 19: datos de estabilidad de 24 meses a +5 °C para la formulación mostrada en el ejemplo 2.

Figura 20: datos de estabilidad de 24 meses a +25 °C para la formulación mostrada en el ejemplo 2.

El listado de secuencias muestra péptidos (secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 23) usados en formulaciones conforme a la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas útiles como vacunas, en donde dicha composición farmacéutica comprende diversos péptidos asociados a tumores (TUMAP), además de una mezcla de manitol y Tween® 80 o una mezcla de manitol y poloxámero 188, las cuales proporcionan estabilidad y solubilidad a la mencionada composición.

10 El término «composición farmacéutica» al que se hace referencia aquí es, preferentemente, una formulación liofilizada que comprende péptidos, manitol y Tween® 80 o los péptidos, manitol y poloxámero 188 o, preferiblemente, una composición de líquido reconstituido. Como tal, el término «composiciones farmacéuticas» utilizados aquí también puede hacer referencia a la formulación liofilizada para indicar que la composición está presente en una forma liofilizada.

15 Preferentemente, los péptidos de las composiciones farmacéuticas comprenden al menos uno de los péptidos expuestos en las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 10, que se localizan y han sido identificadas en células primarias de cáncer renal; o al menos uno de los péptidos expuestos en las secuencias SEQ ID N.º 11 a la SEQ ID N.º 22 y 11 a la SEQ ID N.º 23, que se localizan y han sido identificadas en células primarias de cáncer de glioma.

En otras formas de realización preferidas, las composiciones farmacéuticas comprenden péptidos consistentes en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secuencias SEQ ID N.º: 12 y/o la secuencia SEQ ID N.º: 13 y, además, comprenden al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias SEQ ID N.º: 14 a SEQ ID N.º: 23.

20 El grupo de péptidos incluye péptidos HLA de clase I y II. Preferentemente, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un péptido como el expuesto en las secuencias SEQ ID N.º 1 y/o SEQ ID N.º 2 y/o al menos otro péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 3 a la SEQ ID N.º 10, o un péptido como el expuesto en las secuencias SEQ ID N.º 12 y/o SEQ ID N.º 13 y/o al menos otro péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 11 y SEQ ID N.º 14 a la SEQ ID N.º 23.

25 Las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos tanto en forma libre como en forma de sal farmacéuticamente aceptable.

30 Tal y como se utiliza aquí, una «sal farmacéuticamente aceptable» hace referencia a un derivado de los péptidos descritos, en donde el péptido es modificado mediante la realización de sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (en las que, normalmente, la forma neutral del fármaco tiene un grupo -NH₂ neutral), lo que implica una reacción con un ácido adecuado. Los ácidos adecuados para preparar sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido mentansulfónico, p-toluensulfónico, ácido salicílico, y otros similares, así como ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido forsfórico y otros similares. De forma inversa, las preparaciones de sales básicas de regiones ácidas que pueden estar presentes en un péptido se efectúan usando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

35 En una modalidad especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos como sales de ácido acético (acetatos) o ácido clorhídrico (cloruros).

40 En una modalidad aún más preferida, las composiciones farmacéuticas conformes a la invención comprenden la secuencia SEQ ID N.º 5 como un cloruro y todos los demás péptidos como acetatos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener, al menos, un péptido que sirva como control positivo como marcador inmunitario para probar la eficacia de la administración intradérmica. Tal péptido ejemplar deriva del antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B (SEQ ID N.º 11).

45 En una forma de realización en particular, la composición farmacéutica comprende 11 péptidos distintos, consistente cada uno de ellos en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 11 (véase tabla 1). Preferiblemente, cada péptido de la composición farmacéutica está presente en una cantidad de entre unos 1500 µg a cerca de 75 µg, preferiblemente entre unos 1000 µg a cerca de 750 µg y, más preferiblemente, entre unos 500 µg a cerca de 600 µg y, aún más preferiblemente, unos 578 µg. Preferiblemente cada péptido es purificado mediante HPLC y cromatografía de intercambio de iones, y aparece como polvo blanco o blanco hueso.

50 En otra modalidad en particular, la composición farmacéutica comprende 12 péptidos distintos, consistente cada uno de ellos en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secuencias SEQ ID N.º 11 a la SEQ ID N.º 22 y en las secuencias expuestas en las secuencias SEQ ID N.º 11 a la SEQ ID N.º 23 (véase tabla 1). Preferiblemente, cada péptido de la composición farmacéutica está presente en una cantidad de entre unos 1500 µg a cerca de 75 µg, preferiblemente entre unos 1000 µg a cerca de 750 µg y, más preferiblemente, entre unos 500 µg a cerca de 600 µg y,

aún más preferiblemente, unos 578 µg. Preferiblemente cada péptido es purificado mediante HPLC y cromatografía de intercambio de iones, y aparece como polvo blanco o blanco hueso.

Tabla 1: péptidos preferidos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención

ID de secuencia interna	Antígeno	Secuencia	SEQ ID N.º
IMA-MMP-001	Metaloproteinasa 7 de la matriz	SQDDIKGIQKLYGKRS	1
IMA-ADF-002	Adipofilina	VMAGDIYSV	2
IMA-ADF-001	Adipofilina	SVASTITGV	3
IMA-APO-001	Apolipoproteína L1	ALADGVQKV	4
IMA-CCN-001	Ciclina D1	LLGATCMFV	5
IMA-GUC-001	GUCY1A3	SVFAGVVG	6
IMA-K67-001	KIAA0367	ALFDGDPHL	7
IMA-MET-001	Proto-oncogen c-Met	YVDPVITSI	8
IMA-MUC-001	MUC1	STAPPVHNV	9
IMA-RGS-001	RGS-5	LAALPHSCL	10
IMA-HBV-001	HBV	FLPSDFFPSV	11
IMA-BCA-002	Brevican (NP_068767, 478-486)	ALWAWPSEL	12
IMA-BIR-002	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5) (NP_001159, 97-111)	TLGEFLKDRERAKN	13
IMA-CSP-001	Proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (NP_001888, 21-29)	TMLARLASA	14
IMA-FABP7-001	Proteína 7 de unión a ácido graso, cerebro (NP_001437, 118-126)	LTFGDVVAV	15
IMA-IGF2BP3-001	Proteína 3 de unión a ARNm factor de crecimiento similar a la insulina 2 (NP_006538, 552-560)	KIQEILTQV	16
IMA-MET-005	Met proto-oncogén (NP_000236, 651-667)	TFSYVDPVITSISPKYG	17
IMA-NLGN4X-001	Neuroigin 4, X-linked (NP_065793, 131-139)	NLDTLMTYV	18
IMA-NRCAM-001	Molécula de adhesión de célula neuronal (NP_001032209, 692-700)	GLWHHQTEV	19
IMA-PTP-003	Proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, Z polipéptido 1 (NP_002842, 195-203)	AIIDGVESV	20
IMA-PTP-005	Proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, Z polipéptido 1 (NP_002842, 1347-1355)	KVFAGIPTV	21
IMA-TNC-001	Tenascina C (NP_002151, 3-11)	AMTQLLAGV	22
IMA-CHI-001		SLWAGVVVL	23

El término «péptido» es usado aquí para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados uno con otro, normalmente, mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Normalmente, los péptidos tienen una longitud de 9 aminoácidos para el MHC de clase I y una longitud mayor (15 o 16 aminoácidos) para el MHC de clase II, pero puede llegar a tener entre 8 y 16 aminoácidos de longitud.

- 5 El término «oligopéptido» es usado aquí para designar una serie de residuos de aminoácidos, conectados uno con otro, normalmente, mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crítica para la presente invención, siempre que se mantengan en la misma el/los epítipo(s) adecuados. Los oligopéptidos suelen ser de longitud menor de unos 30 residuos de aminoácidos, y mayor de unos 14 aminoácidos.
- 10 El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos, conectados uno con otro, normalmente, mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crítica para la presente invención, siempre que se mantengan en la misma los epítipos adecuados. En comparación con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término polipéptido hace referencia a moléculas de proteínas de longitud mayor a unos 30 residuos.
- 15 Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunógeno» (y, por tanto, un «inmunogen» en la presente invención) si es capaz de inducir una respuesta inmune. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la habilidad para inducir una respuesta mediada por CTL. Por lo tanto, un «inmunogen» sería una molécula capaz de inducir una respuesta inmune y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de CTL.
- 20 Un epítipo de linfocito T es una molécula corta de péptidos que se une a una molécula MHC de clase I o II y que es posteriormente reconocida por un linfocito T citotóxico. Los epítipos de linfocitos T que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 14 aminoácidos y, con mayor frecuencia, de 9 aminoácidos. Los epítipos de linfocitos T que se unen a moléculas MHC de clase II suelen tener una longitud de 12 a 30 aminoácidos. En el caso de los epítipos que se unen a moléculas MHC de clase II, el mismo epítipo de linfocito T puede compartir un segmento central común pero diferir en la longitud de las secuencias laterales carboxi- y aminoterminal, debido al hecho de que los extremos de la molécula peptídica no se alojan en la estructura de la hendidura de unión peptídica de la molécula MHC de clase II, ya que se encuentran en la hendidura de unión peptídica de la molécula MHC de clase I.
- 25

Existen tres locus genéticos diferentes que codifican moléculas MHC de clase I: HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A1, HLA-A2 y HLA-A11 son ejemplos de distintas moléculas MHC de clase I que se pueden expresar desde estos locus.

- 30 Tal y como se utilizan aquí, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando son utilizados en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, que forma un subconjunto de una secuencia más larga. Por ejemplo, si un polipéptido fuera tratado con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como tripsina o quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarían porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Esto significa que cualquier fragmento de ese tipo contendrá necesariamente, como parte de su secuencia de aminoácidos, un segmento, fragmento o porción substancialmente idéntico, si no exactamente idéntica, a una secuencia de SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 23, que corresponde a las proteínas naturales, o «madre», de las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 23. Cuando son utilizados en relación a los polinucleótidos, dichos términos hacen referencia a los productos generados por tratamiento de los mencionados polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.
- 35
- 40 En conformidad con la presente invención, el término «identidad porcentual» o «idéntico porcentualmente», cuando hace referencia a una secuencia, significa que una secuencia es comparada con una secuencia reivindicada o descrita tras la alineación de la secuencia que se desea comparar («secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada («secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces conforme a la siguiente fórmula:
- 45
- $$\text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$
- donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, en donde
- (i) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene su base o aminoácido alineado correspondiente en la secuencia comparada, y
- 50 (ii) cada *gap* en la secuencia de referencia, y
- (iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que es distinto a la base o aminoácido alineado correspondiente de la secuencia comparada, supone una diferencia;

y R es el número de bases o aminoácidos en la secuencia de referencia a lo largo del alineamiento con la secuencia comparada, en donde cualquier *gap* creado en la secuencia de referencia es considerado una base o aminoácido.

Si existe un alineamiento entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para el que la identidad porcentual calculada como se ha descrito es prácticamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada tiene la identidad porcentual mínima especificada con respecto a la secuencia de referencia aunque existan alineamientos en los que la identidad porcentual calculada sea menor que la identidad porcentual especificada.

Los péptidos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser modificados mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios distintos, posiblemente selectivos, en la cadena peptídica. Tales sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es sustituido por un aminoácido de estructura y características similares, como en el caso en el que un aminoácido hidrofóbico es sustituido por otro aminoácido hidrofóbico. La sustitución es aún más conservadora si se hace con aminoácidos de igual o similar tamaño y naturaleza química, como, por ejemplo, si se sustituye la leucina por isoleucina. En estudios sobre variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos son toleradas con más frecuencia que otras, y suelen mostrar una correlación con similitudes en el tamaño, la carga, la polaridad y la hidrofobicidad entre los aminoácidos originales y sus sustitutos, lo cual constituye la base para definir las «sustituciones conservadoras».

Las sustituciones conservadoras se definen aquí como intercambios que forman parte de uno de estos cinco grupos: Grupo 1 -- residuos, pequeños, alifáticos, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); Grupo 2 -- residuos polares, cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); Grupo 3 -- residuos polares, cargados positivamente (His, Arg, Lys); Grupo 4 -- residuos grandes, alifáticos, no polares (Met, Leu, Ile, Val, Cys); y Grupo 5 -- residuos grandes, aromáticos (Phe, Tyr, Trp).

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar la sustitución de un aminoácido por otro que tiene características similares pero que, de alguna manera, es distinto en tamaño, como, por ejemplo, la sustitución de alanina por un residuo de isoleucina. Las sustituciones altamente no conservadoras pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por uno polar o, incluso, por uno de carácter básico. Estas sustituciones «radicales» no pueden descartarse, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos no son completamente predecibles y las sustituciones radicales podrían dar lugar a efectos desconocidos, imposibles de predecir a partir de principios químicos simples.

Tales sustituciones pueden implicar, evidentemente, otras estructuras además de los habituales aminoácidos L. Por lo tanto, los aminoácidos D podrían ser sustituidos por aminoácidos L, que a menudo se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención, y seguir englobados por la descripción aquí contenida. Además, los aminoácidos que procesan grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los que se encuentran en los 20 aminoácidos habituales de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados para sustituciones, con el fin de generar inmunógenos y polipéptidos inmunógenos conformes a la presente invención.

Si las sustituciones en más de una posición ocurren en un péptido con una actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor que la definida más abajo, entonces se probarán las combinaciones de dichas sustituciones para determinar si las sustituciones combinadas dan como resultado efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán simultáneamente cuatro posiciones en el péptido.

Preferentemente, cuando los CTL específicos de un péptido de las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 23 se analizan en comparación con los péptidos sustituidos, la concentración de péptidos en la que los péptidos sustituidos alcanzan la mitad del aumento máximo en lisis en relación con el fondo no es mayor de 1 mM; preferentemente, no mayor de alrededor de 1 μ M; más preferentemente, no mayor de alrededor de 1 nM; y, aún más preferentemente, no mayor de alrededor de 100 pM; y, con mayor preferencia, no mayor de alrededor de 10 pM. También se prefiere que el péptido sustituido sea reconocido por CTL de más de un individuo, al menos dos y, de preferencia, tres individuos.

La mucina-1 (MUC1) es una glucoproteína transmembrana de tipo I altamente glicosilada que está abundantemente sobreexpresada en la superficie celular de numerosos adenocarcinomas humanos como los cánceres de mama y de ovario. La deglicosilación aberrante en malignidades es común y desenmascara epítomos en células tumorales que podrían no presentarse en células normales. Además, la expresión de la MUC1 se ha demostrado en el mieloma múltiple y en algunos linfomas no Hodgkinianos de linfocitos B. Diversos informes recientes (Apostolopoulos V y McKenzie IF. Cellular mucins: targets for immunotherapy. Crit Rev. Immunol. 14:293-309 (1994); Finn OJ, Jerome KR, Henderson RA, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, y Barratt-Boyes SM. MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines. Immunol. Rev. 145:61-89 (1995); Barnd 1989; Takahashi 1994; Noto 1997) han demostrado que los linfocitos T MHC no restringidos de MHC citotóxicos de tumores ováricos, mamarios, pancreáticos y mielomas múltiples pueden reconocer epítomos del centro proteico MUC1 localizado en la repetición en tándem. Dos epítomos de linfocitos T restringidos de HLA-A2 derivados de la proteína MUC1 se han identificado (Brossart 1999, EP 1484397). Un péptido deriva de la región de la repetición en tándem de la proteína MUC1. El segundo péptido se localiza dentro de la secuencia de señal de MUC1. La inducción de respuestas de linfocitos T citotóxicos in vivo tras realizar vacunaciones con células dendríticas sensibilizadas de forma reiterada con el péptido en pacientes con cáncer avanzado de mama y ovario mediante esos péptidos se ha realizado con éxito (Brossart 2000) (Wierecky 2005). Con respecto al carcinoma de células renales, la expresión de MUC1 es común en tumores convencionales y se ha

informado que están asociados con el grado y etapa. Con MUC1, la sobreexpresión proteínica no está relacionada con la sobreexpresión de ARNm.

La adipofilina es un marcador para las células diferenciadas especializadas que contengan gotas de lípidos y para enfermedades asociadas a células que acumulen grasa (Heid 1998). La adipofilina tiene lugar en una amplia gama de líneas celulares cultivadas, incluyendo fibroblastos y células epiteliales y endoteliales. En los tejidos, sin embargo, la expresión de la adipofilina está restringida a determinados tipos de células, como a las células epiteliales mamarias lactantes, células Sertoli y Leydig del sistema reproductor masculino y esteatosis o hepatocitos de modificación grasa en cirrosis alcohólica de hígado (Heid 1998). Se ha informado que la adipofilina está sobreexpresada en el cáncer colorectal (Saha 2001), el carcinoma hepatocelular (Kurokawa 2004) y en el carcinoma de células renales (RCC) (Young 2001).

c-Met codifica un receptor transmembranoso heterodimérico con actividad de tirosina-quinasa que está compuesta de una cadena alfa unida por disulfuro a una subunidad beta (Bottaro 1991; Rubin 1993). Ambas subunidades se expresan en la superficie, la subunidad beta pesada es responsable de la unión del ligando, la subunidad beta pesada es responsable de la unión del ligando, factor de crecimiento de hepatocito (HGF), la subunidad alfa contiene un dominio intracelular que media en la activación de distintas vías de transducción de señal. La señalización de c-Met participa en la regeneración de órganos, como se ha demostrado con el hígado y el hígado, la embriogénesis, la hematopoyesis, el desarrollo muscular y en la regulación de la migración y adhesión de monocitos y linfocitos B activados normalmente (Zarnegar 1995; Naldini 1991; Montesano 1998; Schmidt 1995; Uehara 1995; Bladt 1995; Takayama 1996; Mizuno 1993; van, V 1997; Beilmann 2000) Además, numerosos estudios han indicado la participación de la sobreexpresión de c-Met en la transformación maligna y en la capacidad de invasión de las células malignas.

c-Met media en las actividades potencialmente oncogénicas y multifuncionales del HGF/factor esparcido, incluyendo la promoción del crecimiento celular, motilidad, supervivencia, disolución de matriz extracelular y angiogénesis (Bottaro 1991; Rubin 1993; Zarnegar 1995). La unión del HGF al receptor induce la autofosforilación de c-Met y activa los eventos de señalización en dirección 3', incluyendo las vías relacionadas con proteínas quinasas mitógeno activadas, fosfolipasas Cy, fosfatidilinositol 3-quinasa y ras. El gen c-Met se expresa predominantemente en células epiteliales y se encuentra sobreexpresado en varias líneas celulares y tejidos malignos. Un número cada vez mayor de informes ha mostrado que las células no epiteliales como las esqueléticas, neurales y hematopoyéticas responden a malignidades hematológicas y HGF como el mieloma múltiple, la enfermedad de Hodgkin, la leucemia y el linfoma expresa la proteína c-Met. El control deregulado del fenotipo de crecimiento invasivo por c-Met activado oncógenamente provocado por mutaciones de activación de c-Met, amplificación/sobreexpresión de c-Met, y adquisición de asas autocrinas de c-Met/HGF confiere propiedades invasivas y metastáticas a las células malignas. Cabe destacar que la activación constitutiva del c-Met en ratones transgénicos con sobreexpresión de HGF promueve la génesis de tumores.

El regulador de la proteína G señalizadora 5 (RGS5) es un regulador negativo de las vías de señalización de la proteína G heterotrimérica, aunque su función in vivo todavía no se conoce. Las proteínas RGS comprenden una familia de moléculas con una misma función catalítica pero con una distribución del tejido que varía. Estimulan la actividad intrínseca de guanosina trifosfatasa (GTPase) de subunidades G α activadas y, así, aceleran la inactivación de la proteína G. De esta forma, las moléculas RGS inhiben la dirección 3' de señalización de receptores acoplados a la proteína G (De 2000). Recientemente, se ha demostrado que la inducción del regulador de proteína G señalizadora 5 en pericitos coincide con la remodelación activa de los vasos durante la neovascularización del tumor. En un modelo de ratón de carcinogénesis de células del islote pancreático, así como en astrocitomas altamente angiogénicos, se ha demostrado la sobreexpresión del RGS5 en pericitos durante el cambio angiogénico que acompaña la remodelación activa de los vasos. La sobreexpresión estaba restringida a la vasculatura del tumor, en comparación con un islote de Langerhans normal. Sin embargo, también se da una regulación hacia arriba del RGS5 durante la curación de heridas y la ovulación (Berger 2005).

La expresión del RGS5 también aumenta en el RCC (Rae 2000). En otro estudio, el RT-PCR mostró una fuerte expresión del RGS5 en todos los RCC examinados, mientras que era muy débil o inexistente en los riñones normales (6.6:1 por PCR en tiempo real). Las células endoteliales del tumor fueron la ubicación principal del RGS5 en el RCC (Furuya 2004). Además, se ha informado que el RGS5 es un marcador celular endotelial sinusoidal en el carcinoma hepatocelular (Chen 2004).

La apolipoproteína L1 (APOL1) es una lipoproteína de alta densidad que se une a la apolipoproteína A-I. La apolipoproteína A-I es una proteína de plasma relativamente abundante y la principal apoproteína de las HDL. Participa en la formación de la mayoría de los ésteres de colesterol en el plasma y promueve la salida del colesterol de las células. Es posible que la apolipoproteína L1 tenga una función en el transporte e intercambio de lípidos en el organismo, así como en el transporte de colesterol inverso desde las células periféricas al hígado. La proteína de plasma es un polipéptido de cadena única con una masa molecular aparente de unos 40 kDa (Duchateau 1997; Duchateau 2001). El ADNc de la APOL1 se aisló de la genoteca de ADNc de la célula endotelial activada, mostrando una regulación hacia arriba por el TNF- α , que es una potente citoquina inflamatoria. (Monajemi 2002).

KIAA0367 se identificó en el proyecto de ADNc Kazusa, creado para identificar largos transcritos humanos desconocidos que codifican supuestas proteínas (Ohara 1997). Aunque la función del producto proteico largo del supuesto aminoácido 820 de KIAA0367 se desconoce, contiene un lípido CRAL-TRIO que une el dominio en el C-

terminal que une pequeñas moléculas hidrofóbicas y que está presente en varios factores de intercambio de nucleótidos y en el BCL2/adenovirus E1B 19 kDa proteína-proteína de interacción 2 (BNIP-2). BNIP-2 participa en el control de diversas funciones celulares incluyendo la morfología, migración y endocitosis celular y la evolución del ciclo celular (Zhou 2005). KIAA0367 se encuentra en la región cromosómica 9q21. Esta región se describe en muchos tumores como una diana común en la delección homocigótica (Gursky 2001; Weber 2001) o pérdida heterocigótica (Louhelainen 2000; Tripathi 2003).

La guanilato ciclasa soluble (sGC), proteína heterodimérica constituida por una subunidad alfa y otra beta (1 grupo hemo), cataliza la conversión de GTP al segundo mensajero cGMP y actúa como el receptor principal de medicamentos nitrovasodilatadores y de óxido nítrico. GUCYa3 y b3 están sobreexpresados en los gliomas humanos. La transfección de GUCY1A3 o GUCY1B3 antisentido redujo la vascularización y el crecimiento del tumor en ratones desnudos. Esto podría deberse a que VEGF es inducido por cGMP (Saino 2004). GUCY1A3 promueve la migración de células de tumor en líneas celulares de tumor mamario del ratón (Jadeski 2003).

La ciclina D1 pertenece a la familia de ciclinas de alta conservación; más específicamente, a la subfamilia de ciclina D (Xiong 1991; Lew 1991). Las ciclinas actúan como reguladores de CDK (quinasas ciclina-dependientes). Cada ciclina exhibe un modelo diferenciado de degradación y expresión que contribuye a la coordinación temporal de cada mitosis (Deshpande 2005). La ciclina D1 forma un complejo que actúa como subunidad de regulación de CDK4 o CDK6, cuya actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo celular. CCND1 forma, con CDK4 y CDK6, un complejo de holoenzima de serina/treonina quinasa que aporta especificidad de sustrato al complejo (Bates 1994). Se ha demostrado que la proteína interactúa con la proteína Rb supresora de tumor (Loden 2002); la expresión de este gen es regulada positivamente por Rb (Halaban 1999).

Las mutaciones, la amplificación y la sobreexpresión de este gen, que altera la progresión del ciclo celular, se observan con frecuencia en una variedad de tumores y es posible que contribuyan a la génesis de tumores (Hedberg 1999; Vasef 1999; Troussard 2000).

El CSPG4 (proteoglicano de sulfato de condroitina) representa un de proteoglicano de sulfato de condroitina de membrana integral. Se conoce como un marcador precoz de la progresión de melanoma de la superficie celular, implicado en la estimulación de la proliferación, migración e invasión de células tumorales. El CSPG4 aparece fuertemente expresado en más del 90% de lesiones de melanoma humano. A pesar de que el CSPG4 no es específico de tumor en sentido estricto, las respuestas de linfocitos T CD4+ reactivas a tumores en pacientes con melanoma e individuos sanos reconocen CSPG4₆₉₃₋₇₀₉ en células de melanoma que expresan HLA-DR11 en ausencia de autoinmunidad (Erfurt y col, 2007).

La expresión de CSPG4 también ha sido descrita en algunos tejidos normales además de en pericitos activados, como en células endoteliales, condrocitos, fibras musculares lisas, ciertos queratinocitos basales del interior de la epidermis, así como células del folículo piloso (Campoli y col, 2004).

Durante la angiogénesis y como respuesta a patologías CNS, las células de alta motricidad CSPG4 sufren rápidos cambios morfológicos y son enviadas a sitios donde se está produciendo crecimiento o reparación de los vasos. La CSPG4 es sobreexpresada tanto por células tumorales y pericitos en los vasos sanguíneos de tumores cerebrales malignos (Chekenya y Pilkington, 2002). Mediante el implante de células de una línea celular de glioma humano CSPG4-positivo en cerebros inmunodeficientes de ratas desnudas se demostró que estos tumores tenían una densidad microvascular mayor en comparación con los controles, lo que sugiere que la expresión de CSPG4 regula tanto la función como la estructura de la vasculatura tumoral derivada del huésped (Brekke y col, 2006). En un experimento de xenoinjerto de implantación de material de biopsia GMB en ratas desnudas, se identificó que las CSPG4 estaban asociadas principalmente con los vasos sanguíneos tanto en el pericito como en componentes de la membrana basal de la vasculatura tumoral, y la expresión también se asocian con áreas de alta proliferación celular (Chekenya y col, 2002a). Además, la expresión de CSPG4 era paralela a la progresión del tumor en un modelo de implantación de glioma (Wiranowska y col, 2006).

CSPG4 se expresa de forma diferencial en gliomas humanos, con una mayor expresión en gliomas de mayor grado, en comparación con los de menor grado (Chekenya y col, 1999). Existe una correlación entre la expresión elevada de CSPG4 y la resistencia cruzada mediada por una activación aumentada de la transducción de $\alpha\beta 1$ integrina/PI3K y sus dianas en dirección 3', promoviendo la supervivencia celular (Chekenya y col, 2008).

FABP7: las proteínas que aglutinan ácidos grasos (FABP) son proteínas citosólicas de 14-15 kDa que se cree que tienen una función en la absorción, transporte y direccionalización de ácidos grasos (FA). Se cree que aumentan la solubilidad de los ácidos grasos en el citoplasma cuando los transportan entre compartimentos de la membrana y que los transportan a sus dianas en el núcleo (Glatz y col, 2002). Las FABP pueden modular la concentración de ácidos grasos y, de esta forma, influir en diversas funciones celulares como la actividad enzimática, la expresión de los genes o el crecimiento y la diferenciación celular (Glatz y Storch, 2001).

El ARNm de las FABP7 se expresa en tejidos de origen neuroepitelial, así como en tumores malignos de glioma (grado III y IV de la OMS). El gen se mapeó a la banda cromosómica 6q22-23, una región que también contiene el proto-oncogén c-myc y que a menudo sufre pérdida de heterocigosidad en glioma maligno. El análisis de líneas celulares de

glioma maligno mostró que FABP7 suele aparecer co-expresada junto con la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que sugiere que la célula de origen del glioma maligno puede ser una célula precursora astrocítica que tiene el potencial de expresar las dos proteínas de forma normal o como resultado de una formación tumoral (Godbout y col, 1998). La proteína FABP7 muestra una expresión nuclear y citoplasmática de moderada a fuerte en GBM. Las células de glioma transfectedo con FABP7 muestran una migración 5 veces mayor que las células de control. Por lo tanto, la supervivencia en general más corta asociada con la sobreexpresión de FABP7, especialmente en GBM, puede deberse a un aumento de la migración e invasión de las células tumorales en el parénquima cerebral circundante (Liang y col, 2005). Un análisis más exhaustivo de la distribución de FABP7 en tumores de astrocitoma indica niveles elevados de FABP7 en regiones de infiltración de los tumores, lo que sugiere un papel importante de FABP7 en la conducción de la infiltración de células malignas a tejidos cerebrales adyacentes (Mita y col, 2007). FABP7 muestra una localización subcelular y unos niveles de expresión variables en los tejidos gliales y en todos los grados de astrocitoma. Sin embargo, especialmente la localización nuclear de FABP7 parece estar asociada con el fenotipo infiltrante de células de glioma y de las vías EGFR, ya que su translocación nuclear se detecta tras la activación de EGFR y está asociada con un pronóstico pobre en GBM EGFR-positivo. Además, no se observa inmunoreactividad nuclear de FABP7 alguna en el astrocitoma de grado I (Liang y col, 2006; Kaloshi y col, 2007).

Neurologina 4, X-linked es miembro de una familia de proteínas de adhesión celular que parece tener una función en la maduración y función de las sinapsis neuronales. Los miembros de la familia neurologina tienen una organización estructural relacionada, con un péptido de señal N-terminal, el dominio de tipo esterasa con dos sitios de división alternativa, una pequeña región ligadora de identidad de secuencia baja frente al dominio transmembranoso y una parte citosólica corta con un C-terminal altamente conservado. Los niveles más altos de neurologina 4 ARNm relativa se encontraron en el corazón. Se detectó una expresión inferior en el hígado, el músculo esquelético y el páncreas, mientras que en el cerebro, la placenta, los pulmones y los riñones apenas se detectó neurologina 4 ARNm (Bolliger y col, 2001).

Las mutaciones en el gen X-linked NLGN4 son causa potencial de desórdenes de espectro autista, y las mutaciones se han detectado en varios pacientes con autismo, síndrome de Asperger y retraso mental (Jamain y col, 2003; Laumonier y col, 2004; Lawson-Yuen y col, 2008).

Se han descrito pocas asociaciones de NLGN4X con el cáncer: En tumores de estroma gastrointestinales, se ha encontrado sobreexpresión de NLGN4X en niños y adultos jóvenes en comparación con casos de adultos de más edad (Prakash y col, 2005).

Tenascina C: La matriz extracelular que rodea las células tumorales es distinta de la matriz extracelular de tejidos normales. La tenascina-C (TNC) es una proteína de la matriz extracelular que está altamente regulada hacia arriba en procesos asociados estrechamente con actividad migratoria elevada como el desarrollo embrionario (Bartsch y col, 1992), la curación de heridas (Mackie y col, 1988) y procesos neoplásicos (Chiquet-Ehrismann, 1993; Chiquet-Ehrismann y Chiquet, 2003). Además, la TNC aparece sobreexpresada en vasos tumorales con un índice alto de proliferación, lo que indica que la TNC está implicada en la angiogénesis neoplásica (Kim y col, 2000). En el cerebro humano normal, la expresión de la TNC sólo se detecta en raras ocasiones, mientras que se expresa en altos niveles en gliomas malignos (Bourdon y col, 1983). La expresión de TNC puede ser inducida mediante hipoxia (Lal y col, 2001), mediante TGF-beta1, proporcionando un mecanismo para la invasión de gliomas de alto grado en parénquima sano (Hau y col, 2006), o mediante gastrina, que modula de forma significativa la migración de células GBM humanas (Kucharczak y col, 2001). La TNC regula descendientemente la tropomiosina-1 y desestabiliza así las fibras de tensión de actina. Adicionalmente, provoca una regulación descendente del inhibidor de Wnt Dickkopf1. Debido a que la expresión reducida de tropomiosina-1 y la señalización aumentada de Wnt están estrechamente unidas a la transformación y la génesis de tumores, la TNC modula específicamente estos sistemas de transducción de señales para mejorar la proliferación de células de glioma (Ruiz y col, 2004).

En tejidos GBM se observa la coloración perivascular de TNC alrededor de vasos sanguíneos de tumores, mientras que es menos frecuente en gliomas de grado II y III según la OMS, lo que indica que la intensidad de la coloración de TNC está relacionada con el grado del tumor y que la coloración más fuerte indica un pronóstico pobre (Herold-Mende y col, 2002). La TNC también contribuye a la producción de un nicho de células madre dentro de la zona subventricular (SVZ), cuya función es organizar la señalización del factor de crecimiento para acelerar el desarrollo de células madre neurales. El efecto predominante de la TNC en células de la SVZ es la regulación de la evolución del desarrollo (Garcion y col, 2004). TNC es el inductor más fuerte de la migración dirigida de células madre neurales (NSC) humanas. El ECM producido por tumor proporciona así un entorno favorecedor del tropismo de NSC a células de tumor diseminada (Ziu y col, 2006).

La NRCAM (*neuronal cell adhesion molecule*, molécula de adherencia celular neuronal) es una molécula de adherencia celular de transmembrana neuronal con múltiples dominios de tipo inmunoglobulina de tipo C2 y fibronectina de tipo III. Está implicada en la guía, extensión y fasciculación de las células neuronales (Grumet y col, 1991; Morales y col, 1993; Stoeckli y Landmesser, 1995; Perrin y col, 2001; Sakurai y col, 2001) mediante la formación de interacciones homofílicas y heterofílicas con otras IgCAM (Volkmer y col, 1996; Sakurai y col, 1997; Zacharias y col, 1999). La NRCAM de unión a la anquirina (Davis y Bennett, 1994) está regulada ascendientemente en tubo, formando células endoteliales, lo que sugiere una posible función en la formación de tubos y la angiogénesis (Aitkenhead y col, 2002).

El NRCAM es un gen diana del complejo placoglobina-LEF/TCF y β -catenina que contribuye a la oncogénesis (Conacci-Sorrell y col, 2002). El ectodominio de la NRCAM puede ser repelido de la superficie celular mediante actividades de tipo metaloproteasa. Este dominio de repulsión es capaz de activar diversos sistemas de transducción de señales, potencia la motilidad de las células y confiere génesis de tumores en ratones (Conacci-Sorrell y col, 2005).

5 La NRCAM está regulada ascendentemente en astocitomas anaplásicos y tejidos de tumor GBM, en comparación con un cerebro normal, y los niveles aumentados están relacionados con el comportamiento invasivo (Sehgal y col, 1998). El ARN antisentido contra la NRCAM disminuye la capacidad generadora de tumores de las células GBM humanas (Sehgal y col, 1999).

10 La proteína IGF2BP3 es miembro de la familia de proteínas de unión a ARNm del factor de crecimiento II similar a la insulina, implicada en la localización, metabolismo y control traduccional del ARNm. La proteína contiene varios dominios KH (K-homólogos), importantes en la unión a ARN y que se sabe que están implicados en el metabolismo y la síntesis de ARN. La expresión tiene lugar principalmente durante el desarrollo embrionario y ha sido descrita para varios tumores. Así, la proteína IGF2BP3 se considera una proteína oncofetal (Liao y col, 2005). La presencia de altos niveles de transcrito de IGF2BP3 en numerosos tejidos cancerosos, en comparación con los tejidos de control, indica que la proteína IGF2BP3 podría tener un papel funcional en las células transformadas en proliferación. Esta hipótesis se apoya en el descubrimiento de que el único tejido humano no maligno que expresa el transcrito de IGF2BP3 es la placenta humana, un tejido caracterizado por el crecimiento y proliferación celular (Mueller-Pillasch y col, 1997).

15 Por ejemplo, IGF2BP3 se expresa en un espécimen de RCC de células claras y su expresión se asocia con un estado y grado avanzados de tumores primarios. Además, la expresión positiva de IGF2BP3 está asociada a un riesgo aumentado de 5 a 10 veces de metástasis distantes y a un aumento del 42% al 50% del riesgo de muerte por RCC (Hoffmann y col, 2008; Jiang y col, 2006; Jiang y col, 2008).

20 IGF2BP3 también aparece altamente expresado en carcinomas pancreáticos. En dos estudios, más del 90% de las muestras de tejido de tumor pancreático mostraron expresión de IGF2BP3 tras inmunocoloración, mientras que los tejidos pancreáticos no neoplásicos resultaron negativos para IGF2BP3. Además, la expresión aumentó progresivamente con la fase del tumor (Yantiss y col, 2005; Yantiss y col, 2008).

25 La expresión de la proteína IGF2BP3 también se encontró significativamente aumentada en tumores uroteliales de alto grado, mientras que no suele aparecer expresado en tumores uroteliales benignos de bajo grado. Además, la tasa de supervivencia sin evolución y sin enfermedad de los pacientes con tumores IGF2BP3-positivo es muy inferior que la de aquellos con tumores IGF2BP3-negativo (Li y col, 2008; Sitnikova y col, 2008; Zheng y col, 2008).

30 Brevican (BCAN) es un miembro específico del cerebro, de la familia lectican de proteoglicano de sulfato de condroitina. Se han detectado dos isoformas de BCAN: una isoforma completa que es secretada a la matriz extracelular y una isoforma más corta con una secuencia que pronostica un residuo conservado de glicofosfatidilinositol (GPI). La isoforma secretada aparece altamente expresada desde el nacimiento hasta los ocho años de edad y se regula descendientemente a los 20 años, hasta niveles bajos que se mantienen en el córtex normal adulto. La isoforma de GPI se expresa a niveles uniformemente bajos a lo largo del desarrollo (Gary y col, 2000). BCAN pertenece a una familia de proteoglicanos que se suelen describir como moléculas de barrera que previenen la motilidad celular y de neurita en el sistema nervioso adulto (Viapiano y Matthews, 2006). BCAN se expresa *in vivo* cerca de los límites de la corriente migratoria craneal (Jaworski y Fager, 2000) y es un componente principal regulado ascendentemente de la cicatriz de neuroglía tras lesión neural (Jaworski y col, 1999).

35 BCAN muestra una dramática regulación ascendente en los gliomas, donde se puede detectar que la expresión aumenta por siete, aproximadamente, en comparación con los niveles normales. No se detectó ARNm de BCAN en muestras de córtex adulto humano de individuos que fallecieron sin problemas neurológicos. En contraste, se detectó ARNm de BCAN en las 27 muestras quirúrgicas de glioma humano, lo que sugiere que BCAN podría ser un marcador único y selectivo en el glioma (Jaworski y col, 1996).

40 Proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, Zeta1 (PTPRZ1, PTP- ξ) - PTPRZ1 es miembro de la familia de la proteína tirosina fosfatasa de tipo receptor y codifica una proteína de membrana de tipo I de paso único con dos dominios citoplasmáticos tirosina-proteína fosfatasa, un dominio de anhidrasa alfa-carbónica y un dominio de fibronectina de tipo III. La expresión de este gen es inducida en células de cáncer gástrico (Wu y col, 2006), en cáncer de mama (Perez-Pinera y col, 2007), en los oligodendrocitos en remielinización de lesiones múltiples de esclerosis (Harroch y col, 2002) y en células embrionarias humanas de riñón en condiciones hipóxicas (Wang y col, 2005).

45 Tanto la proteína como el transcrito están sobreexpresados en células del glioblastoma, lo que promueve su migración haptotáctica (Lu y col, 2005) y la amplificación de ADN genómica en el glioblastoma (Mulholland y col, 2006).

50 Chitinasa 3-Like 2 (CHI3L2) - CHI3L2 fue identificada inicialmente a partir de condrocitos y aparece regulada ascendentemente, por ejemplo, en la osteoartritis (Steck y col, 2002). A pesar de que la proteína todavía no está bien caracterizada, lo más probable es que se secrete al espacio extracelular. A menudo se ha descrito como antígeno diana en la artritis reumatoide. La inducción experimental de anti-angiogénesis mediante transfección de ARNs (VEGF-A) de una línea celular de glioma humano provocó una regulación ascendente de CHI3L2.

Survivin (BIRC5) - La expresión de BIRC5 (survivin), miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), aumenta en los tejidos fetales y en diversos cánceres humanos. Parece capaz de regular tanto la proliferación celular como la muerte celular programada. Se detectan niveles muy altos de expresión de survivin, especialmente en el glioblastoma (Angileri y col, 2008). Se ha sugerido que la sobreexpresión de survivin en gliomas cerebrales podría desempeñar una función importante en la proliferación maligna, la anti-apoptosis y la angiogénesis (Zhen y col, 2005; Liu y col, 2006). La expresión de survivin se asoció significativamente con grados de malignidad, especialmente en el glioblastoma, pero también en otras entidades tumorales (con la expresión más alta de survivin en el glioblastoma), y con periodos generales de supervivencia más cortos, en comparación con pacientes con tumores survivin-negativos (Kajiwara y col, 2003; Saito y col, 2007; Uematsu y col, 2005; Mellai y col, 2008; Grunda y col, 2006; Xie y col, 2006; Sasaki y col, 2002; Chakravarti y col, 2002).

Las proteínas de la familia de la metaloproteínasa de la matriz (MMP) participan en la ruptura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de tejido, así como en procesos patológicos como la artritis y la metástasis (Mott 2004). La metaloproteínasa 7 de la matriz (MMP7) es secretada como pro-proteína inactiva de 29,6 kDa, que se activa cuando es hendida por proteinasas extracelulares. La enzima activa tiene un peso molecular de 19,1 kDa y une dos iones de zinc y dos iones de calcio por subunidad (Miyazaki 1990; Browner 1995). MMP7 degrada gelatinas, fibronectina y caseína (Miyazaki 1990; Quantin 1989) y se diferencia de la mayoría de los miembros de la familia MMP en que carece de dominio C-terminal conservado (Gaire 1994). MMP7 se encuentra a menudo sobreexpresado en tejido maligno (Lin 2004; Bramhall 1997; Denys 2004) y se ha sugerido que facilita la invasión in vivo de células tumorales (Wang 2005).

Estas proteínas pueden ser el blanco de una respuesta inmune específica de tumor en muchos tipos de cáncer.

El péptido del antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B HBV-001 no deriva de un antígeno humano endógeno asociado a tumor, sino del antígeno de núcleo del virus de la hepatitis B. En primer lugar, permite la comparación cuantitativa de la magnitud de las respuestas de los linfocitos T inducidos por péptidos asociados a tumores (TUMAP) utilizados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, y, por lo tanto, permite estudiar su habilidad para provocar respuestas anti-tumorales. En segundo lugar, actúa como importante control positivo en caso de carencia de respuestas de linfocitos T en el paciente. En tercer lugar, también permite controlar la inmunocompetencia del paciente.

La infección del virus de hepatitis B (HBV) es una de las principales causas de enfermedad de hígado, que afecta a, aproximadamente, 350 millones de personas en todo el mundo (Rehermann 2005). Debido a la facilidad de transmisión tanto horizontal como vertical y al potencial de enfermedad crónica que puede resultar en cirrosis de hígado y carcinoma hepatocelular, el HBV supone un impacto en los sistemas de salud públicos de muchos países. El genoma del HBV (Previsani 2002) comprende ADN circular parcialmente bicatenario. En viriones de HBV, aparece junto con la proteína nuclear HBc y otras proteínas para formar la nucleocápsida, rodeada de una envoltura exterior que contiene lípidos y la familia de proteínas de superficie HBs (también llamadas proteínas de envoltura). Los determinantes antigénicos asociados con HBc y HBs se indican con las siglas HVcAg y HBsAg, respectivamente. Estos antígenos están asociados a respuestas serológicas -es decir, de anticuerpos- encontradas en la sangre del paciente y se encuentran entre los sistemas antígeno-anticuerpo clínicamente más útiles para el diagnóstico de la infección por HBV. HBc representará un novedoso antígeno para los individuos sin historia previa de infección de HBV. Debido a que los péptidos inmunógenos para este antígeno se conocen bien (Bertoletti 1993; Livingston 1997), se seleccionó un péptido de diez aminoácidos de HBcAg como antígeno de control positivo dentro de IMA: La inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de péptidos HBc se utilizará entonces como marcador de la inmunocompetencia del paciente y para la vacunación correcta.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser usadas para su administración parenteral como, por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular o por vía oral. Para ello, los péptidos son disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable y preferiblemente acuoso. Además, la composición también puede contener excipientes como antioxidantes, agentes de mantenimiento, soluciones reguladoras, aglutinantes, agentes blásticos, diluyentes y aromas. Los péptidos también pueden administrarse junto con substancias estimulantes de la respuesta inmune, como las citocinas. Una lista completa de excipientes que pueden usarse para esta composición aparece, por ejemplo, en A. Kibbe, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», 3. Ed., 2000, *American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press*. Las composiciones de la invención pueden usarse para la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades adenomatosas o cancerosas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas a un paciente que sufre una enfermedad adenomatosa o cancerosa asociada con el correspondiente péptido o antígeno de las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 10 o a un paciente que sufre cáncer del cerebro, en particular glioma, especialmente enfermedad cancerosa de glioblastoma asociada al correspondiente péptido o antígeno de las secuencias SEQ ID N.º 11 a la SEQ ID N.º 22 o 11 a la SEQ ID N.º 23. Los péptidos de la composición farmacéutica son capaces de desencadenar en el paciente una respuesta inmune mediada por linfocitos T. Como se ha mencionado más arriba, en el caso del cáncer de células renales, una composición farmacéutica conforme a la presente invención comprende preferentemente un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 1 y/o SEQ ID N.º 2 y, además, comprende al menos un péptido adicional asociado a tumor que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las secuencias SEQ ID N.º 3 a SEQ ID N.º 10. En el caso del cáncer de cerebro, en particular glioma y, especialmente, cáncer de glioblastoma, la composición farmacéutica comprende preferiblemente una secuencia

expuesta en las secuencias SEQ ID N.º 12 y/o SEQ ID N.º 13 y, además, comprende al menos un péptido adicional asociado a tumor que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las secuencias SEQ ID N.º 11 y la SEQ ID N.º 14 a la SEQ ID N.º 22 y/o la SEQ ID N.º 23.

5 Preferentemente, los péptidos presentes en composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen una longitud media de entre 9 y 100 aminoácidos, preferiblemente entre 9 y 30 y, más preferiblemente, entre 9 y 16. Además, al menos un péptido conforme a cualquiera de las secuencias SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 23 puede incluir enlaces no peptídicos.

10 Una composición farmacéutica preferida de la invención (preferentemente para la vacuna de cáncer de células renales) comprende un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 1 y/o la secuencia SEQ ID N.º 2, y, en otras modalidades, comprende, además, al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 3 a SEQ ID N.º 11.

15 Otra composición farmacéutica preferida de la invención (cáncer de cerebro, en particular glioma y, especialmente, vacuna para el cáncer de glioblastoma) comprende un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 12 y/o la secuencia SEQ ID N.º 13, y, en otras modalidades, comprende, además, al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 11 a SEQ ID N.º 22 y/o SEQ ID N.º 23.

20 El péptido también podrá estar etiquetado, o ser una proteína de fusión o ser una molécula híbrida. Los péptidos cuya secuencia se da en la presente invención han de estimular el linfocito T citotóxico CD8⁺. Sin embargo, la estimulación es más eficiente con la ayuda de linfocitos T CD4⁺. Así, las secciones de fusión de una molécula híbrida proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4⁺. Estos epítomos son conocidos por los expertos en la materia e incluyen a los identificados en el toxoide tetánico. En otra modalidad, el péptido es una proteína de fusión que comprende, en particular, aminoácidos N-terminales de la cadena invariante (Ii) asociada al antígeno HLA-DR. En una modalidad, el péptido de la invención es una proteína humana truncada o una proteína de fusión de un fragmento proteico y otra porción de polipéptido, siempre que la porción humana incluya una o más secuencias de aminoácidos de invención.

25 Los péptidos útiles en la composición farmacéutica pueden ser sustancialmente puros o estar combinados con un adyuvante inmunoestimulante, o pueden ser utilizados en combinación con citocinas inmunoestimulantes o administrados con un sistema de liberación adecuado como, por ejemplo, liposomas. La vacunación con péptidos necesita, en general, de adyuvantes y, como tal, se prefiere GM-CSF (GM-CSF humano se puede adquirir como Sargramostim[®], Leukine[®], disponible en Berlex ahora Bayer HealthCare Pharmaceuticals). Otros adyuvantes adecuados son el estímulo QS21 de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EUA), derivado de la saponina; extractos micobacterianos y pared bacteriana mimética sintética y adyuvantes registrados como el Detox. Quil A, otro adyuvante derivado de la saponina, también puede ser usado (Superfos, Dinamarca). Otros adyuvantes, como el adyuvante de Freund, también pueden ser útiles. También puede ser útil administrar el péptido conjugado con un vehículo apropiado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase el documento WO 95/18145 y Longenecker y col. (1993) «Ann. NY Acad. Sci.» 690,276-291). Teniendo en cuenta que un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmune ante un antígeno (MedlinePlus[®] Medical Dictionary, NIH), pueden utilizarse otras sustancias que cumplan esta función, incluyendo agonistas del receptor Toll-Like (agonistas TLR), preferiblemente sustancias que interaccionen de forma agonista con los TLR 3, 7, 8 y, más preferiblemente, con el TLR 9, como el ARN estabilizado por protamina, oligonucleótidos CpG, oligonucleótidos CpR, ADN bacteriano, imidazoquinolinas, etc.

30 40 Otras sustancias conocidas adecuadas para potenciar una respuesta inmune incluyen inhibidores de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), arginasa (ARG1), indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), ciclooxigenasa-2 (COX-2) o del receptor I del TGF beta (TGF-beta-RI). Dichos inhibidores pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra las moléculas o contra moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas y los anticuerpos monoclonales con función inhibidora conocida hacia los factores mencionados anteriormente y, por tanto, con un efecto potenciador de la respuesta inmune, son, por ejemplo: 1-MT, NCX-4016, rofecoxib, celebrex, BEC, ABH, nor-NOHA, SB-505124, SD-208, LY580276, AMD3100, axitinib, bevacizumab, JSI-124, CPA-7, XL-999, ZD2171, pazopanib, CP-547632 y VEGF Trap.

45 50 Además, las sustancias que reducen el número de linfocitos T reguladores (CD 4+, CD25+, FoxP3+) son adecuadas como adyuvantes. Entre estas sustancias se incluyen las siguientes: ciclofosfamida (Cytosan), ONTAK (denileukin difitox), Sunitinib, anti-CTLA-4 (MDX-010, CP-675206), anti-CD25, anti-CCL22 y anti-GITR.

55 Las cantidades preferidas de péptidos en composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar entre unos 0,1 y 100 mg, preferentemente entre unos 0,1 y 1 mg y, con mayor preferencia, entre unos 300 µg y 800 µg por 500 µl de solución. Con el término «unos» implicamos un porcentaje de +/- 10 del valor dado, si no se establece de otra forma. El experto en la materia sabrá ajustar la cantidad real de péptido necesaria basándose en diversos factores como, por ejemplo, el estado inmunitario del paciente individual y/o la cantidad de TUMAP presentado en un tipo particular de cáncer.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención proporcionan una formulación con una solubilidad extremadamente mejorada y la humectación del liofilizado en composiciones ya conocidas. Esto se consiguió utilizando

una composición especial de excipientes. En este sentido, se desarrollaron composiciones farmacéuticas de la presente invención que comprenden péptidos de las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 10 o SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID N.º 11 y variantes de las mismas, que muestran una excelente estabilidad de almacenamiento a (-20°C, +5°C, +25°C) que pueden resolubilizarse fácilmente.

- 5 El término «estabilidad de almacenamiento» significa que el porcentaje de subproductos no alcanza más del 5% en dos años. Además, el término «estabilidad» significa que las propiedades específicas como la solubilidad, la claridad óptica de la solución y el número de partículas en la solución no cambian perceptiblemente durante ese espacio de tiempo.

- 10 El término «resolubilizarse fácilmente» significa que el liofilizado puede disolverse completamente mediante el uso de un amortiguador u otros excipientes, desde unos segundos hasta dos minutos sin hacer uso de un homogeneizador ultrasónico. Además, la composición puede administrarse fácilmente a un paciente que necesite tratamiento por vía i.d. y con menor preferencia por vía s.c. El valor pH de la solución resultante deberá ser entre pH 2,7 y pH 9.

- 15 En otra modalidad, una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir azúcares, alcoholes de azúcar, aminoácidos como la glicina, arginina, ácido glutamínico y otros como molde marco. Los azúcares pueden ser mono-, di- o trisacáridos. Estos azúcares pueden utilizarse solo así como en combinación con alcoholes de azúcar. Algunos ejemplos de azúcares incluyen glucosa, manosa, galactosa, fructosa o sobosa, como monosacáridos; sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa como disacáridos; y rafinosa como trisacárido. Un alcohol de azúcar puede ser, por ejemplo, la manitosa. Los ingredientes preferidos son la sacarosa, la sucrosa, la lactosa, la maltosa, la trehalosa, el manit y/o sorbit y, con mayor preferencia, el manitol.

- 20 Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir excipientes bien tolerados fisiológicamente (véase *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th ed, editado por Raymond Rowe, Paul Sheskey y Sian Owen, Pharmaceutical Press [2006]), como los antioxidantes como el ácido ascórbico o la glutatona, agentes conservadores como fenol, m-cresol, metil- o propilparabeno, clorobutanol, tiomersal o benzalconiumcloruro, estabilizador, molde marco como sacarosa, sucrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, manitosa, manit y/o sorbit, manit y/o lactosa y solubilizador como polietilenglicoles (PEG), es decir, PEG 3000, 3350, 4000 o 6000, o ciclodextrinas, es decir, hidroxipropilo-β- ciclodextrina, sulfobutiletil-β-ciclodextrina o γ-ciclodextrina, o dextranos o poloxómeros, es decir, poloxámero 407[®], poloxámero 188, o Tween[®] 20, Tween[®] 80. En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen uno o más excipientes bien tolerados, seleccionados del grupo consistente en antioxidantes, moldes marco y estabilizadores.

- 30 La presente invención hace referencia al descubrimiento de que las formulaciones, incluyendo al menos dos conjuntos de los péptidos conformes a las secuencias SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 10 o SEQ ID N.º 1 a la SEQ ID N.º 11, manitol y poloxámero 188 en una tasa determinada, llevan a composiciones que muestran una estabilidad muy mejorada y que pueden disolverse sin tratamiento ultrasónico. Además, la solvatación sólo requiere unos segundos. Como especificación del liofilizado, debe observarse por inspección visual una solución de clara a opalescente tras la reconstitución con solución de bicarbonato sódico al 4,2%. Estas características de resolubilización de las composiciones farmacéuticas de la presente invención son reproducibles incluso tras el almacenamiento del producto farmacéutico a -20 °C, +5 °C and +25 °C durante 2 años.

- 35 Además, la presente invención hace referencia a formulaciones que incluyen al menos cuatro conjuntos de los péptidos conforme a las secuencias SEQ ID N.º 11 a SEQ ID N.º 22, SEQ ID N.º 11 a SEQ ID N.º 23, SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 22 o SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 23, en donde el manitol y el poloxámero 188 en una determinada tasa resultan en composiciones que pueden ser fácilmente disueltas. Como especificación del liofilizado, debe observarse por inspección visual una solución de clara a opalescente tras la reconstitución con solución de bicarbonato sódico al 4,2%. Los péptidos individuales en la formulación descrita son estables durante al menos 3 meses tras su almacenamiento a 20 °C, +5 °C y +25 °C.

- 40 En una modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una tasa particular de péptidos:manitol:Tween[®] 80 (por peso), incluyendo y en un rango de 1:2:1,5 a 1:8:2,2. Véase el gráfico más abajo para otras tasas preferentes, incluidas en la presente invención. Una tasa especialmente preferida es 1:5:2. Otra tasa especialmente preferida es 1:8:2.

- 45 En otra modalidad preferida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una tasa particular de péptidos:manitol:poloxámero 188 (por peso), incluyendo y en un rango de 1:5:1,5 a 1:8:2,2. Véase el gráfico más abajo para otras tasas preferentes, incluidas en la presente invención. Una tasa preferida es 1:5:1.

Otra tasa especialmente preferida de péptidos:manitol:poloxámero 188 por peso es 1:8:2. Una composición de mayor preferencia incluye una mezcla de péptidos:manitol:poloxámero 188[®] en una tasa de 1:5:2 por peso (véase el ejemplo 2). Otra tasa incluye péptidos:manitol:poloxámero 188 a una tasa de 1:0:2 a 1:2:2,2 por peso.

Otras modalidades de la presente invención incluyen las siguientes tasas por peso:

- 55 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar liofilizadas. El liofilizado obtenido puede ser reconstituido en una composición hidratada añadiéndose un solvente hidratado. Preferentemente, la composición hidratada se puede administrar directamente al paciente por vía parenteral. Por lo tanto, otra modalidad de la presente

invención es una composición farmacéutica hidratada de las formulaciones descritas anteriormente, que se pueden obtener mediante reconstrucción del liofilizado descrito anteriormente con un solvente hidratado.

5 El rango de pH aceptable es pH 2 - 12 para la administración intravenosa e intramuscular, pero, a nivel subcutáneo, el rango se reduce a 2,7 - 9,0, ya que la tasa de dilución *in vivo* se reduce, lo que resulta en un mayor potencial de irritación en el sitio de inyección. Strickley Robert G, Pharm. Res, 21, NO:2, 201 - 230 (2004).

Preferentemente, la composición farmacéutica hidratada de la invención tiene un valor de pH de 7 a 9 y, con mayor preferencia, un valor pH de 8 a 9 y, con preferencia aún mayor, un valor pH de 8,3 a 8,7.

10 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son bien toleradas fisiológicamente, fáciles de producir, se dosifican con exactitud y muestran una excelente estabilidad de almacenamiento con respecto a la concentración, los productos de descomposición y los agregados del período de almacenamiento. Las preparaciones se pueden almacenar de forma estable durante 2 años en un congelador a -20 °C, en una nevera a (+2-8 °C) e incluso a temperatura ambiente (+25 °C), humedad relativa del 60 % .

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son estériles y están formuladas para su administración *in vivo*.

15 La presente invención también describe un método para aumentar la respuesta inmune en un sujeto, método que comprende la administración en el sujeto necesitado del mismo de una composición farmacéutica de la presente invención, en donde los mencionados péptidos, variantes o sales son administrados en una cantidad efectiva, preferentemente una cantidad efectiva para aumentar dicha respuesta inmune. La invención proporciona, además, el uso de una composición farmacéutica de la invención en un medicamento para su administración a un sujeto, con el fin de provocar una respuesta inmune contra el cáncer. También se describe el uso de una composición farmacéutica de la presente invención para el tratamiento del cáncer, preferiblemente del cáncer renal, y el uso en la fabricación de un medicamento para su administración a un sujeto, con el fin de provocar una respuesta inmune contra el cáncer y, de esta forma, tratar el cáncer.

20

25 Los péptidos utilizados en la composición farmacéutica son preferentemente puros, o esencialmente puros y, preferentemente, esencialmente homogéneos (es decir, libres de proteínas o péptidos contaminantes, etc.) «Esencialmente puros» significa una preparación peptídica con una pureza por HPLC de, al menos, el 90 % y, preferiblemente, al menos 95%. Una preparación «esencialmente homogénea» significa una preparación peptídica que comprende, al menos, un 99% del péptido, en base al peso total del péptido en la preparación.

La presente invención incluye, además, un kit que comprende:

- 30 (a) un contenedor que contiene una composición farmacéutica como la descrita anteriormente, en solución o en forma liofilizada;
- (b) opcionalmente, un segundo contenedor con un diluyente o solución reconstituyente para la formulación liofilizada; y
- (c) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

35 El kit puede comprender además una unidad o más de (i) un amortiguador, (ii) un diluyente, (iii) un filtro (iv) una aguja y (v) una jeringuilla. El contenedor es, preferentemente, una botella, un vial, una jeringuilla o un tubo de pruebas; y puede ser un contenedor multiusos. Preferentemente, la composición farmacéutica está liofilizada.

40 Los kits de la presente invención comprenden preferentemente una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Algunos contenedores adecuados son, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringuillas (como jeringuillas de doble cámara) y tubos de prueba. El contenedor puede estar formado a partir de una variedad de materiales, como vidrio o plástico. Preferentemente, el kit y/o contenedor contiene(n) instrucciones sobre o asociadas al contenedor, que indican los pasos para la reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada debe ser reconstituida con las concentraciones de péptidos descritas más arriba. La etiqueta también puede indicar que la formulación es útil o está pensada para administración subcutánea.

45 El contenedor que contenga la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El kit puede comprender además un segundo contenedor que comprenda un diluyente adecuado (por ejemplo, solución de bicarbonato sódico).

50 Al mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de péptidos en la formulación reconstituida es preferentemente de, al menos, 0,15 mg/mL/péptido (=75 µg) y, preferentemente, no mayor de 3 mg/mL/péptido (=1500 µg). El kit también puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de uso, incluyendo otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones de uso.

Los kits de la presente invención pueden tener un contenedor único que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas conforme a la presente invención con o sin otros compuestos (por ejemplo, otros compuestos o

composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden tener un contenedor distinto para cada componente.

5 Preferiblemente, los kits de la invención incluyen una formulación de la invención embalada para su uso en combinación con la co-administración de un segundo compuesto (como adyuvantes [por ejemplo, GM-CSF, un agente quimioterapéutico, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o un agente anti-angiogénesis, un agente inductor de apoptosis o un quelante]) o una composición farmacéutica del mismo. Los componentes de kit pueden haber sido combinados previamente, o bien cada componente puede estar en un contenedor distinto antes de la administración al paciente. Los componentes del kit pueden proporcionarse en una o más soluciones líquidas, preferiblemente, en una solución acuosa y, más preferiblemente, en una solución acuosa estéril. Los componentes del kit también se pueden proporcionar como sólidos, que pueden ser convertidos en líquidos por adición de solventes adecuados, que se proporcionan, preferentemente, en otro contenedor distinto.

10 El contenedor de un kit terapéutico puede ser un vial, un tubo de pruebas, un matraz, una botella, una jeringuilla o cualquier otro medio para sólido o líquido. Normalmente, cuando hay más de un componente, el kit contendrá un segundo vial u otro contenedor, lo que permite una dosificación por separado. El kit también puede contener otro contenedor para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, un kit terapéutico contendrá aparatos (por ejemplo, una aguja o más, jeringuillas, goteros de ojos, pipetas, etc.) que permitan la administración de los agentes de la invención que son componentes del kit.

15 La presente formulación es adecuada para la administración de los péptidos por cualquier ruta aceptable, como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferentemente, la administración es s.c. y, con mayor preferencia, i.d. La administración puede ser por bomba de infusión.

Procedimiento de prueba analítico:

La identidad, la pureza y el contenido en péptidos se determinan por cromatografía analítica RP-HPLC. La longitud de onda de detección fue de 220 nm.

Prueba de la estabilidad (estabilidad de las formulaciones de prueba):

25 a) Vacuna para el cáncer de células renales:

Se probaron diversos liofilizados con respecto a la estabilidad de cada péptido individual a +25 °C y +40 °C mediante un ensayo analítico de HPLC. Las pruebas de tensión a +25 °C y +40 °C se efectuaron para determinar la estabilidad de la formulación a temperatura ambiente y a mayores temperaturas.

30 Los péptidos conforme a las secuencias SEQ ID N.º 1 a 10 se liofilizaron sin excipientes y con adición de manitol y poloxámero 188 (Lutrol® F68) o Tween® 80.

Se generaron las siguientes formulaciones de prueba y se evaluó la estabilidad a +25 °C y +40 °C por ensayo analítico de HPLC:

Formulación 1: péptidos sin excipientes;

Formulación 2: péptidos : manitol : Lutrol® F68 (poloxámero188) (1:5:2 por peso);

35 Formulación 3: péptidos : manitol : Tween® 80 (1:5:2 por peso); y

Formulación 4: péptidos : manitol : Tween® 80 (1:5:1 por peso).

40 Las mediciones iniciales de HPLC se han efectuado para cada formulación antes del almacenamiento en una cámara climática. Para este propósito, el contenido de dos viales se disolvió completamente en ácido acético al 30% y fue medido por RP-HPLC mediante determinación por repetición. Para asegurar la compatibilidad entre las mediciones individuales, se utilizó β-Naftil-alanina como estándar interno, y liofilizada junto con los péptidos.

Tras 7, 14, 21, y 28 días, se eliminaron otros dos viales de la cámara climática para evaluar la estabilidad.

La evaluación de los datos se efectuó por determinación por repetición de un vial. Para un punto temporal y una temperatura, se utilizaron dos viales independientes para obtener, en total, cuatro puntos de datos. Estos valores se han tomado para calcular la desviación estándar mostrada en barras de error en el diagrama correspondiente.

45 Como resultado de los experimentos, la estabilidad de cada péptido individual de la formulación con manitol y Lutrol® F68 es comparable con los resultados obtenidos por la formulación sin excipientes. Las formulaciones con Tween® 80 muestran una degradación mejorada de IMA-RGS-001, especialmente a +40 °C, y un aumento de la señal, especialmente para el péptido IMA-ADF-001. Este aumento podría deberse a la elución conjunta de impurezas causadas por degradación de los péptidos.

b) Vacuna para el cáncer de células del glioblastoma:

Se probaron diversos liofilizados con respecto a la solubilidad y estabilidad de los péptidos formulados en la mezcla.

Los péptidos conforme a las secuencias SEQ ID N.º 11 a la SEQ ID N.º23 se liofilizaron sin excipientes y con adición de manitol/poloxámero 188 (Lutrol® F68) y manitol/Tween® 80.

5 Se generaron las siguientes formulaciones de prueba, y se probó su solubilidad en distintas soluciones y su estabilidad a +25 °C y +40 °C.

Formulación 1: péptidos sin excipientes;

Formulación 2: péptidos : manitol : Lutrol® F68 (poloxámero188) (1:5:2 por peso);

Formulación 3: péptidos : manitol : Tween® 80 (1:5:2 por peso).

10 La estabilidad de ambas formulaciones fue igualmente buena. La solubilidad fue mejor utilizando la formulación 2, que produjo una mezcla clara e incolora, mientras que la formulación tres exhibió, en algunos casos, una pequeña precipitación a altas concentraciones. Con la formulación 1 no fue posible disolución alguna.

Como resultado de los experimentos, la estabilidad de cada péptido individual de la formulación con manitol/Lutrol® F68 y manitol/Tween® 80 es comparable con los resultados obtenidos por la formulación sin excipientes. Sin excipientes, la formulación no es soluble es soluciones adecuadas (por ejemplo, hidrogenocarbonato de sodio [4,2%]).

15 **Cálculo de la potencia para la preparación IMA901:**

Se probó el efecto de los excipientes poloxámero 188 y manitol en la eficiencia de sensibilización de linfocitos T. Los excipientes no activos en la formulación IMA901 son poloxámero 188 (Lutrol® F68) y manitol. Estos dos excipientes no estaban contenidos en la formulación de IMA901 en el ensayo de fase 1, y se incluyeron en la formulación del ensayo de fase 2 para mejorar la solubilidad y la estabilidad en uso de IMA901. En este estudio, se probó la influencia de estas sustancias en la eficiencia de sensibilización de linfocitos T en un modelo de ratón, tras la inmunización peptídica con un péptido de modelo murino. No se observaron efectos tóxicos del poloxámero 188 (Lutrol® F68) ni del manitol. Se analizó la sensibilización de los linfocitos T mediante coloración de los tetrámeros y citometría de flujo *ex vivo*, nueve días después de la inmunización. La adición de poloxámero (Lutrol® F68)/manitol a la solución de inmunización no altera la eficiencia de sensibilización de linfocitos T CD8⁺.

25 **Principio del test**

30 Inmunización: Para la sensibilización de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, el péptido inmunógeno Ova₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) de unión a H2-K^b, en combinación con un adyuvante usado comúnmente en la inmunización de ratones (CpG desoxioligonucleótido), en un amortiguador bicarbónico al 4,2%, se inyectó intradérmicamente en ratones hembra de 8-12 semanas de edad (cadena C57BL/6, H2^b, 3 ratones por grupo). Se compararon las soluciones de la inyección con y sin poloxámero 188 (Lutrol® F68 [16,5 mg/ml]) y manitol (41,3 mg/ml). Las concentraciones de los excipientes son las mismas que las planeadas para la solución de inyección IMA901. Se inmunizaron los controles positivos por vía subcutánea con una solución peptídica con CpG emulsionado en Titermax® classic (Sigma-Aldrich)

35 Coloración de los tetrámeros: Después de 9 días, se sacrificó a los ratones y los linfocitos T específicos de Ova₂₅₇₋₂₆₄ del bazo se analizaron *ex vivo* con coloración de tetrámeros y citometría de flujo. La tecnología de tetrámeros permite una detección específica y sensible de linfocitos T que portan el receptor de linfocitos T compatible.

40 Resultados: No se observaron efectos tóxicos del poloxámero 188 (Lutrol® F68 BASF, Ludwigshafen, Alemania)/manitol, ni localmente en los sitios de inyección, ni sistémicamente. El grupo de control positivo, el grupo de CpG y el grupo de CpG/poloxámero 188/manitol mostraron frecuencias de linfocitos T específicos de péptidos significativamente más elevadas, en comparación con los controles negativos ($p < 0,05$). No se detectó una diferencia significativa entre el CpG solo y el grupo CpG/poloxámero 188/manitol.

La posibilidad de poblaciones positivas observadas artificialmente se excluyó mediante la coloración por tetrámeros de las células específicas de péptidos proliferadas, tras cinco días de estimulación *in vitro* con el péptido (no se muestra).

45 En conclusión, la presencia de poloxámero 188 (Lutrol® F68)/manitol en el cóctel de inmunización no altera en los ratones las respuestas inmunes desencadenadas por péptidos y, por lo tanto, no cabe esperar, en general, influencias adversas o desfavorables del poloxámero 188 (Lutrol® F68) ni del manitol en la eficacia y seguridad de la inmunoterapia basada en péptidos.

Materiales y métodos

Los péptidos usados para la fabricación de las distintas formulaciones han sido sintetizados y suministrados por Bachem AG, Suiza.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

5

Se prepararon soluciones madre de cada péptido individual por disolución de los péptidos en los solventes adecuados, conforme a características de solubilización (véase la tabla 2). 1,47 mL de las soluciones altamente concentradas de péptidos (péptidos 5 a 10) y 7,34 mL de las soluciones de péptidos 1 a 4 se combinaron por adición de 1,47 mL de ácido acético al 10%. La mezcla fue sometida a agitación vorticial durante 2 minutos y tratada en baño ultrasónico durante 1 minuto. Aproximadamente 1 mL de la solución clara resultante fue transferida a viales de vidrio, y seguidamente se añadieron 19,2 mg de manitol y 50 µL de una solución madre de Tween® 80 (77 mg de Tween® 80 disueltos en una solución de ácido acético al 30%). En unos minutos se congeló la solución a -40 °C y se liofilizó durante 14 horas a 0,06 mbar, a lo que siguieron 6 horas de periodo de secado a 0,003 mbar (véase la tabla 3).

10

Tabla 2: péptidos utilizados para el ejemplo 1.

ID de SEQ peptídica N.º	Péptido	Contenido en péptidos (%)	Cantidad [mg]	Solvente [ml]
4	IMA-CCN-001	95.5	16.65	7.57 (50% HAc)
6	IMA-GUC-001	88.8	17.72	7.50 (90% HAc)
3	IMA-ADF-001	91.7	17.35	7.58 (10% HAc)
2	IMA-ADF-002	94.0	16.95	7.58 (10% HAc)
10	IMA-RGS-001	89.4	17.66	1.50 (10% HAc)
8	IMA-MET-001	91.8	17.68	1.55 (50% HAc)
9	IMA-MUC-001	90.6	17.84	1.54 (10% HAc)
1	IMA-MMP-001	89.6	17.92	1.53 (WFI)
4	IMA-APO-001	92.1	17.76	1.56 (WFI)
7	IMA-K67-001	92.4	17.22	1.52 (WFI)

Tabla 3: parámetros de liofilización para el ejemplo1.

Tratamiento	Tiempo	Vacío	Temperatura
congelación	3:00	atm	- 40 °C
secado primario	0:10	0.06 mbar	- 39 °C
secado primario	3:00	0.06 mbar	- 20 °C
secado primario	10:00	0.06 mbar	+ 0 °C
secado primario	6:00	0.06 mbar	+ 20 °C
secado secundario	3:00	0.003 mbar	+ 20 °C
secado secundario	6:00	0.003 mbar	+ 25 °C

Ejemplo 2:

15

Se generó un lote de GMP con 2,000 viales con 578 µg por péptido individual por vial, más manitol y poloxámero 188. La formulación incluye los péptidos, manitol y poloxámero 188 en una tasa de 1:5:2 [w:w.w].

Cada péptido individual liofilizado se pesó conforme a las cantidades listadas en la tabla 4 en vasos de vidrio separados. Tras ser pesados, todos los péptidos se disolvieron en un solvente especificado.

Tabla 4: péptidos utilizados para el ejemplo 2.

ID de SEQ peptídica N.º	Péptido	Cantidad neta [mg]	Contenido en péptidos [%]	Cantidad bruta [mg]	Solvente [ml]
4	IMA-CCN-001	1156.00	91.6%	1262.01	550 (50% HAc)
6	IMA-RGS-001	1156.00	83.2%	1389.42	110 (10% HAc)
3	IMA-GUC-001	1156.00	92.9%	1244.35	550 (90% HAc)
2	IMA-MET-001	1156.00	92.6%	1248.38	110 (50% HAc)
10	IMA-ADF-001	1156.00	93.3%	1239.01	540 (10% HAc)
8	IMA-ADF-002	1156.00	95.5%	1210.47	540 (10% HAc)
9	IMA-MUC-001	1156.00	87.2%	1325.69	110 (10% HAc)
1	IMA-MMP-001	1156.00	88.6%	1304.74	110 (WFI)
4	IMA-APO-001	1156.00	95.0%	1216.84	110 (WFI)
7	IMA-K67-001	1156.00	88.3%	1309.17	110 (WFI)

Debido a las distintas solubilidades de los péptidos, deben ser disueltos conforme al orden proporcionado en la tabla 4, comenzando con el péptido 1. Se usaron distintas cantidades y concentraciones de solución de ácido acético y agua para la inyección (WFI) para disolver los péptidos, debido a diferencias en la solubilidad de los péptidos y con respecto al volumen final de relleno de la solución madre. Para mejorar la solubilidad, cada vial se trató por agitación vigorosa durante un máximo de cinco minutos y, en caso necesario, por sonicación, durante un máximo de cinco minutos. Las cantidades y concentraciones que se deben usar también se muestran en la tabla 4.

Una vez que los péptidos se han disuelto sin problemas, las soluciones deben mezclarse en el orden dado en la tabla 4, comenzando con el péptido número 1. Las soluciones se reúnen en un contenedor de vidrio esterilizado. Los viales individuales de péptido se aclaran con una solución de 105 ml de ácido acético (30%). Finalmente, esta solución se añade a la mezcla de la solución peptídica y se remueve durante cinco minutos.

Se añadieron 23,1 g de poloxámero 188 (Lutrol® F68) y 57,8 g de manitol a la mezcla peptídica y se removió toda la solución durante cinco minutos.

La solución madre con los 10 péptidos y los excipientes se filtró por un filtro estéril con un tamaño de los poros de 0,22 µm. 1,485 ml de solución se depositaron en viales de vidrio 2R esterilizados en condiciones estériles y en una atmósfera de nitrógeno inerte, se pre-sellaron y se transportaron al liofilizador para su liofilización. El proceso de liofilización (véase la tabla 5) incluye la congelación de los viales a una temperatura de -45 °C, un aumento escalonado de la temperatura a +20 °C (fase principal de secado) y un paso final de secado a +25 °C. Cuando el ensayo se completó, el liofilizador se devolvió a la presión atmosférica utilizando nitrógeno seco filtrado por un filtro estéril.

Tabla 5: parámetro de liofilización usado para el ejemplo 2.

N.º	Paso	tiempo [min]	T [°C]	vacío [mbar]
1	Carga	3	-45	
2	Congelación	180	-45	
3	Secado principal	15	-45	1 50E-01
4	Secado principal	300	-20	1 50E-01
5	Secado principal	480	0	1 50E-01
6	Secado principal	360	20	1 50E-01
7	Secado principal	60	20	1 50E-01

8	Después del secado	15	2	5 00E-03
9	Después del secado	180	20	5 00E-03
10	Después del secado	120	25	5 00E-03
11	Después del secado	240	25	5 00E-03
12	pre-aireación	1	25	8 00E+02
13	Sellado	5	25	8 00E+02
14	Aireación con N ₂	1	25	1 00E+03
15	Almacenamiento	3	5	1 00E+03

5 Procedimiento de resolubilización: Para los ensayos clínicos, la formulación descrita anteriormente se disuelve en 700 µl de hidrogenocarbonato de sodio (4,2 %). Quite la tapa de plástico de uno de los viales. Desembale y saque el hidrogenocarbonato de sodio (4,2%) del refrigerador al menos 30 minutos antes de la resolubilización, para que su alcance la temperatura ambiente antes de la inyección. Prepare la jeringuilla y la aguja para la reconstitución. Utilice una técnica aséptica para tomar 700 µL de diluyente para la reconstrucción del liofilizado. Para disolver el liofilizado, el vial y diluyente se deben agitar con energía durante 1 minuto. Compruebe que la solución se ha aclarado; en caso contrario, agítela durante un minuto más, hasta que se haya aclarado. De 10 a 30 minutos después de la inyección de GM-CSF, utilice una nueva jeringuilla para administrar 500 µL de formulación reconstituida i.d. al mismo tiempo. La administración debe hacerse en durante la hora siguiente después de la reconstitución. El liofilizado disuelto puede almacenarse asépticamente a temperatura ambiente durante una hora después de la reconstitución.

10 La prueba de estabilidad tras la reconstitución mostró que la mayoría de los péptidos se mantienen suficientemente estables tras la reconstitución. Sin embargo, una tuvo lugar una disminución de dos péptidos específicos: IMA-CCN-001 y IMA-RGS-001. (véase la tabla 6). Debido a que estos péptidos contienen un residuo de cisteína, tiene lugar una dimerización dependiente del tiempo.

15 **Tabla 6: Resultados del ensayo HPLC para la estabilidad en uso tras reconstitución con solución de hidrogenocarbonato de sodio al 4,2 %. Comparación de la formulación con y sin excipientes.**

Péptido	Formulación	Inicial*	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
ADF-001	sin excipientes	100.0	102.4	102.4	100.0	n.d.	n.d.	n.d.
	manitol/Lutrol®	100.0	99.6	99.6	100.7	100.8	99.9	101.8
ADF-002	sin excipientes	100.0	100.9	100.0	97.2	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.9	100.0	101.1	101.2	99.9	101.9
APO-001	sin excipientes	100.0	100.0	97.4	97.4	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.8	99.8	100.7	100.9	99.6	101.5
CCN-001	sin excipientes	100.0	82.8	72.1	63.3	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	95.6	92.2	91.3	89.2	86.1	85.9
GUC-001	sin excipientes	100.0	100.0	100.0	98.6	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.7	99.5	100.6	100.8	99.7	101.6
K67-001	sin excipientes	100.0	100.8	99.2	97.5	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.8	100.4	101.6	101.8	100.6	102.5
MET-001	sin excipientes	100.0	100.0	99.2	96.7	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.8	99.8	101.0	101.1	99.8	101.7
MMP-001	sin excipientes	100.0	98.6	97.1	95.7	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.5	99.3	100.2	100.4	98.9	100.9

MUC-001	sin excipientes	100.0	100.8	99.2	96.6	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.8	99.6	100.6	100.6	99.5	101.3
RGS-001	sin excipientes	100.0	90.9	77.8	64.6	n.d.	n.d.	n.d.
	+ manitol/Lutrol®	100.0	97.9	95.5	94.2	91.6	88.0	86.8

* Valor inicial establecido al 100 %. Primera serie de HPLC tras la resolubilización.

5 En un modelo de ratón se evaluó la influencia de distintos valores de pH (alrededor de pH 8,5) y de un amortiguador de carbonato de alta capacidad en el éxito de las inmunizaciones peptídicas. Utilizando un péptido modelo inmunógeno estándar en distintas soluciones de inyección, se evaluó la eficiencia sensibilizadora mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Los resultados fueron confirmados por análisis de citometría de flujo tras la coloración de los tetrámeros. En resumen, no se detectó ninguna diferencia significativa en la eficiencia sensibilizadores entre las inmunizaciones intradérmicas a con un pH de 7,5, 8,5 (pH del diluyente IMA901) y pH 9,5.

10 Adicionalmente, la alta fuerza iónica no redujo la respuesta inmune observada en comparación con el amortiguador de inyección isotónico. No se observaron efectos secundarios tóxicos en inmunizaciones con soluciones de inyección con pH de 7,5, 8,5, y con el diluyente IMA901, pero se hicieron evidentes con la solución de inyección con pH de 9,5 (lesiones necróticas locales de la piel en el sitio de inyección). Estos resultados apoyan el hecho de que el amortiguador elegido es apropiado como diluyente para IMA901.

Ejemplo 3:

15 Se prepararon soluciones madre de cada péptido individual por disolución de los péptidos en los solventes adecuados, conforme a características de solubilización (véase la tabla 7).

Tabla 7: péptidos utilizados para el ejemplo 3.

N.º de péptido:	Péptido	Pureza del péptido (%)	Cantidad [mg]	Solvente [ml]
23	IMA-CHI-001	99,7	23,19	11 560 (90%HAc)
15	IMA-FABP7-001	92,0	25,13	4 624 (90%HAc)
17	IMA-MET-005	93,1	24,83	3 853 (50%HAc)
18	IMA-NLGN4X-001	90,3	25,60	5 780 (50%HAc)
22	IMA-TNC-001	94,0	24,60	5 780 (30%HAc)
20	IMA-PTP-003	96,3	24,01	2 890 (20%HAc)
12	IMA-BCA-002	97,7	23,66	3 303 (10%HAc)
13	IMA-BIR-002	96,0	24,08	2 312 (10%HAc)
14	IMA-CSP-001	98,1	23,57	5 780 (10%HAc)
16	IMA-IGF2BP3-001	94,6	24,44	2 890 (10%HAc)
19	IMA-NRCAM-001	96,0	24,08	2 312 (10%HAc)
21	IMA-PTP-005	97,0	23,84	2 312 (10%HAc)
11	IMA-HBV-001	99,0	23,35	4 624 (WFI)
-/-	Volumen de aclarado	-/-	-/-	1 800 (30%HAc)
-/-	Volumen de llenado	-/-	-/-	0 180 (WFI)

20 Debido a las distintas solubilidades de los péptidos, deben ser disueltos conforme al orden proporcionado en la tabla 4, comenzando con el péptido 1. Se usaron distintas cantidades y concentraciones de solución de ácido acético y agua

para la inyección (WFI) para disolver los péptidos, debido a diferencias en la solubilidad de los péptidos y con respecto al volumen final de relleno de la solución madre. Para mejorar la solubilidad, cada vial se trató por agitación vigorosa durante un máximo de cinco minutos y, en caso necesario, por sonicación, durante un máximo de cinco minutos. Las cantidades y concentraciones que se deben usar también se muestran en la tabla 7.

5 Una vez que los péptidos se han disuelto sin problemas, las soluciones deben mezclarse en el orden dado en la tabla 7, comenzando con el péptido número 1. Las soluciones se reúnen en un contenedor de vidrio equipado con una varilla agitadora. Finalmente, esta solución se añade a la mezcla de la solución peptídica y se remueve durante, al menos, cinco minutos.

10 Se añadieron 601,1 mg de poloxámero 188 (Lutrol® F68) y 1.502,8 mg de manitol a la mezcla peptídica y se removió toda la solución durante cinco minutos.

15 La solución madre con los 13 péptidos y los excipientes se filtró por un filtro estéril con un tamaño de los poros de 0,22 µm. 1.500 ml de solución fueron vertidos en viales de vidrio 2R, pre-sellados y transportados al liofilizador para su liofilización. El proceso de liofilización (véase la tabla 7) incluye la congelación de los viales a una temperatura de -45 °C, un aumento escalonado de la temperatura a +20 °C (fase principal de secado) y un paso final de secado a +25 °C. Cuando el ensayo se completó, el liofilizador se devolvió a la presión atmosférica utilizando nitrógeno.

Tabla 8: parámetros de liofilización usados para el ejemplo 3.

N.º	Paso	tiempo [min]	T [°C]	vacío [mbar]
1	Carga	5	-45	
2	secado primario	10	-45	0 50E-01
3	secado primario	360	-20	0 50E-01
4	secado primario	480	0	0 50E-01
5	secado primario	360	20	0 50E-01
6	secado primario	60	20	0 50E-01
7	secado secundario	15	20	5 00E-03
8	secado secundario	180	20	5 00E-03
9	secado secundario	120	25	5 00E-03
10	secado secundario	240	25	5 00E-03
11	Aireación con N ₂	1	25	1 00E+03
12	Sellado	5	25	1 00E+03

Procedimiento de resolubilización:

20 Para los ensayos clínicos, la formulación descrita anteriormente se disuelve en 700 µl de hidrogenocarbonato de sodio (4,2 %). Para disolver el liofilizado, el vial y diluyente se deben agitar con energía durante 1 minuto. Compruebe que la solución se ha aclarado; en caso contrario, agítela durante un minuto más, hasta que se haya aclarado. La administración de 500 µL de la solución debe realizarse durante la hora siguiente después de la reconstitución. El liofilizado disuelto puede almacenarse asépticamente a temperatura ambiente durante una hora después de la reconstitución.

25 La prueba de estabilidad tras la reconstitución mostró que la mayoría de los péptidos se mantenían suficientemente estables tras la reconstitución (véase la tabla 9).

Tabla 9: Resultados del ensayo HPLC para la estabilidad en uso tras reconstitución con solución de hidrogenocarbonato de sodio al 4,2 %. Comparación de la formulación con y sin excipientes.

Péptido		Inicial*	2h	4h	6h
		Péptido [%]	Péptido [%]	Péptido [%]	Péptido [%]
NRCAM-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.9	100.0	99.5
	sin excipientes	100.0	99.8	100.2	95.6
BIR-002	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.8	101.2	100.9
	sin excipientes	100.0	100.6	101.4	96.2
CSP-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.0	100.1	99.6
	sin excipientes	100.0	99.2	99.7	95.0
PTP-003	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.3	100.5	100.1
	sin excipientes	100.0	100.4	100.9	96.1
IGF2BP3-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.4	100.6	100.7
	no excipients	100.0	100.0	101.2	96.0
PTP-005	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.1	100.3	99.8
	no excipients	100.0	99.9	100.4	95.8
TNC-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.5	100.6	100.2
	sin excipientes	100.0	100.0	100.4	95.7
MET-005	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.5	100.7	100.4
	sin excipientes	100.0	100.3	100.7	96.0
FABP7-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.9	100.7	100.6
	sin excipientes	100.0	100.5	100.9	96.3
NLGN4X-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.8	100.9	100.5
	sin excipientes	100.0	99.9	100.5	95.7
HBV-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.3	100.6	100.3
	sin excipientes	100.0	100.2	100.6	95.8
CHI-001	+ manitol/Lutrol®	100.0	100.0	100.7	100.2
	sin excipientes	100.0	102.2	101.3	90.6
BCA-002	+ manitol/Lutrol®	100.0	99.8	99.6	98.9
	sin excipientes	100.0	99.9	100.1	95.4

Ejemplo 4:

Se prepararon soluciones madre de cada péptido individual por disolución de los péptidos en los solventes adecuados, conforme a características de solubilización (véase la tabla 9).

Tabla 10: Péptidos utilizados para el ejemplo 4

ID de SEQ del péptido N.º	Péptido	Pureza del péptido (%)	Cantidad [mg]	Solvente [ml]
23	IMA-FABP7-001	92.0	28.27	4.335 (90%HAc)
15	IMA-MET-005	94.0	27.67	4.335 (50%HAc)
17	IMA-NLGN4X-001	91.0	28.58	6.503 (50%HAc)
18	IMA-TNC-001	94.0	27.67	3.251 (50%HAc)
22	IMA-PTP-003	97.0	26.81	3.251 (20%HAc)
20	IMA-BCA-002	98.0	26.54	3.251 (10%HAc)
12	IMA-BIR-002	96.0	27.09	3.251 (10%HAc)
13	IMA-CSP-001	91.0	28.58	5.202 (10%HAc)
14	IMA-IGF2BP3-001	95.0	27.38	5.202 (10%HAc)
16	IMA-NRCAM-001	96.0	26.54	3.251 (10%HAc)
19	IMA-PTP-005	97.0	26.81	3.251 (10%HAc)
21	IMA-HBV-001	99.0	26.27	5.202 (WFI)
-/-	Volumen de aclarado	-/-	-/-	3.375 (30%HAc)
-/-	Volumen de llenado	-/-	-/-	13.839 (WFI)

5 Debido a las distintas solubilidades de los péptidos, deben ser disueltos conforme al orden proporcionado en la tabla 4, comenzando con el péptido 1. Se usaron distintas cantidades y concentraciones de solución de ácido acético y agua para la inyección (WFI) para disolver los péptidos, debido a diferencias en la solubilidad de los péptidos y con respecto al volumen final de relleno de la solución madre. Para mejorar la solubilidad, cada vial se trató por agitación vigorosa durante un máximo de cinco minutos y, en caso necesario, por sonicación, durante un máximo de cinco minutos. Las cantidades y concentraciones que se deben usar también se muestran en la tabla 10.

10 Una vez que los péptidos se han disuelto sin problemas, las soluciones deben mezclarse en el orden dado en la tabla 10, comenzando con el péptido con SEQ ID N.º 23. Las soluciones se reúnen en un contenedor de vidrio equipado con una varilla agitadora. Finalmente, esta solución se añade a la mezcla de la solución peptídica y se remueve durante, al menos, cinco minutos.

Se añadieron 624,2 mg de poloxámero 188 (Lutrol® F68) y 1.560,6 mg de manitol a la mezcla peptídica y se removió toda la solución durante cinco minutos.

15 La solución madre con los 12 péptidos y los excipientes se filtró por un filtro estéril con un tamaño de los poros de 0,22 µm. 1.500 ml de solución fueron vertidos en viales de vidrio 2R, pre-sellados y transportados al liofilizador para su liofilización. El proceso de liofilización (véase la tabla 11) incluye la congelación de los viales a una temperatura de -45 °C, un aumento escalonado de la temperatura a +20 °C (fase principal de secado) y un paso final de secado a +25 °C. Cuando el ensayo se completó, el liofilizador se devolvió a la presión atmosférica utilizando nitrógeno.

ES 2 374 138 T3

Tabla 11: parámetro de liofilización usado para el ejemplo 4.

N.º	Paso	tiempo [min]	T [°C]	vacío [mbar]
1	Carga	5	-45	
2	secado primario	10	-45	0 50E-01
3	secado primario	360	-20	0 50E-01
4	secado primario	480	0	0 50E-01
5	secado primario	360	20	0 50E-01
6	secado primario	60	20	0 50E-01
7	secado secundario	15	20	5 00E-03
8	secado secundario	180	20	5 00E-03
9	secado secundario	120	25	5 00E-03
10	secado secundario	240	25	5 00E-03
11	Aireación con N ₂	1	25	1 00E+03
12	Sellado	5	25	1 00E+03

La evaluación de estabilidad a distintas temperaturas mostró que todos los péptidos son suficientemente estables, incluso en condiciones de tensión (+25 °C) (véase la tabla 12).

Tabla 12: Resultados del ensayo HPLC para la estabilidad de los péptidos en la formulación a +25 °C +/- 2 °C durante 3 meses

Péptido	INICIAL [%]	1M [% del inicial]	2M [% del inicial]	3M [% del inicial]
NRCAM-001	100.0	97.90	96.73	97.59
BIR-002	100.0	97.49	96.24	98.93
CSP-001	100.0	98.04	96.99	98.71
PTP-003	100.0	98.29	97.11	98.29
IGF2BP3-001	100.0	98.01	96.77	97.34
PTP-005	100.0	98.16	97.10	98.30
TNC-001	100.0	97.86	96.80	97.21
MET-005	100.0	97.49	96.13	97.21
FABP7-001	100.0	98.43	97.71	98.67
NLGN4X-001	100.0	97.90	96.30	96.41
HBV-001	100.0	97.83	96.47	97.50
BCA-002	100.0	98.20	97.05	97.88

Tabla 13: Resultados del ensayo HPLC para la estabilidad de los péptidos en la formulación a +5°C +/- 3°C durante 3 meses

Péptido	INICIAL [%]	1M [% del inicial]	2M [% del inicial]	3M [% del inicial]
NRCAM-001	100.0	99.13	98.17	98.79
BIR-002	100.0	98.53	97.28	100.01
CSP-001	100.0	98.99	98.05	99.81
PTP-003	100.0	99.07	97.95	98.68
IGF2BP3-001	100.0	99.00	97.92	98.57
PTP-005	100.0	98.93	97.79	98.67
TNC-001	100.0	99.02	98.10	98.72
MET-005	100.0	99.06	97.92	98.59
FABP7-001	100.0	99.08	98.15	98.66
NLGN4X-001	100.0	99.12	98.24	98.84
HBV-001	100.0	98.87	97.76	98.47
BCA-002	100.0	99.13	98.04	98.73

Tabla 14: Resultados del ensayo HPLC para la estabilidad de los péptidos en la formulación a -20°C +/- 5°C durante 3 meses

Péptido	INICIAL [%]	1M [% del inicial]	2M [% del inicial]	3M [% del inicial]
NRCAM-001	100.0	99.23	97.86	98.91
BIR-002	100.0	98.43	96.98	100.14
CSP-001	100.0	98.99	97.61	99.61
PTP-003	100.0	99.11	97.48	98.57
IGF2BP3-001	100.0	99.10	97.54	98.42
PTP-005	100.0	98.99	97.41	98.34
TNC-001	100.0	99.01	97.61	98.57
MET-005	100.0	99.14	97.54	99.00
FABP7-001	100.0	99.09	97.60	98.39
NLGN4X-001	100.0	99.05	97.60	98.62
HBV-001	100.0	98.93	97.39	98.34
BCA-002	100.0	99.17	97.61	98.61

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende:
entre 2 y 18 péptidos asociados a tumor;
en donde cada péptido tiene una longitud de entre 8 y 22 aminoácidos;
en donde dichos péptidos muestran una solubilidad de al menos 2,7 mg/mL en ácido acético al 90%;
- 5 manitol y poloxámero 188, en donde la tasa por peso de dicho(s) péptido(s):manitol:poloxámero 188 se encuentra en el rango, incluyendo y entre, 1:5:1,5 a 1:8:2,2; o
manitol y Tween[®] 80, en donde la tasa por peso de péptidos:manitol:Tween[®] 80 se encuentra en el rango, incluyendo y entre, 1:2:1,5 a 1:8:2,2.
- 10 2. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación 1, en donde el mencionado ratio por peso de péptidos:manitol:poloxámero 188 se encuentra en un rango de entre 1:0:2 y 1:0:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 15 3. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación n.º 1, y comprende al menos dos péptidos, en donde dichos péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias SEQ ID N.º: 1 a SEQ ID N.º 10, o las secuencias SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 23; en el caso de que la composición comprenda al menos un péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 12 o SEQ ID N.º: 13 o una sal de éstas; y, además, comprende manitol y poloxámero 188, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:poloxámero 188 se encuentra en un rango entre 1:5:1,5 y 1:8:2,2, incluyendo los valores extremos.
- 20 4. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación 3, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:poloxámero 188 se encuentra en un rango de entre 1:0:2 y 1:0:2,2, incluyendo los valores extremos.
5. La composición farmacéutica conforme a la reivindicación n.º 1, y comprende al menos dos péptidos, en donde dichos péptidos comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias SEQ ID N.º: 1 a SEQ ID N.º 10, o las secuencias SEQ ID N.º 12 a SEQ ID N.º 23; en el caso de que la composición comprenda al menos un péptido que comprenda las secuencias SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 12 o SEQ ID N.º: 13 o una sal de éstas, que comprende, además, manitol y Tween[®] 80, en donde el ratio por peso de péptidos:manitol:Tween[®] 80 se encuentra en un rango, incluyendo entre, 1:2:1,5 y 1:8:2,2,.
- 25 6. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichos péptidos tienen una longitud total de entre 9 y 16 aminoácidos.
7. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos uno de los mencionados péptidos incluye enlaces no peptídicos.
- 30 8. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la mencionada composición comprende péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secuencias SEQ ID N.º 1 y/o la secuencia SEQ ID N.º 2 y, además, comprende al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias SEQ ID N.º: 3 a SEQ ID N.º 10.
- 35 9. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la mencionada composición comprende péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos expuestas en las secuencias SEQ ID N.º 12 y/o la secuencia SEQ ID N.º 13 y, además, comprende al menos un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las secuencias SEQ ID N.º: 14 a SEQ ID N.º 23.
10. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la secuencia SEQ ID N.º 11, siempre que dicho péptido no sea el correspondiente polipéptido completo asociado a tumor.
- 40 11. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde las cantidades de los péptidos presentes en la composición son específicos de tejido, cáncer y/o paciente.
12. La composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que además comprende, al menos, un adyuvante adecuado.
- 45 13. El uso de la composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 como vacuna contra el cáncer.
14. Un kit que comprende:
(a) un contenedor con una composición farmacéutica conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en forma de solución o liofilizada;

(b) opcionalmente, un segundo contenedor con un diluyente o solución reconstituyente para dicha formulación liofilizada y/o al menos un adyuvante; y

(c) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) reconstitución y/o uso de dicha formulación liofilizada.

5 15. El kit conforme a la reivindicación 14, que comprende además una unidad o más de (i) un amortiguador, (ii) un diluyente, (iii) un filtro (iv) una aguja y (v) una jeringuilla.

Figura 1: Cromatograma HPLC analítica de péptidos (secuencias SEQ ID N.º 1 - 10) que contiene beta-naftilalanina (NAL) como estándar interno.

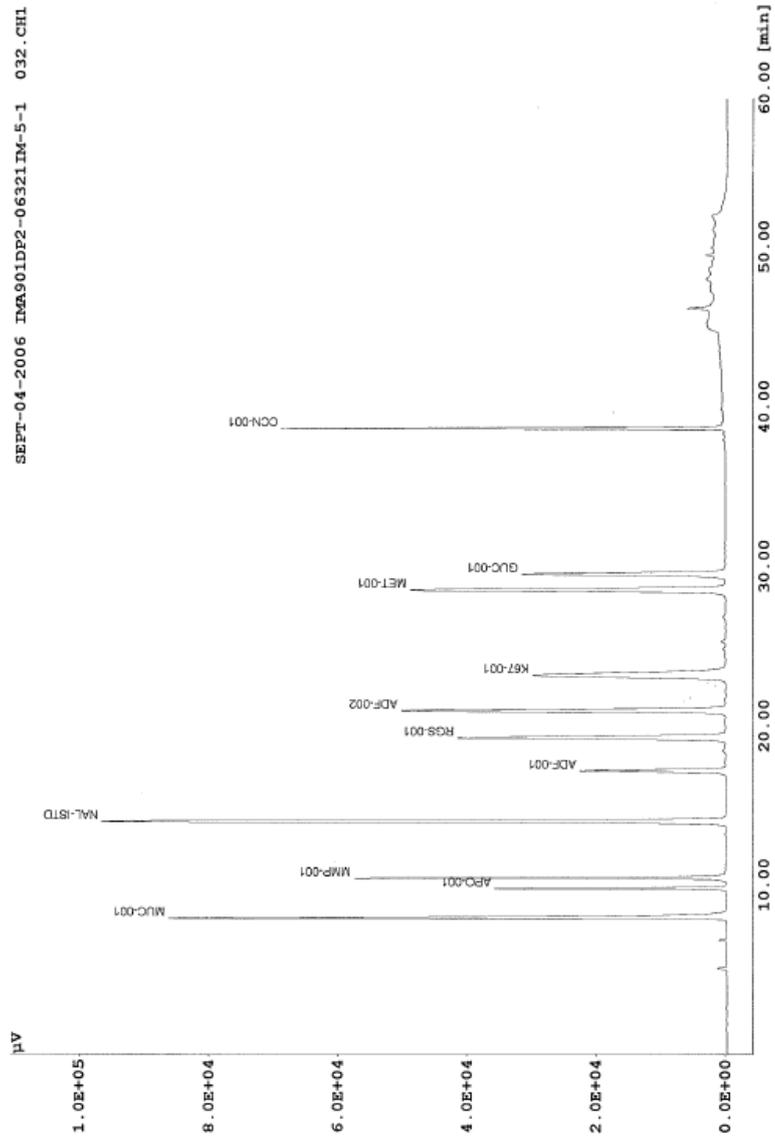


Figura 2: Estabilidad de la formulación 1 sin excipientes a +25 °C.

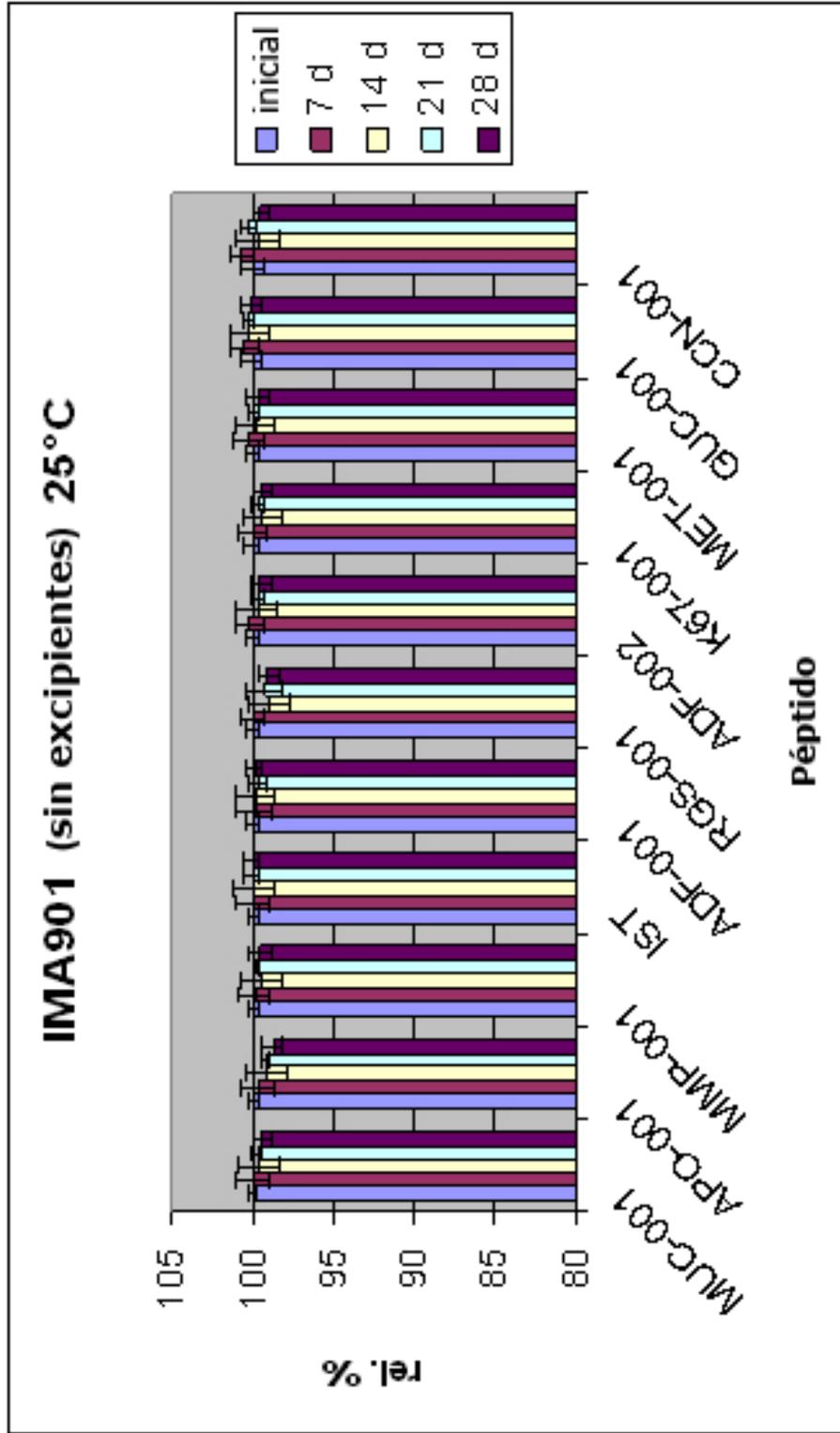


Figura 3: Estabilidad de la formulación 2 con manitol y Lutrol F68 (poloxámero 188) a +25 °C.

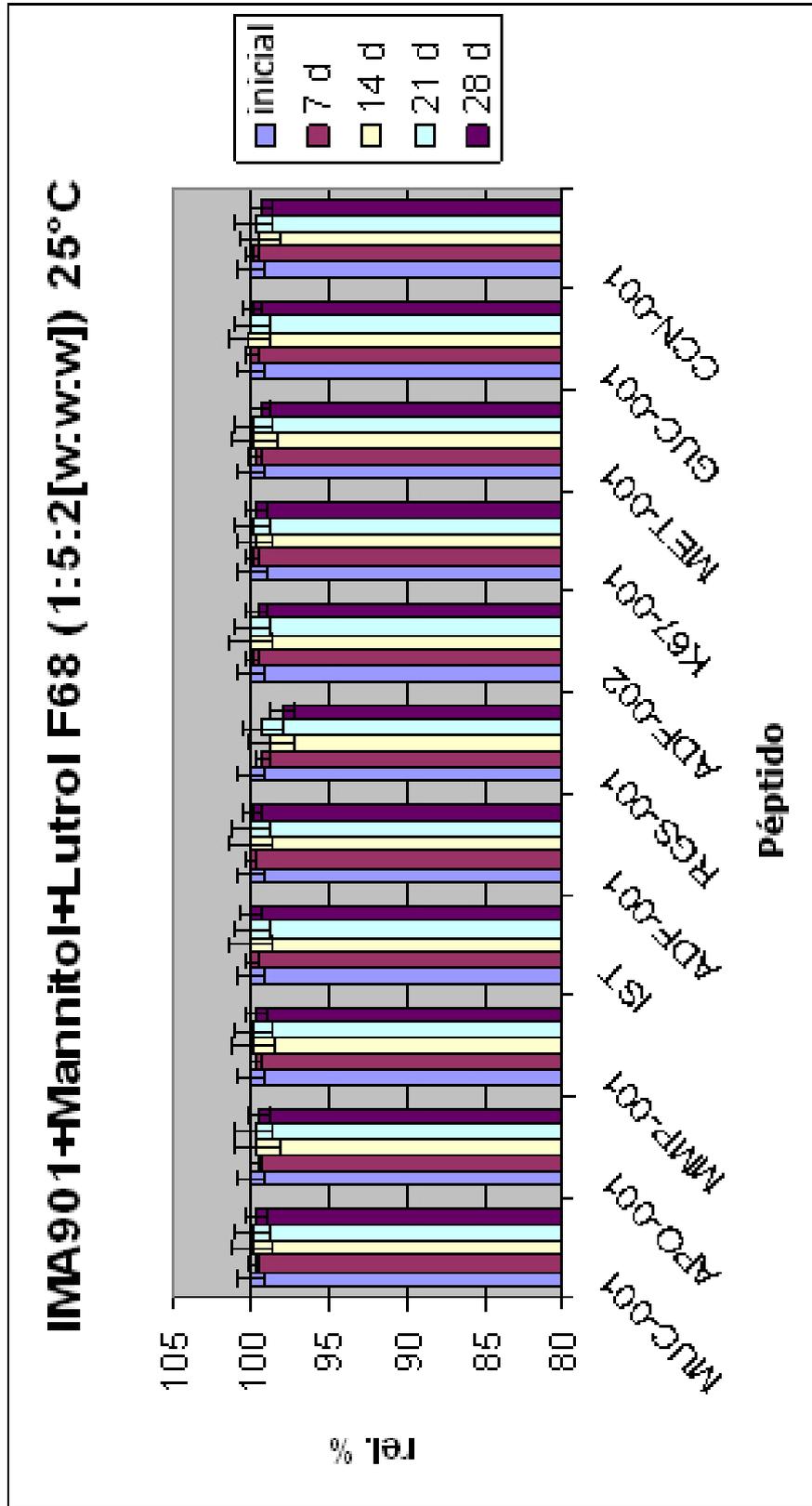


Figura 4: Estabilidad de la formulación 3 con manitol y Tween 80 a +25 °C.

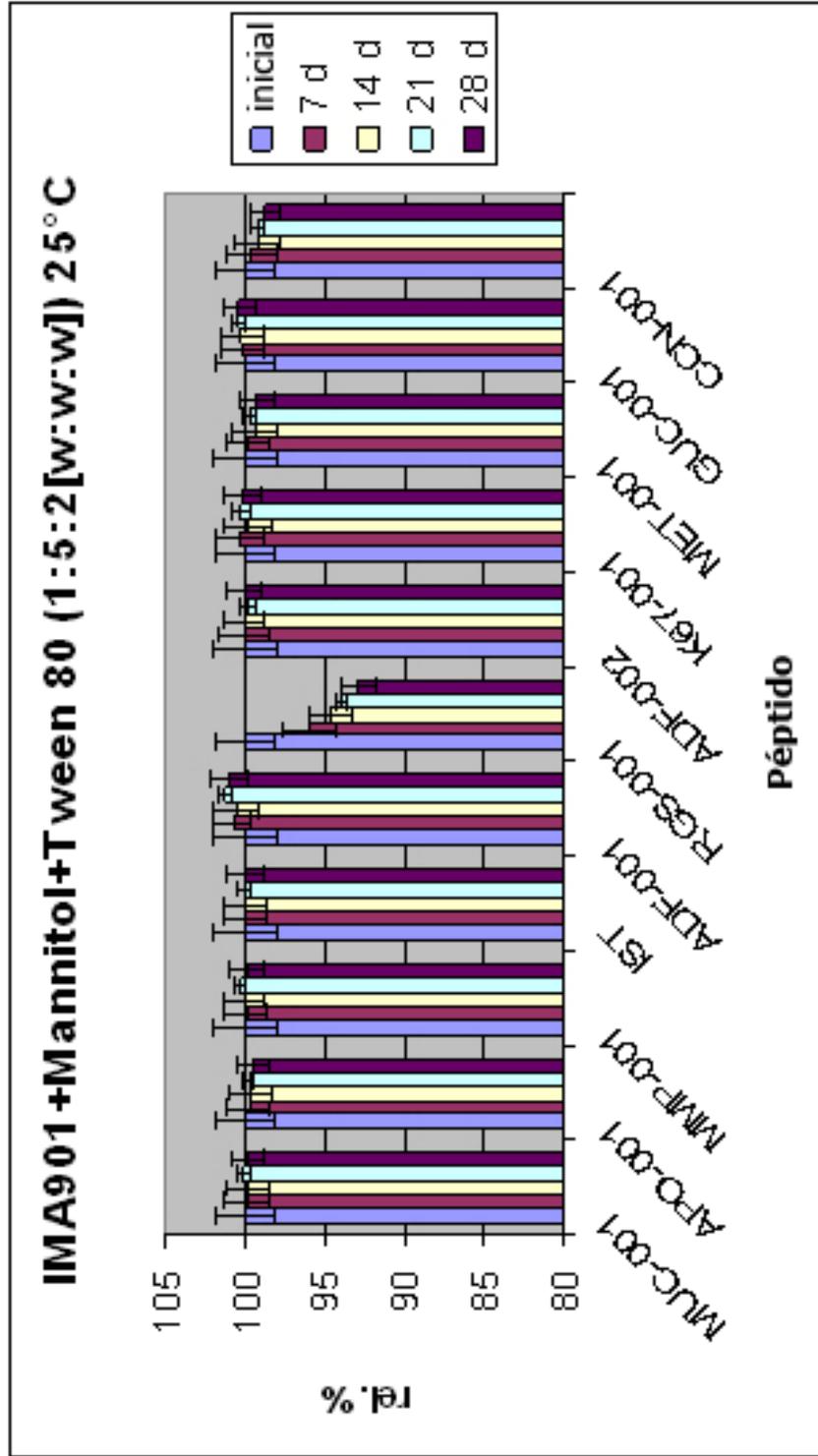


Figura 5: Estabilidad de la formulación 4 con manitol y Tween 80 a +25 °C.

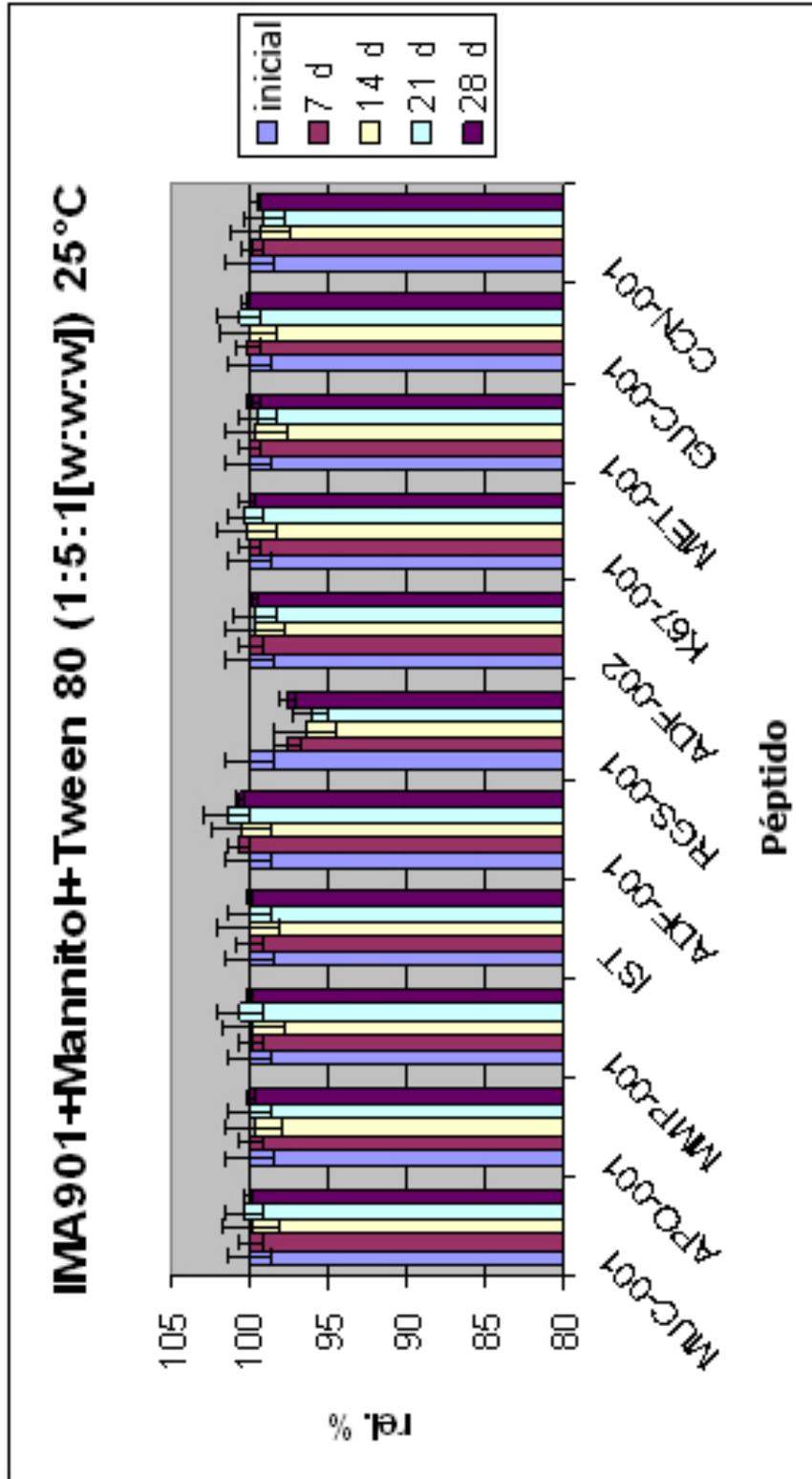


Figura 6: Estabilidad de la formulación 1 sin excipientes a +40 °C.

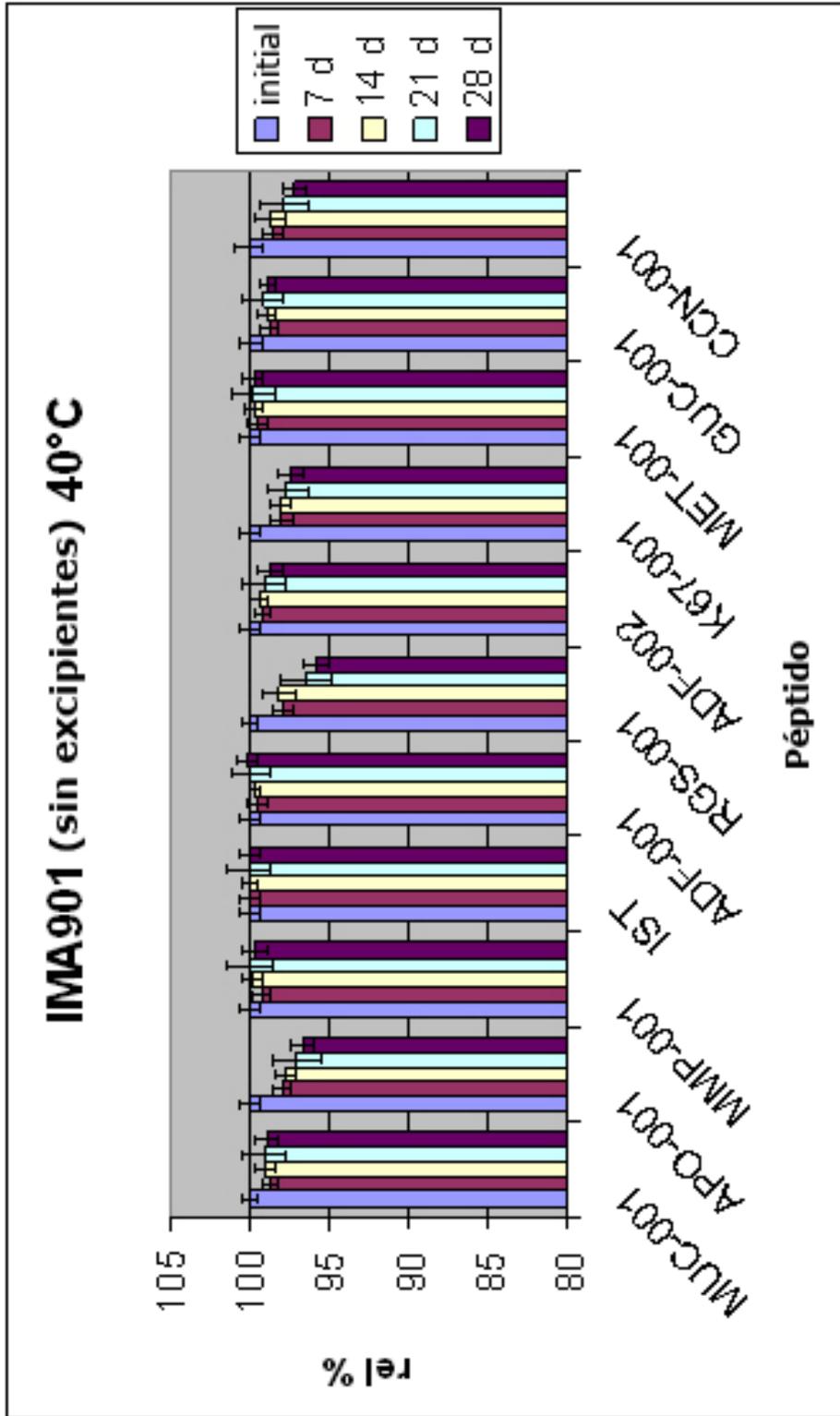


Figura 7: Estabilidad de la formulación 2 con manitol y Lutrol F68 (poloxámero 188) a +40 °C.

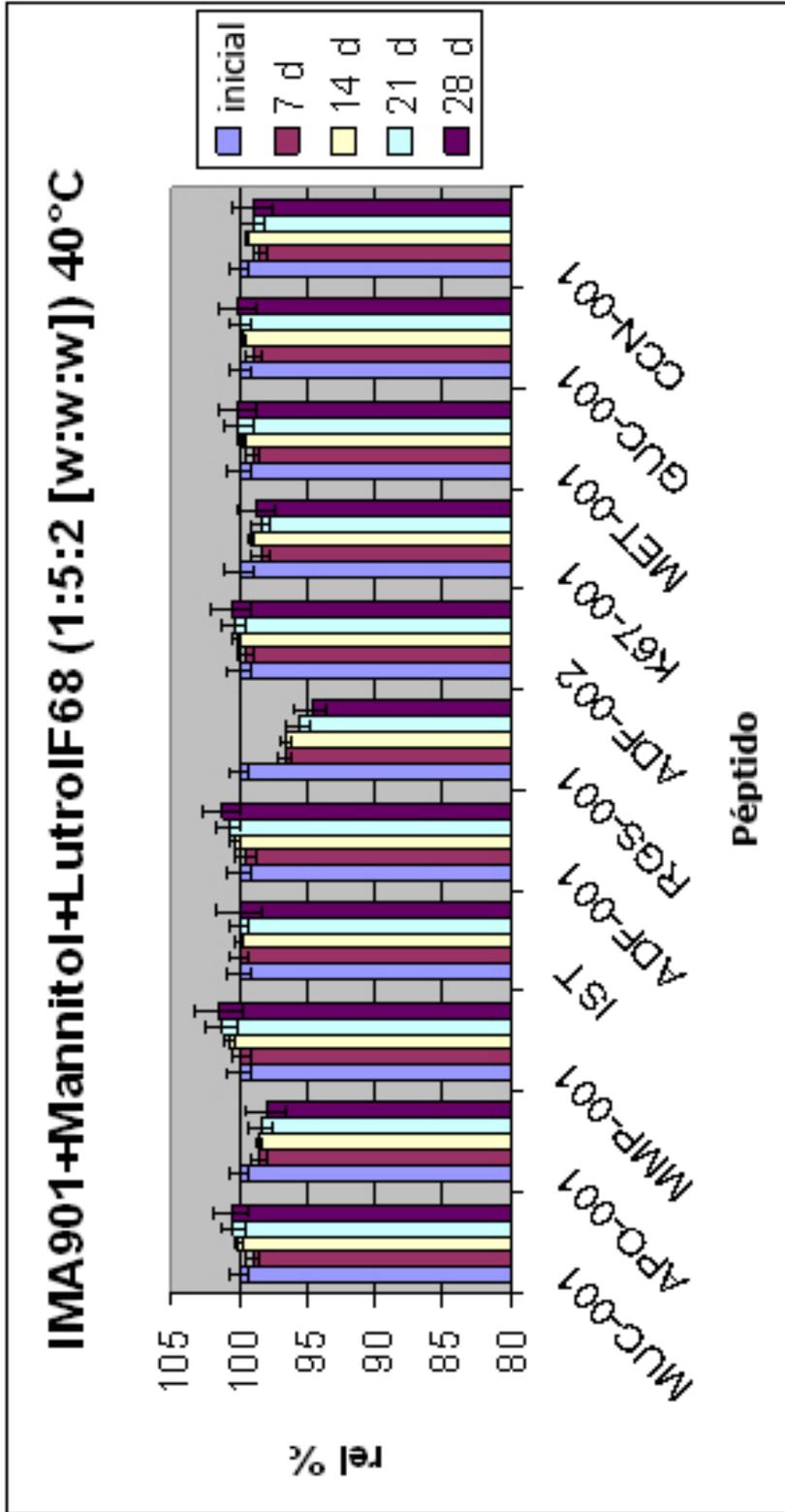


Figura 8: Estabilidad de la formulación 3 con manitol y Tween 80 a +40 °C.

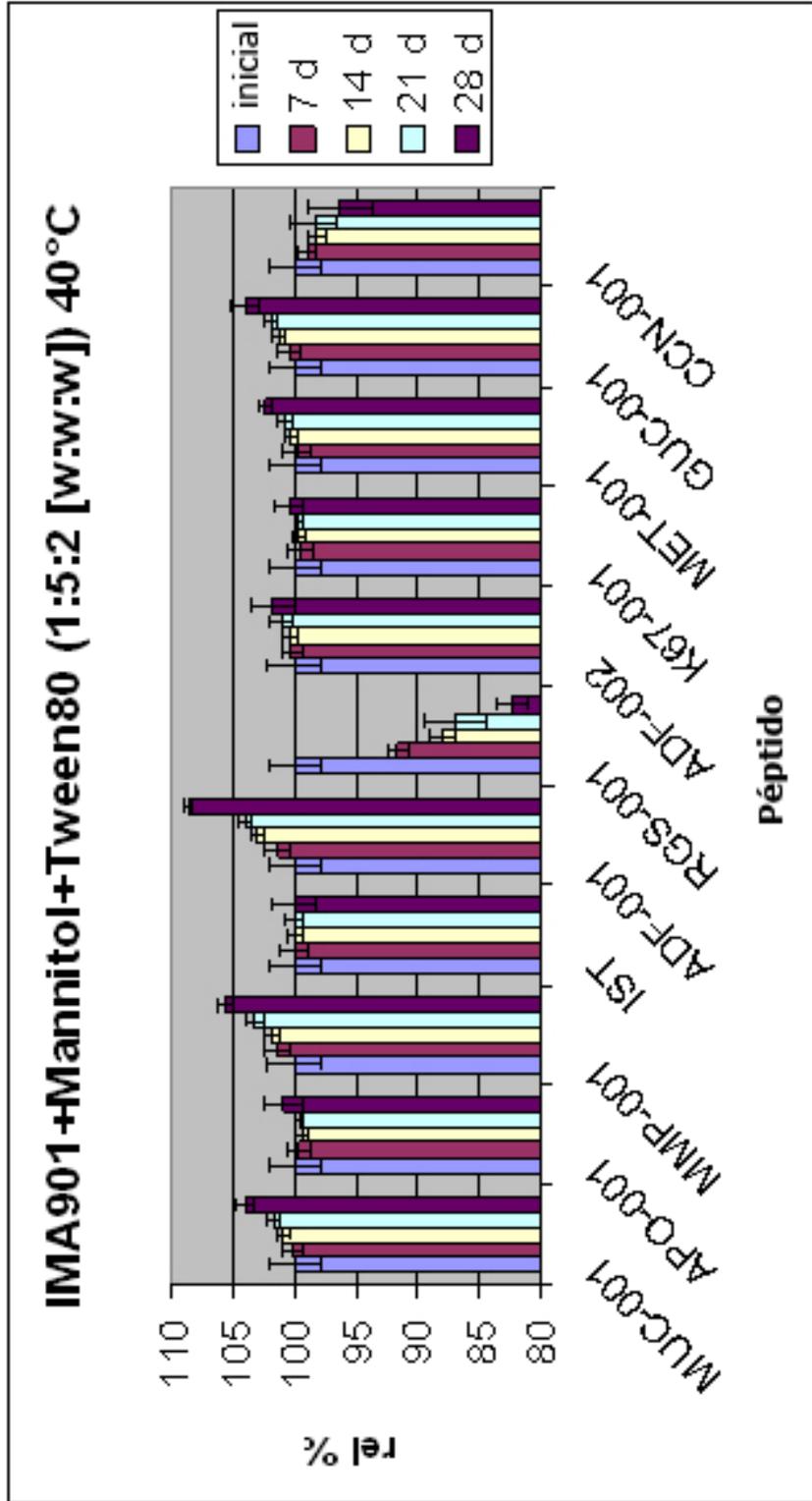


Figura 9: Estabilidad de la formulación 4 con manitol y Tween 80 a +40 °C.

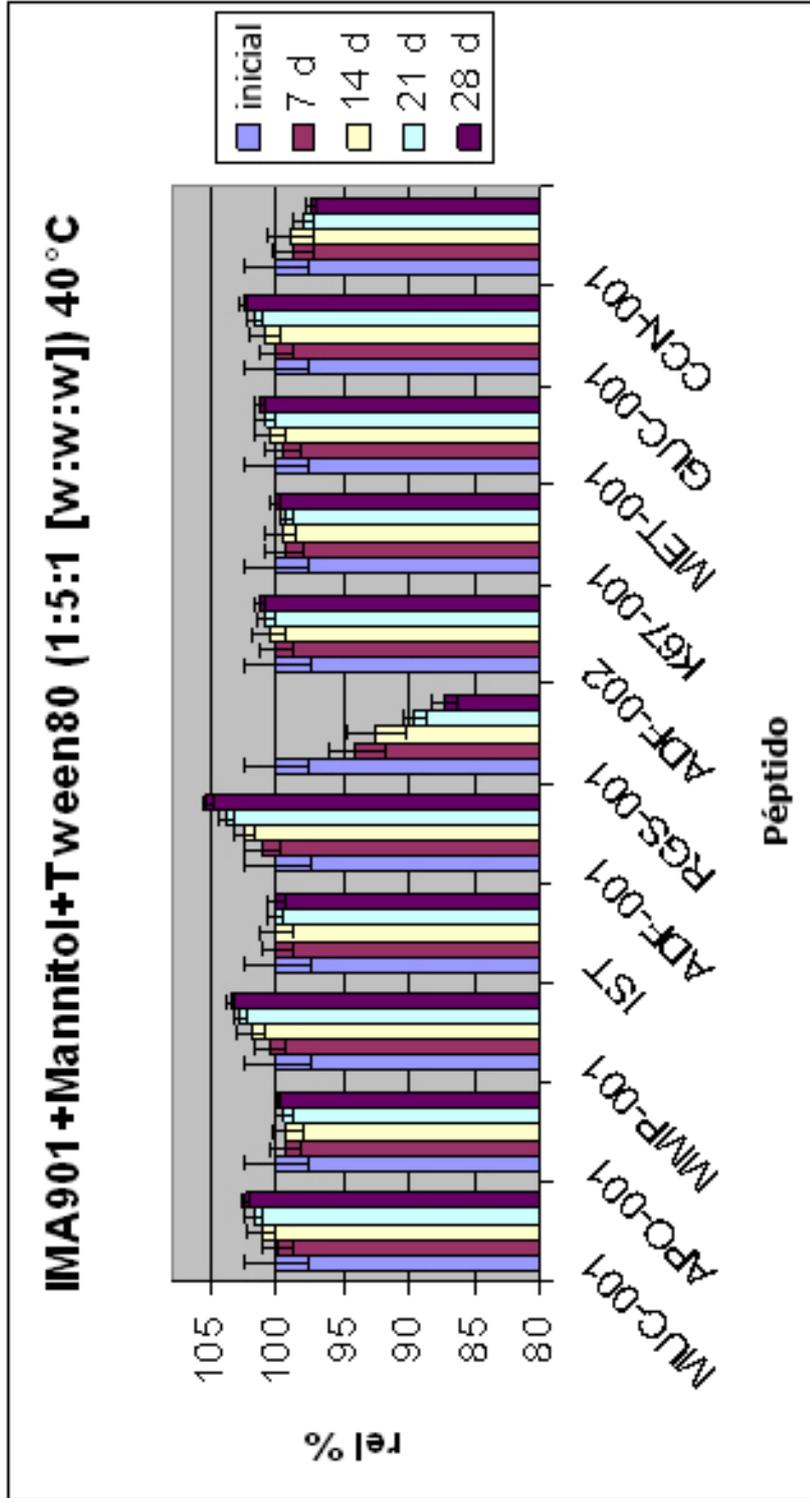


Figura 10: Influencia de los excipientes poloxámero 188 (Lutrol F68) y manitol en la sensibilización de linfocitos T CD8+ *in vivo*. Se sacrificaron ratones inmunizados 9 días después de su inmunización, se recolectaron células del bazo, se tiñeron con tetrámero y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de células positivas de tetrámeros entre todos los linfocitos T CD8+ se muestra con barras de error que muestran la desviación estándar de los promedios. Los tres grupos inmunizados mediante péptidos son significativamente distintos de los controles negativos analizados por una prueba T de Student impar de dos colas ($p < 0.05$). Los grupos con y sin Poloxámero (Lutrol F68)/manitol no difieren de forma significativa ($p = 0,49$).

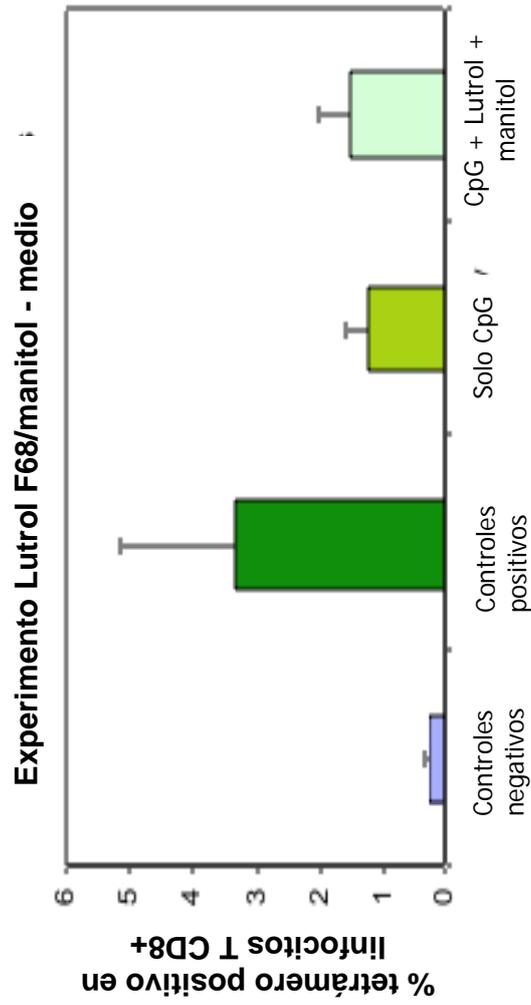


Figura 11: Proceso de fabricación ejemplo 2.

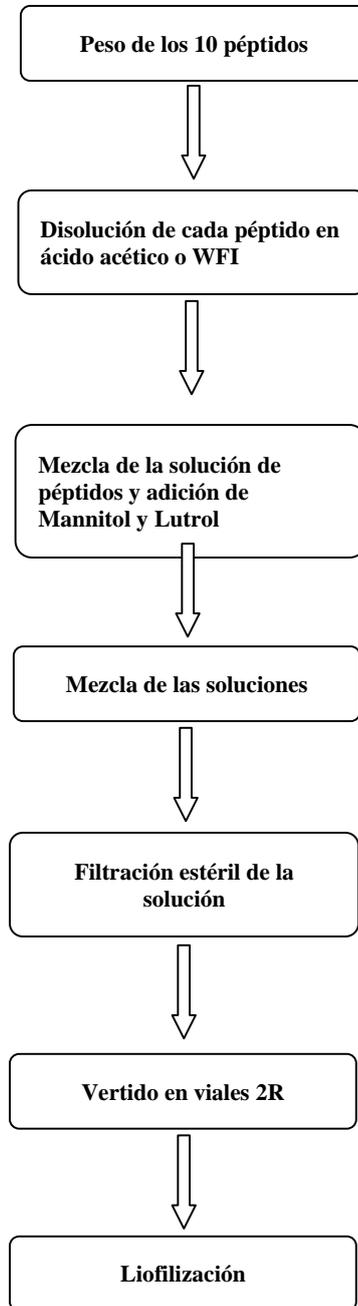


Figura 12 - Cromatograma HPLC analítica de péptidos (secuencias SEQ ID N.º 11 - 23) que contiene beta-naftilalanina (NAL) como estándar interno.

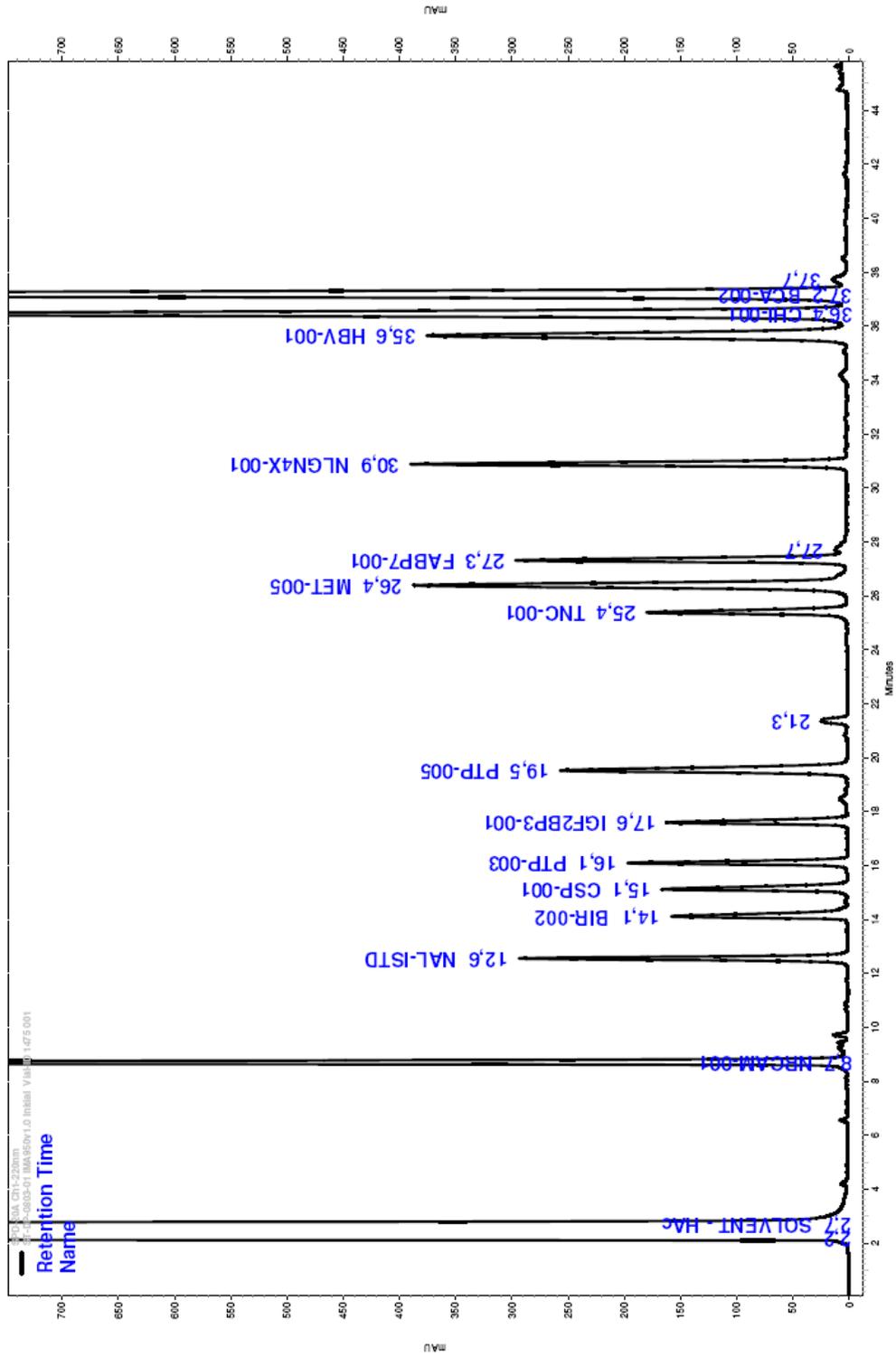


Figura 13: estabilidad «en uso» de las secuencias SEQ ID N.º 11 a 23 con manitol/Lutrol F68

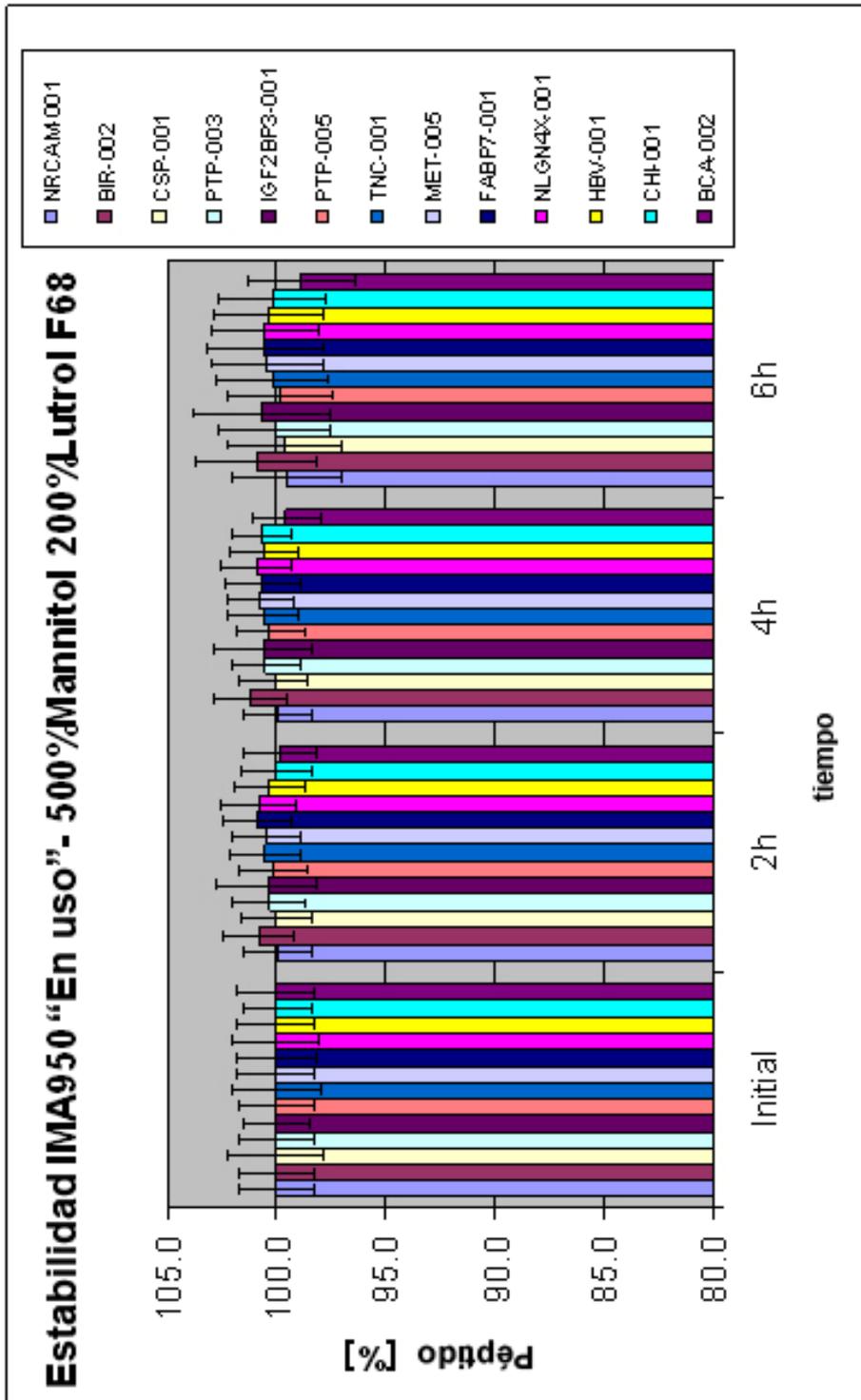


Figura 14: estabilidad «en uso» de las secuencias SEQ ID N.º 11 a 23 sin excipientes

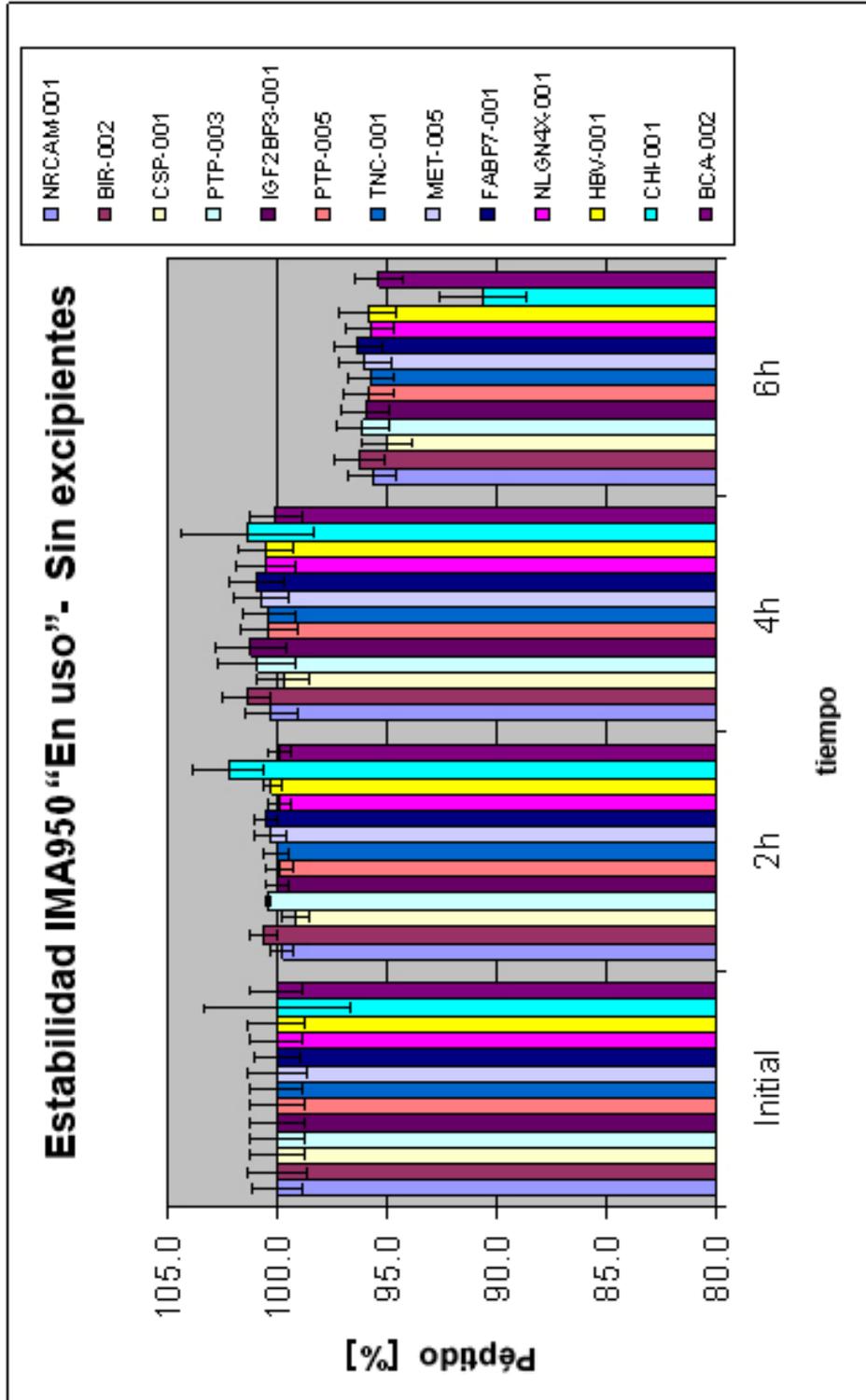


Figura 15: estabilidad de las secuencias SEQ ID N.º 11 a 22 con Manitol/Lutrol F68 a +25 °C

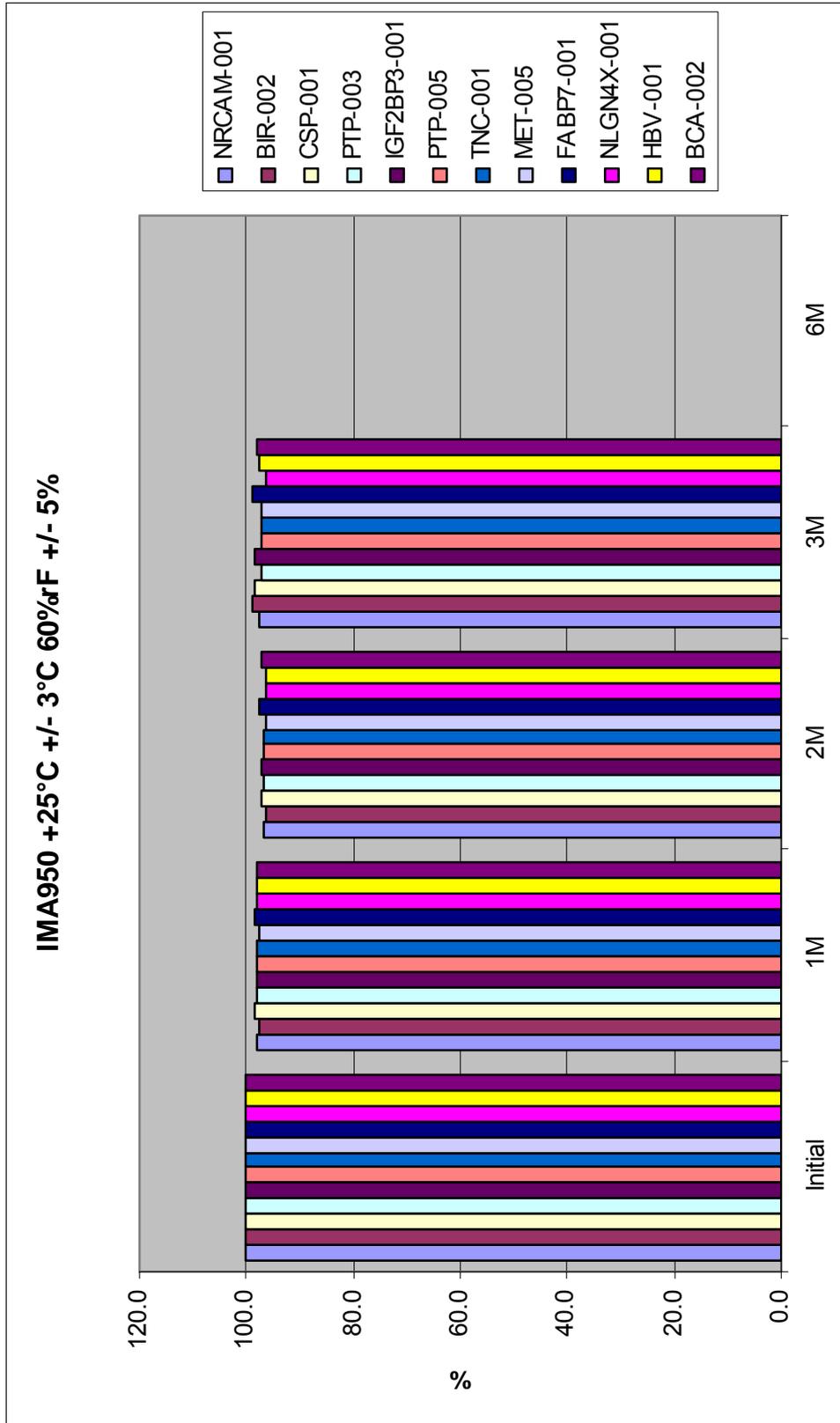


Figura 16: estabilidad de las secuencias SEQ ID N.º 11 a 22 con Manitol/Lutrol F68 a +5 °C

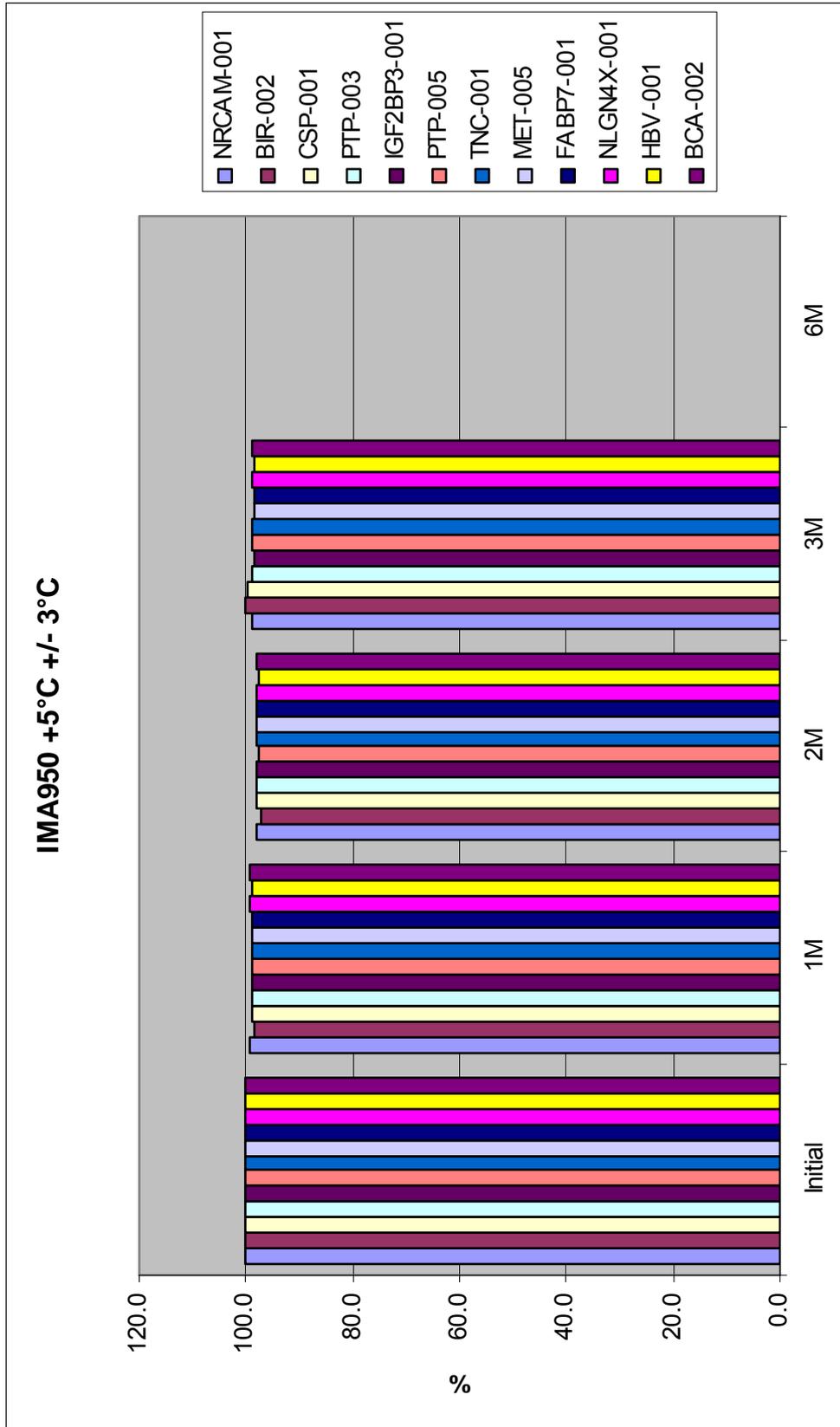


Figura 17: estabilidad de las secuencias SEQ ID N.º 11 a 22 con Manitol/Lutrol F68 a -20 °C

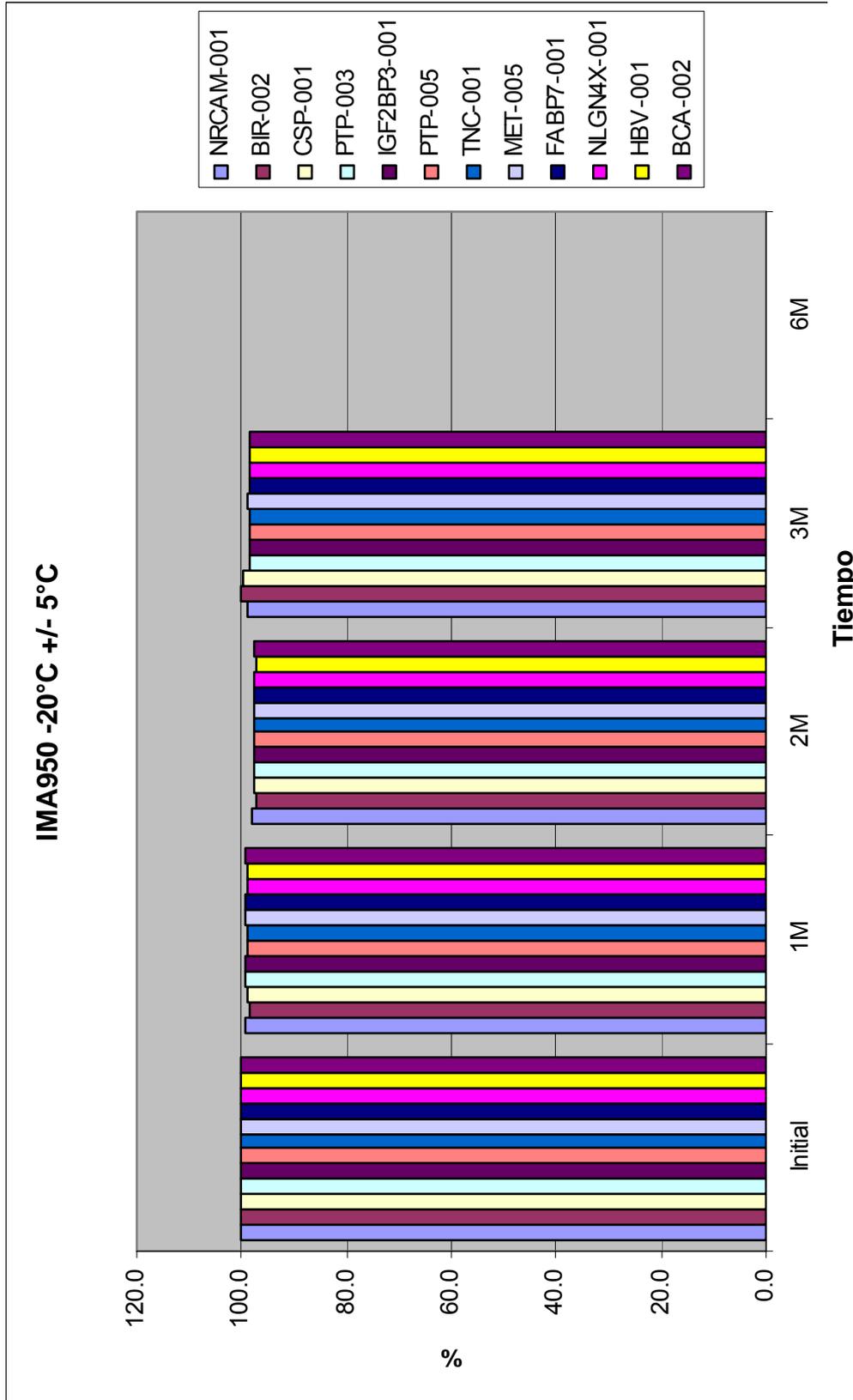


Figura 18: datos de estabilidad de 24 meses a -20 °C para la formulación descrita en el ejemplo 2.

Lote 06321IM Estabilidad -20°C

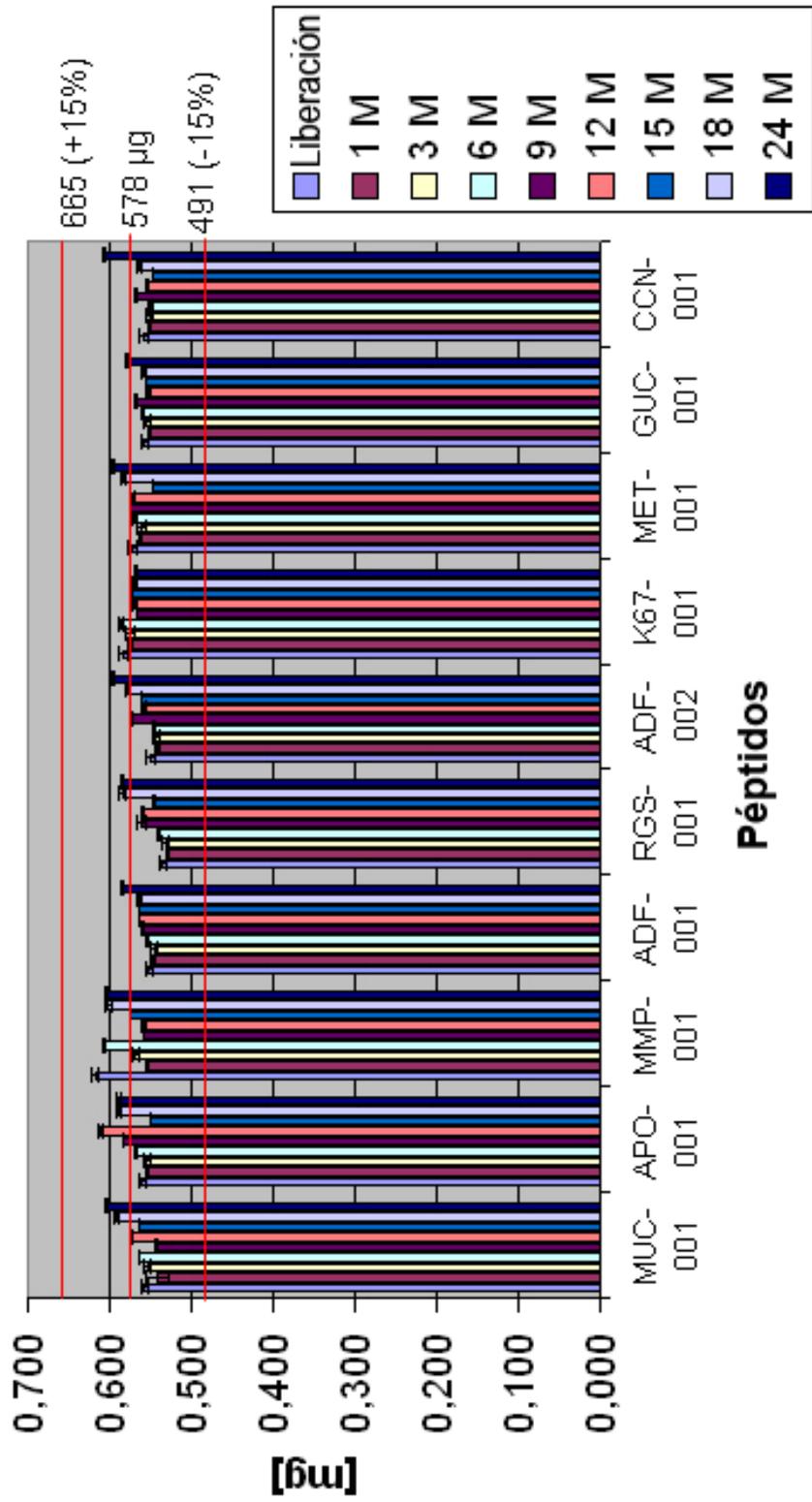


Figura 19: datos de estabilidad de 24 meses a +5 °C para la formulación descrita en el ejemplo 2.

Lote 06321IM Estabilidad +5°C

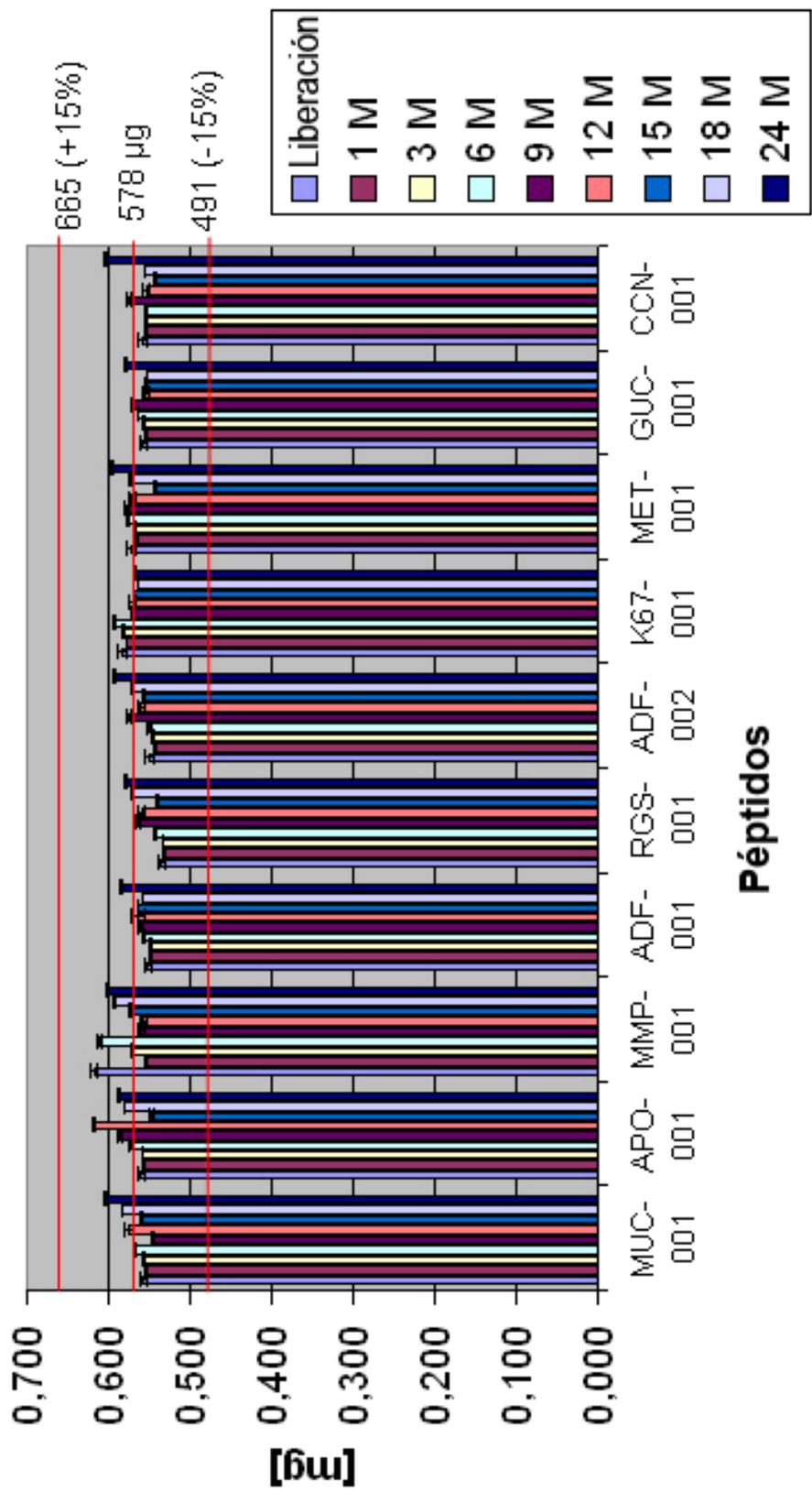


Figura 20: datos de estabilidad de 24 meses a +25 °C para la formulación descrita en el ejemplo 2.

