

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 077**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08753801 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2155780**

54 Título: **Vacuna de péptido p53**

30 Prioridad:

31.05.2007 EP 07109287

31.05.2007 US 941070 P

07.06.2007 EP 07109802

07.06.2007 US 942483 P

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

05.06.2013

73 Titular/es:

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.

LUMC (100.0%)

ALBINUSDREEF 2

2333 ZA LEIDEN, NL

72 Inventor/es:

VAN DER BURG, SJOERD HENRICUSPOSTZONE

K1-P;

OFFRINGA, RIENK;

MELIEF, CORNELIS JOHANNES MARIA y

KENTER, GEMMA G.

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 406 077 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

Vacuna de péptido p53

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la medicina y la inmunología. En particular se refiere a una vacuna de péptido p53 mejorada.

10 Antecedentes de la invención

[0002] En esta solicitud, p53 se toma como un ejemplo representativo de un autoantígeno de expresión ubicua conocido por estar asociado al cáncer. La estrategia usada para diseñar una vacuna contra p53 podría aplicarse para diseñar una vacuna contra cualquier otro autoantígeno de expresión ubicua conocido por estar asociado al cáncer. La fosfoproteína nuclear p53 es una proteína supresora tumoral que se expresa de forma ubicua en niveles bajos en tejidos normales, incluyendo timo, bazo y células linfocitopoyéticas (Rogerl A *et al.*, Milner J *et al.*, Terada N *et al.*). La vida media normal de la p53 de tipo salvaje es inferior a 30 minutos. Tras la ubiquitinación, la proteína p53 de tipo salvaje (WT) es degradada rápidamente por proteasomas (Honda R *et al.*, Momand J *et al.*, Shkedy D *et al.*). La digestión mediada por proteasomas de p53 puede llevar a la generación de péptidos que son presentados por moléculas MHC de clase I. El reconocimiento de estos péptidos derivados de p53 de tipo salvaje ligados a MHC de clase I en la superficie de las APC tímicas por células T tímicas inmaduras con alta avidéz para el complejo MHC de clase I-péptido dará como resultado una selección negativa (Allen PM *et al.*, Ashton-Rickardt PG *et al.*, Kappler JW *et al.*). Como consecuencia, el repertorio de células T periféricas no contendrá células T restringidas por MHC de clase I específicas de p53 funcionales. Theobald *et al.* mostraron elegantemente que los CTL específicos para el péptido procesado naturalmente p53₁₈₇₋₁₉₇ se eliminaron del repertorio en ratones WTP53 pero no en ratones p53^{-/-} (Theobald M *et al.*, 1997), demostrando que la selección negativa de CTL específicos de p53 de alta avidéz puede ocurrir en el timo. Paradójicamente, los CTL restringidos por MHC de clase I capaces de reconocer endógenamente WTP53 procesada en la superficie de las células tumorales, se han detectado tanto en ratones como en humanos (Theobald M *et al.* 1997, Macagno A, *et al.*, Mayordomo JI *et al.*, Barfoed AM *et al.*, Chikamatsu K *et al.*, Eura M *et al.*, Houbiers JG *et al.*, Ropke M *et al.*), lo que sugiere que los CTL restringidos por MHC de clase I específicos de p53 funcionales pueden evitar la inducción de tolerancia.

[0003] Ya se han desarrollado varias vacunas de p53. Por ejemplo, la WO 00/75336 divulga péptidos poliepitópicos derivados de p53 que tienen la capacidad de ser degradados por el proteasoma y de asociarse con alta afinidad a las moléculas MHC de clase I. Tales propiedades se cree que son esenciales para inducir una respuesta inmune contra p53. Más probablemente, las células T que responden a este tipo de péptidos bien han sido eliminadas en el timo, bien son toleradas en la periferia, bien son de baja afinidad receptora de células T para mediar una respuesta eficaz anti-tumoral (Theobald M & Offringa R. 2003, and Morgan *et al.*). Así, se espera que tales péptidos derivados de un autoantígeno de expresión ubicua, tal como p53, no será capaz de desencadenar una respuesta inmune eficaz y fuerte *in vivo*.

[0004] Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de vacunas de p53 nuevas y mejoradas, que no tengan todos los inconvenientes de las vacunas de p53 existentes.

45 Descripción de la invención

[0005] La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que para inducir una respuesta eficaz anti p53, un péptido derivado de p53 debería ser ineficazmente procesado por el proteasoma y/o mostrar una capacidad de baja a intermedia para formar establemente complejos MHC de clase I-péptido en la superficie celular y/o un péptido muestra una afinidad de baja a media de unión a MHC. Preferiblemente, un péptido derivado de p53 debería ser ineficazmente procesado por el proteasoma y/o mostrar una capacidad de baja a intermedia para formar establemente complejos MHC de clase I -péptido en la superficie celular.

Hemos descubierto que el escape de células T autoespecíficas de la selección negativa en el timo puede ocurrir a través de interacciones de baja avidéz entre TCR y MHC. De hecho, los CTL específicos de WTP53 que reconocen su péptido cognado se han detectado en ratón WTP53 pero con una avidéz 10 veces inferior que los CTL obtenidos a partir de ratones p53^{-/-} (Theobald M *et al.*, 1997 y Hernandez J *et al.*). Además, una disparidad entre los llamados inmunoproteasomas y proteasomas domésticos en la generación de determinados epítomos peptídicos puede permitir una selección positiva por el epitelio tímico pero un fracaso para eliminar estas células por una falta de presentación de estos complejos MHC-péptido por las APC tímicas. Las células dendríticas expresan constitutivamente inmunoproteasomas (Kloetzel PM & Ossendorp 2004) y altos niveles de inmunoproteasomas se han detectado en el timo (Zanelli E *et al.*, y Stohwasser R *et al.*). Morel *et al.* demostraron que los CTL humanos que reconocieron el antígeno de melanoma Melan-A al igual que los CTL que reconocieron una proteína nueva de expresión ubicua no reconocieron APC que portan inmunoproteasomas, aunque fueron capaces de reconocer células que expresan proteasomas domésticos. La falta de presentación de suficientes moléculas MHC de clase I que presentan el mismo péptido también puede permitir a las células T sobrevivir a la selección tímica (Sebzda E *et al.*). Una expresión de superficie modesta de ciertos péptidos restringidos por MHC de clase I se puede conseguir mediante diferentes

mecanismos, no excluyentes entre sí: 1) disminuir la expresión o disminuir la renovación de proteínas en la célula resultante de la generación de un número insuficiente de epítomos que permiten el reconocimiento por CTL (Vierboom MP *et al.*), 2) péptidos con sólo una afinidad de unión débil para MHC pueden perder la competición con péptidos con mejores propiedades de unión a MHC y como tales se expresan difícilmente en la superficie celular, 3) péptidos con sólo una capacidad débil para enlazarse de manera estable con MHC de clase I pueden formar complejos MHC de clase I - péptido en la superficie celular que rápidamente se desintegran y como tales ya no son estimuladores para las células T (van der Burg SH *et al.* 1996) y 4) la generación proteasómica de epítomos de CTL puede ser insuficiente para generar una cantidad eficaz de complejos MHC-péptido.

10 Péptido

[0006] En un primer aspecto se proporciona una agrupación de péptidos según la reivindicación 3. Se ha descrito un péptido derivado de una proteína que expresa de forma ubicua autoantígenos y se conoce por estar asociado al cáncer, dicho péptido comprende un epítomo que exhibe una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I-péptido en la superficie celular y/o es ineficazmente procesado por un proteasoma y/o exhibe una afinidad de baja a intermedia de unión a MHC. Preferiblemente, un péptido comprende un epítomo que exhibe una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I-péptido en la superficie celular y/o es ineficazmente procesado por un proteasoma.

En el contexto de la invención, "exhibir una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia" preferiblemente significa que la afinidad de unión relativa de un epítomo contenido en un péptido está comprendida entre 5 y 50 μM . Más preferiblemente, la afinidad de unión relativa está comprendida entre 10 y 50 μM , incluso más preferiblemente entre 15 y 50 μM . La afinidad de unión relativa se evalúa preferiblemente por un ensayo de unión celular basado en la competencia, tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg SH 1995) (véase también el ejemplo 1). La afinidad de un epítomo dado presente dentro de un péptido se expresa como la concentración del epítomo para inhibir 50% (IC_{50}) de la unión de un epítomo de referencia. La longitud del epítomo está generalmente comprendida entre 8 y 12 aminoácidos de longitud y se selecciona típicamente basada en los residuos de anclaje típicos para HLA-A*0101, A*0301, A*1101 y A*2401 (Rammensee HG *et al.*). Los péptidos preferidos son los que se describen en el ejemplo 1.

En el contexto de la invención, "exhibir una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia" se mide preferiblemente midiendo la estabilidad para unión a MHC como se describe en (van der Burg SH *et al.* 1996).

La estabilidad de otros complejos péptido-HLA se determinó preferiblemente de la siguiente manera. La unión peptídica se llevó a cabo a 4°C y 20°C y se determinó IC_{50} . Los péptidos de >50% de los complejos iniciales que se perdieron en 2 horas se consideraron inestables. Los péptidos estables mostraron IC_{50} a 20°C que desviaron <2 veces del IC_{50} a 4°C. Los péptidos que mostraron IC_{50} a 20°C de más de dos veces el IC_{50} a 4°C pero IC_{50} <15 μM se consideraron de unión con estabilidad intermedia. Los demás se designaron de unión peptídica inestable.

En el contexto de la invención, "ser ineficientemente procesado por un proteasoma" preferiblemente significa que en la primera hora de digestión por un proteasoma se encuentra menos del 1 % del péptido digerido total. El tratamiento por un proteasoma se evalúa preferiblemente por incubación de un proteasoma purificado, más preferiblemente un proteasoma humano con un péptido que comprende el epítomo de CTL potencial (30 aminoácidos de longitud, aproximadamente) en un tampón de digestión de proteasoma durante al menos una hora a 37°C. La reacción se detiene posteriormente añadiendo ácido trifluoroacético. El análisis de los péptidos digeridos se realiza con espectrometría de masas de ionización de electrospray (véase el ejemplo 1). Incluso más preferiblemente, el proteasoma humano es un inmunoproteasoma de células B-LCL JY (Kessler JH *et al.* 2001).

La secuencia de un péptido descrito en la presente no es crítica siempre que esté derivado de una proteína que expresa de forma ubicua autoantígenos y conocido por estar asociado al cáncer y siempre que el péptido comprenda un epítomo que exhiba una capacidad baja para formar MHC de clase I estables en la superficie celular y/o que esté ineficazmente procesado por un proteasoma y/o exhiba una afinidad de unión a MHC baja o intermedia. Preferiblemente, un péptido comprende un epítomo que exhibe una baja capacidad para formar MHC de clase I estables en la superficie celular y/o que se procesa ineficazmente por un proteasoma.

[0007] Por consiguiente, se usa preferiblemente un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos contigua derivada de la secuencia de aminoácidos de una proteína que expresa de forma ubicua autoantígenos y conocido por estar asociado al cáncer.

En el contexto de la invención, una proteína se expresa de forma ubicua. Preferiblemente, una proteína se expresa de forma ubicua aproximadamente cuando se expresa ampliamente. Ampliamente preferiblemente significa que su expresión es detectable mediante series o Northern en al menos 5 tipos diferentes de tejidos, incluyendo el timo, más preferiblemente al menos 7, incluyendo el timo, e incluso más preferiblemente al menos 10, incluyendo el timo.

Una proteína se dice preferiblemente que está asociada al cáncer en los siguientes casos ilustrativos y no limitativos: una proteína se sobreexpresa y/o se muta y/o se expresa de manera aberrante en un tejido de pacientes con cáncer al compararlo con el tejido correspondiente de un sujeto que no tiene cáncer. Una proteína expresada de forma aberrante se puede expresar *de novo* en un tejido donde normalmente no se expresa. Una proteína mutada puede ser una variante de empalme. Una proteína mutada puede producirse además como una proteína de fusión aberrante como resultado de una translocación.

Ejemplos de proteínas que expresan de forma ubicua autoantígenos conocidas por estar asociadas al cáncer son p53, MDM-2, HDM2 y otras proteínas que desempeñan un papel en la ruta p53, moléculas tales como survivina, telomerasa, isoforma 1B1 de citocromo P450, Her-2/neu y CD19 y todas las proteínas denominadas domésticas.

La proteína es p53, más preferiblemente p53 humana.

La secuencia de aminoácidos de p53 humana se representa en SEC ID nº: 1. Preferiblemente, la longitud de la secuencia de aminoácidos contigua derivada de la proteína, preferiblemente p53, no es de más de 45 aminoácidos y comprende al menos 19 aminoácidos contiguos derivados de la secuencia de aminoácidos de proteína, p53. La longitud de la secuencia de aminoácidos contigua derivada de la proteína, p53, comprendida en el péptido, está comprendida entre aminoácidos. En otra forma de realización preferida, un péptido comprende 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, residuos de aminoácidos contiguos de proteína, p53. El experto en la materia, por lo tanto, entenderá que un péptido de la invención es diferente de una proteína p53, preferiblemente de la p53 humana.

[0008] Un péptido de tal longitud usado en la invención se puede sintetizar fácilmente. En una descripción, un antígeno presente en un péptido deriva de la proteína, p53, o una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de la misma. Este péptido debería cumplir las actividades que se han definido anteriormente (un péptido comprende un epítipo que muestra una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I-péptido expresados en la superficie celular y/o es ineficazmente procesado por un proteasoma y/o muestra una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia. Preferiblemente, un péptido comprende un epítipo que muestra una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I-péptido expresados en la superficie celular y/o es ineficazmente procesado por un proteasoma. Una parte inmunogénica, derivada y/o análoga de una proteína, preferiblemente p53, comprende la misma capacidad inmunogénica en especie, no necesariamente en cantidad, que dicha proteína misma. Un derivado de tal proteína se puede obtener por sustitución preferiblemente conservadora de aminoácidos.

[0009] Como se describe aquí, cuando la proteína es p53, diferentes epítipos que muestran una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I-péptido expresados en la superficie celular ya se han identificado y se presentan en la tabla 5. Tal péptido comprende cualquiera de estos epítipos de tipo HLA A1, A2, A3, A11 y/o A24:

A1: 229-236 y/o
 A2 149-157 y/o
 A3: 101-110, 112-120, 113-120, 117-126, 154-163, 156-163, 360-370, 363-372, 373-381, 376-386 y/o
 A11: 101-110, 112-120, 283-291, 311-319, 311-320, 312-319, 363-370,, 374-382 y/o
 A24: 340-348.

[0010] Alternativamente o en combinación con la divulgación precedente, en otra divulgación, cuando la proteína es p53, los epítipos ineficazmente procesados por un proteasoma ya se ha identificado y se presentan en la tabla 5. Tal péptido de la invención comprende cualquiera de estos epítipos de tipo HLA A1, A2, A3 y/o A11:

A1: 117-126, 196-205, 229-236 y/o
 A2: 264-272 y/o
 A3: 101-110, 154-163, 154-164, 156-163, 156-164, 172-181, 376-386 y/o
 A11: 101-110, 156-164, 311-319, 311-320, 312-319, 374-382.

[0011] Alternativamente o en combinación con una o dos de las divulgaciones precedentes, en una divulgación, cuando la proteína es p53, varios epítipos que muestran una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia ya se han identificado y se presentan en la tabla 5. En esta forma de realización preferida, un péptido de la invención comprende cualquiera de estos epítipos de tipo HLA A1, A2, A3 y/o A11:

A1: 117-126, 196-205, 205-214, 229-236, 229-236 y/o
 A2: 113-122, 149-157, 264-272, 322-330 y/o
 A3: 112-120, 113-120, 117-126, 154-163, 156-163, 172-181, 360-370, 363-372, 373-381 y/o
 A11: 112-120, 283-291, 363-370, 374-382.

[0012] En una divulgación, las primeras dos formas de realización preferidas se combinan para definir diferentes epítipos, cuando la proteína es p53, dichos epítipos muestran una capacidad de baja a intermedia para formar MHC de clase I-péptido estables expresados en la superficie celular y son ineficazmente procesados por un proteasoma. Tal péptido de la invención comprende cualquiera de estos HLA A1, A3 y/o

A1: 229-236 y/o
 A3: 101-110, 154-163, 156-163, 376-386 y/o
 A11: 101-110, 311-319, 311-320, 312-319, 374-382.

Dentro de esta divulgación, los epítipos A1: 229-236, A3: 154-163, 156-163 y/o A11: 374-382 son los más preferidos dado que cada uno de ellos también muestra una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia.

[0013] En una forma de realización, un péptido p53 no consiste en o comprende un epítipo de tipo HLA-A2.1. En esta forma de realización, preferiblemente un péptido p53 no consiste en o comprende un epítipo que muestra una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia. En una divulgación, cuando la proteína es p53, el péptido se selecciona de los siguientes péptidos, cada péptido comprende o consiste en o se superpone a cualquiera de las siguientes secuencias:

p53 86-115, p53 102-131, p53 142-171, p53 157-186, p53 190-219, p53 224-248, p53 225-254, p53 257-286, p53 273-302, p53 305-334, p53 353-382 y p53 369-393.

5 En una divulgación, cuando la proteína es p53, el péptido se selecciona de los siguientes péptidos, cada péptido comprende o consiste en o se superpone a cualquiera de las siguientes secuencias: p53 142-171, p53 157-186, p53 190-219, p53 224-248, p53 225-254, p53 241-270, p53 257-286 y p53 273-302. En el contexto de la invención, superposición significa que la secuencia del péptido se superpone parcialmente o completamente a una secuencia dada. Preferiblemente, superposición significa que se superpone parcialmente. Parcialmente preferiblemente significa que la superposición es de uno o más aminoácidos en el N-término y/o el C-término de la secuencia peptídica, más preferiblemente de dos o más aminoácidos en el N-término y/o el C-término, o más. También se prefiere que la superposición sea de uno o más aminoácidos en el N-término y/o dos o más aminoácidos en el C-término de la secuencia peptídica o viceversa. El experto en la materia entenderá que todos los tipos de superposición están abarcados por la presente invención siempre que el péptido obtenido muestre la actividad deseada, como se ha definido anteriormente en la presente. En una divulgación, el péptido no consiste en p53 102-137, p53 106-137, p53 149-169, p53 129-156, p53 187-212, p53 187-220, p53 187-205, p53 187-234, p53 226-243 o p53 226-264. Cada uno de estos péptidos p53 se conoce del estado de la técnica por mostrar una alta afinidad de unión a MHC y/o es eficazmente procesado por un proteasoma.

Composición

20 [0014] En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una agrupación de péptidos tal y como se ha definido anteriormente. Una composición descrita comprende al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro, o al menos cinco, o al menos seis o más de tales péptidos. Las composiciones descritas pueden incluir al menos dos, al menos tres o los siguientes péptidos: p53 142-171, p53 157- 186, p53 190-219, p53 224-248, p53 225-254, p53 241-270, p53 257-286 and p53 273-302, p53 305-334, p53 353-382 y p53 369-393. Otras composiciones descritas además incluyen p53 86-115 y/o p53 102-131.

30 [0015] En una forma de realización preferida, la agrupación de péptidos comprende además al menos una de las siguientes agrupaciones de péptidos, donde cada péptido comprende o consiste en o se superpone a las siguientes secuencias:

35 agrupación 1: p53 190-219, p53 206-235, p53 224-248,
agrupación 3: p53 225-254, p53 241-270, p53 257-286, p53 273-302, p53 289-318, p53 305-334, p53 321-350,
p53 337- 366, p53 353-382 y p53 369-393,
agrupación 4: p53 102-131, p53 126-155,
agrupación 5: p53 70-90, p53 86-115.

40 La técnica conoce actualmente muchas maneras de generar un péptido. La invención no se limita a cualquier forma de péptido generado siempre que el péptido generado comprenda, consista en o se superponga a cualquiera de las secuencias dadas y tenga la actividad requerida según se ha definido anteriormente. A modo de ejemplo, un péptido presente en la composición se puede obtener a partir de una proteína, preferiblemente p53 sintetizada *in vitro* o por una célula, por ejemplo a través de ácido nucleico codificante. Un péptido puede estar presente como un único péptido o incorporado en una proteína de fusión. Un péptido puede estar además modificado por eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos, por extensión en el N- y/o C-término con aminoácidos adicionales o grupos funcionales, que pueden mejorar la biodisponibilidad, dirigiéndose a células T, o comprender o liberar sustancias de modulación inmunológica que proporcionan funciones adyuvantes o (co)estimuladoras. Los aminoácidos adicionales opcionales en el N- y/o C- término preferiblemente están presentes en las posiciones correspondientes en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la que derivan, preferiblemente secuencia de aminoácidos de p53.

50 [0016] Por consiguiente, en otro aspecto, una agrupación de péptidos de la invención y una composición de la invención como se definen aquí son para su uso como un medicamento.

55 [0017] En otra forma de realización preferida, una agrupación de péptidos o una composición peptídica comprende además un excipiente farmacéutico y/o un modulador inmunológico. Cualquier excipiente y/o portador inerte farmacéuticamente aceptable conocido se puede añadir a la composición. La formulación de medicamentos y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos y habituales en la técnica y, por ejemplo, se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21nd Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. Un péptido de la invención es preferiblemente soluble en soluciones acuosas fisiológicamente aceptables (p. ej. PBS) que comprenden no más de 35 disminuyendo a 0%; 35, 20, 10, 5 o 0% de DMSO. En tal solución, un péptido es preferiblemente soluble en una concentración de al menos 0, 5, 1, 2, 4 u 8 mg de péptido por ml. Más preferiblemente, una mezcla de más de un péptido diferente de la invención es soluble en una concentración de al menos 0, 5, 1, 2, 4, u 8 mg de péptido por ml en tales soluciones.

65 [0018] Cualquier modulador inmunológico conocido se puede añadir a la composición. Preferiblemente, el modulador inmunológico es un adyuvante. Más preferiblemente, la composición comprende un péptido como se ha definido anteriormente en la presente y al menos un adyuvante. Preferiblemente, el adyuvante es una emulsión de aceite en

agua tal como adyuvantes de Freund incompletos, Montanide ISA51 (Seppic, Francia), Montanide 720 (Seppic, Francia). Este tipo de medicamento se puede administrar como una única administración. Alternativamente, la administración de un péptido como se ha definido anteriormente y/o un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o diferentes péptidos y/o diferentes adyuvantes se pueden administrar consecutivamente.

5 [0019] Los adyuvantes particularmente preferidos son aquellos que se conocen por actuar vía los receptores tipo peaje. Los adyuvantes que son capaces de activar el sistema inmunológico innato pueden ser activados particularmente bien vía receptores tipo peaje (TLRs), incluyendo TLRs 1-10 y/o vía una proteína RIG-1 (gen 1 inducible por ácido retinoico) y/o vía un receptor de endotelina. Los compuestos capaces de activar los receptores TLR y modificaciones y derivados de los mismos están bien documentados en la técnica. Los TLR1 se pueden activar por lipoproteínas bacterianas y formas acetiladas de las mismas, los TLR2 se pueden activar además por glicolípidos bacterianos Gram positivos, LPS, LPA, LTA, fimbrias, proteínas de membrana externa, proteínas de choque térmico de bacterias o del huésped y lipoarabinomano micobacteriano. Los TLR3 se pueden activar por dsRNA, en particular de origen vírico, o por el compuesto químico poly(I:C). Los TLR4 se pueden activar por LPS Gram negativo, LTA, proteínas de choque térmico del huésped o de origen bacteriano, proteínas de revestimiento o de envoltura vírica, taxol o derivados del mismo, hialuronano que contiene oligosacáridos y fibronectinas, los TLR5 se pueden activar con flagelina o flagelos bacterianos, los TLR6 se pueden activar por lipoproteínas micobacterianas y factor soluble lábil al calor de *Streptococcus* del grupo B (GBS-F) o *Staphylococcus modulinus*. Los TLR7 se pueden activar por imidazoquinolinas y derivados. Los TLR9 se pueden activar por DNA CpG no-metilado o complejos IgG-cromatina. En particular, los TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 desempeñan un papel importante en la mediación de una respuesta inmune innata contra las infecciones víricas y los compuestos capaces de activar estos receptores son particularmente preferidos para su uso en la invención. Los adyuvantes particularmente preferidos comprenden, pero de forma no limitativa, compuestos producidos sintéticamente que comprenden dsRNA, poly(I:C), DNA CpG no-metilado que desencadena los receptores TLR3 y TCR9, IC31, un agonista de TLR9, IMSAVAC, un agonista de TLR4. En otra forma de realización preferida, los adyuvantes se enlazan físicamente a un péptido como se ha definido aquí anteriormente. El enlace físico de adyuvantes y compuestos coestimuladores o grupos funcionales a los epítomos de HLA de clase I y HLA de clase II que comprenden péptidos proporciona una respuesta inmune mejorada por estimulación simultánea de células presentadoras de antígenos, en particular células dendríticas, que interiorizan, metabolizan y muestran el antígeno. Otro compuesto de modificación inmune preferido es un inhibidor de adhesión a la célula T, más preferiblemente un inhibidor de un receptor de endotelina tal como BQ-788 (Buckanovich RJ *et al.*" Ishikawa K, PNAS (1994) 91:4892). BQ-788 es N-cis-2,6-dimetilpiperidinocarbonil-L-gamma-metilleucil-D-1-metoxicarbonilriptofanil-D-norleucina. No obstante, cualquier derivado de BQ-788 o compuesto de BQ-788 modificado también está abarcado dentro del campo de esta invención.

35 [0020] Además, se prefiere el uso de moléculas (co)estimulatorias de APC, como se establece en la WO99/61065 y en la WO03/084999, en combinación con un péptido presente en el medicamento usado en la invención. En particular, el uso de los ligandos 4-1-BB y/o CD40, anticuerpos agonísticos o fragmentos funcionales y derivados de los mismos, al igual que compuestos sintéticos con actividad agonística similar, se administran preferiblemente por separado o en combinación con un péptido presente en el medicamento a sujetos que deben tratarse con el fin de estimular más el aumento de una respuesta inmune óptima en el sujeto.

40 [0021] En una forma de realización preferida, el adyuvante comprende un exosoma, una célula dendrítica, lípido A de monofosforil y/o ácido nucleico CpG.

45 [0022] Por lo tanto en una forma de realización preferida, un medicamento comprende una agrupación de péptidos o una composición como se ha definido anteriormente aquí y un adyuvante seleccionado del grupo que consiste en emulsiones de aceite en agua (Montanide ISA51, Montanide ISA 720), un adyuvante conocido por actuar vía un receptor tipo peaje, una molécula coestimuladora de APC, un exosoma, una célula dendrítica, lípido A de monofosforil y un ácido nucleico CpG.

50 [0023] En otra forma de realización preferida, para promover la presentación de una agrupación de péptidos por una célula o células dendríticas presentadoras de antígeno profesional, el medicamento que comprende una agrupación de péptidos comprende además un agente de activación de DC.

55 [0024] Las formas de administración conocidas y habituales en la técnica se describen, por ejemplo, en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. Los péptidos, las composiciones peptídicas y los medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se formulan preferiblemente para que sean adecuados para la administración intravenosa o subcutánea o la administración intramuscular, aunque se pueden prever otras vías de administración, tales como la administración mucosa o administración intradérmica y/o intracutánea, por ejemplo por inyección. En este caso se prefiere la administración intradérmica. Las ventajas y/o formas de realización preferidas que están específicamente asociadas a la administración intradérmica se definen más adelante en una sección separada titulada "administración intradérmica".

60 [0025] Además, está dentro de la presente invención que la administración de al menos una agrupación de péptidos y/o al menos una composición de la invención se puede realizar como una única administración. Alternativamente, la administración de al menos una agrupación de péptidos y/o al menos una composición se puede repetir si es necesario y/ diferentes agrupaciones de péptidos y/o composiciones de la invención se pueden administrar consecutivamente.

[0026] Se puede utilizar cualquier modo de administración de la composición o medicamento de la invención. La composición o medicamento de la invención se puede formular para que sea adecuado para la administración intravenosa o subcutánea, o la administración intramuscular, aunque se pueden prever otras vías de administración, tales como la administración mucosa o intradérmica y/o intracutánea, por ejemplo por inyección.

[0027] Además, una forma de realización preferida comprende la entrega de una agrupación de péptidos, con o sin estimulantes inmunológicos adicionales tales como ligandos TLR y/o anticuerpos anti CD40/anti-4-1 BB en un vehículo de liberación lenta tal como aceite mineral (p. ej. Montanide ISA 51) o PLGA. Alternativamente, un péptido de la invención se puede entregar de manera intradérmica, por ejemplo por inyección, con o sin estimulantes inmunológicos (adyuvantes). Preferiblemente, para la entrega intradérmica un péptido de la invención se administra en una composición que consiste en los péptidos y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables inmunológicamente inertes, por ejemplo soluciones acuosas tamponadas a fuerza iónica fisiológica y/o osmolaridad (tal como por ejemplo PBS).

Uso de una agrupación de péptidos

[0028] En otro aspecto de la invención, se proporciona un uso de una agrupación de péptidos, como se ha definido en la presente anteriormente, derivado de un autoantígeno de expresión ubicua conocido por estar asociado al cáncer, dicho péptido exhibe una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I expresados en la superficie celular y/o es ineficazmente procesado por un proteasoma y/o exhibe una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia para la producción de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer. La proteína es p53. Preferiblemente, una agrupación de péptidos muestra una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I expresados en la superficie celular y/o es ineficazmente procesada por un proteasoma. Las agrupaciones de péptidos preferidas para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer son como ya se han definido anteriormente en la presente. Todas las características preferidas del medicamento fabricado para este uso ya se han definido en la presente anteriormente. En una forma de realización preferida, el medicamento que se usa comprende además un portador inerte farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. En una forma de realización preferida, el medicamento, que es una vacuna, se administra a un humano o animal. En una forma de realización más preferida, el humano o animal sufre o corre el riesgo de sufrir un cáncer, donde la proteína de la que deriva el péptido está asociada a éste. La proteína es p53, incluso más preferiblemente p53 humana. Incluso más preferiblemente, los cánceres asociados a p53 se seleccionan de la siguiente lista: pulmón, colon, esófago, ovario, páncreas, piel, gástrico, cabeza y cuello, vejiga, sarcoma, próstata, hepatocelular, cerebro, suprarrenal, pecho, endometrio, mesotelioma, renal, tiroides, hematológico, carcinoide, melanoma, paratiroides, cérvix, neuroblastoma, Wilms, testículos, glándula pituitaria y feocromocitoma. Otras proteínas descritas se han citado ya en este documento.

[0029] Preferiblemente, dicha enfermedad, tal como el cáncer, es al menos tratable en parte o evitable mediante la inducción y/o el aumento de dicha respuesta inmune usando un péptido de la invención.

[0030] Un método de la invención es, por lo tanto, muy adecuado para proporcionar a un sujeto inmunidad contra cualquier auto proteína de expresión ubicua conocida por estar asociada al cáncer y/o para aumentar dicha inmunidad. Los métodos de la invención son adecuados para cualquier propósito para el que se usen otras estrategias de inmunización. Las inmunizaciones antiguas se usan para fines de vacunación, es decir, para la prevención del cáncer. No obstante, los métodos de la invención no sólo son adecuados para evitar el cáncer. Los métodos también se pueden usar para tratar el cáncer existente, por supuesto con las limitaciones de que el cáncer es tratable mediante la inducción y/o la mejora de la inmunidad de la célula T específica del antígeno.

Método

[0031] En otro aspecto, la invención divulga un método para diseñar un péptido derivado de una proteína que expresa de forma ubicua autoantígenos asociado al cáncer, dicho péptido comprende un epítipo que exhibe una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I expresados en la superficie celular y/o son ineficazmente procesados por un proteasoma y/o exhiben una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia y dicho péptido es adecuado para producir un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer. El péptido preferido comprende un epítipo que exhibe una capacidad de baja a intermedia para formar complejos estables MHC de clase I expresados en la superficie celular y/o es ineficazmente procesado por un proteasoma. Todas las características de este método ya se han explicado en este documento. Para identificar tal péptido, el experto en la materia podría seguir la estrategia según se ilustra en los ejemplos: un epítipo que exhibe una afinidad de unión a MHC de baja a intermedia se puede identificar midiendo la afinidad de unión relativa como se ha definido anteriormente en este documento. La capacidad baja/intermedia de un epítipo para formar complejos estables MHC de clase I expresados en la superficie celular se puede medir como se ha definido en la presente anteriormente. Finalmente, el procesamiento ineficaz de un péptido por un proteasoma se puede evaluar como se ha definido en la presente anteriormente.

Administración intradérmica

[0032] En una descripción, un péptido o una composición que comprende una agrupación de péptidos o un medicamento usado en la invención, todos tal y como se definen en este documento, se formulan para ser adecuados para la administración o aplicación intradérmica. La intradérmica es conocida por el experto en la materia. En el contexto de la invención, intradérmico es sinónimo de intracutáneo y es diferente de subcutáneo. Una aplicación más superficial de una sustancia es epicutánea (sobre la piel), después vendría una aplicación intradérmica (en o dentro de la piel), después una aplicación subcutánea (en los tejidos justo debajo de la piel), después una aplicación intramuscular (dentro del cuerpo del músculo). Una aplicación intradérmica normalmente se realiza por inyección. Una inyección intradérmica de una sustancia normalmente se hace para probar una posible reacción, alergia y/o inmunidad celular a ésta. Una aplicación subcutánea también se realiza normalmente por inyección: se inyecta una aguja en los tejidos bajo la piel.

[0033] En otra descripción, un medicamento o composición o agrupación de péptidos usados en la invención no comprende ningún adyuvante tal como Montanide ISA-51, esto significa que la formulación del medicamento (o composición o agrupación de péptidos) es más simple: una emulsión a base de agua y aceite preferiblemente no está presente en un medicamento (o composición o péptido) usado. Por consiguiente, un medicamento (o composición o agrupación de péptidos) usado en la descripción no comprende un adyuvante tal como Montanide ISA-51 y/o no comprende una emulsión a base de aceite en agua. Por lo tanto, en una descripción, un medicamento (o composición o agrupación de péptidos) usado en la descripción es una solución acuosa tamponada a fuerza iónica fisiológica y/o osmolaridad, tal como por ejemplo PBS (tampón fosfato salino) que comprende o que consiste en una o más agrupaciones de péptidos, tal y como se ha definido en este documento anteriormente. El experto en la materia sabe cómo preparar tal solución.

[0034] Un medicamento (o composición o agrupación de péptidos) como se usa en la invención tiene otra ventaja, que es que mediante la administración intradérmica de cantidades bajas de una agrupación de péptidos como se ha definido anteriormente, se puede obtener aún un efecto inmunogénico. La cantidad de cada péptido usado es preferiblemente de entre 1 y 1000 µg, más preferiblemente de entre 5 y 500 µg, incluso más preferiblemente de entre 10 y 100 µg.

[0035] En otra forma de realización preferida, un medicamento (o composición) comprende una agrupación de péptidos como se ha definido en la presente anteriormente y al menos un adyuvante, dicho adyuvante no está formulado en una emulsión a base de aceite en agua y/o no es de un tipo de emulsión de aceite en agua como se ha definido en la presente anteriormente. Este tipo de medicamento se puede administrar como una administración única. Alternativamente, la administración de una agrupación de péptidos como se ha definido anteriormente en este documento y/o un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o se pueden administrar diferentes agrupaciones de péptidos y/o diferentes adyuvantes consecutivamente. Además, está abarcado por la presente invención que una agrupación de péptidos de la invención se administra de forma intradérmica mientras que un adyuvante, tal y como se define aquí, se administra consecutivamente. Un adyuvante puede se puede administrar de forma intradérmica. No obstante, cualquier otra forma de administración se puede utilizar para un adyuvante.

[0036] La administración intradérmica de una agrupación de péptidos es muy atractiva ya que la inyección de la vacuna se realiza en el sitio o lo más cerca posible del sitio de la enfermedad, dando como resultado la activación local del ganglio linfático de drenaje de la enfermedad, provocando una activación local más fuerte del sistema inmunológico. En una forma de realización preferida, la administración intradérmica se realiza directamente en el sitio de la lesión o enfermedad. El sitio de la lesión se entiende en este caso que está a menos de 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 cm del sitio de la lesión.

[0037] Tras la administración intradérmica de un medicamento tal y como se define en este documento, se desencadenan las respuestas no sólo Th2 sino también Th1. Esto es sorprendente dado que ya se descubrió que el cebado de antígeno cutáneo a través de pistola de genes llevan a una respuesta inmune Th2 selectiva (Alvarez D. *et al.*, 2005). Además, la respuesta inmune observada no sólo se limita a la piel como cabría esperar sobre la base de (Alvarez D. *et al.*, 2005). Demostramos que las células T específicas que secretan IFN γ circulan a través del sistema de linfático secundario ya que se detectan en la sangre periférica post-desafío.

[0038] Otra ventaja crucial de un medicamento (o composición o agrupación de péptidos) de la invención es que se pueden utilizar cantidades relativamente bajas de un péptido, en una única inyección, en una simple formulación y sin ningún adyuvante conocido que produzca efectos secundarios indeseados como Montanide ISA-51. Sin querer estar limitados por ninguna teoría, creemos que un péptido intradérmico (agrupación) usado en la invención se dirige específica y directamente a las células epidérmicas de Langerhans (LC) presentes en el epitelio. Las células de Langerhans son un subtipo específico de DC que muestran una capacidad sobresaliente para iniciar respuestas inmunológicas primarias (Romani N. *et al.* 1992). Estas LC se pueden ver como adyuvantes naturales reclutados por el medicamento usado en la invención.

[0039] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere al uso de una agrupación de péptidos tal y como se define en este documento para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad tal y como se define en la presente, donde el medicamento es de administración intradérmica, como se ha

definido anteriormente, y donde además una misma y/o distinta agrupación de péptidos, tal y como se define aquí, se usa posteriormente para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la misma enfermedad, donde el medicamento es de administración subcutánea.

5 [0040] Un medicamento para la administración intradérmica se ha definido ya en este documento. Una agrupación de péptidos usada para la administración subcutánea puede ser la misma que la usada para la administración intradérmica y se ha definido ya en este documento. El experto en la materia sabe cómo formular un medicamento adecuado para la administración subcutánea. Preferiblemente, un medicamento adecuado para la administración subcutánea comprende una agrupación de péptidos, como ya se ha definido en la presente, en combinación con un adyuvante. Los adyuvantes preferidos se han mencionado ya en este documento. Otros adyuvantes preferidos son del tipo emulsiones de aceite en agua tales como el adyuvante de Freund incompleto o IFA, Montanide ISA-51 o Montanide ISA 720 (Seppic, Francia). En otra forma de realización preferida, un medicamento adecuado para la administración subcutánea comprende una o más agrupaciones de péptidos, un adyuvante, ambos como se han definido anteriormente en la presente, y un portador inerte farmacéuticamente aceptable y/o excipientes, todos como se han definido en la presente anteriormente. La formulación del medicamento y el uso de excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen y son habituales en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Remington; The Science and Practice of Pharmacy, 21nd Edition 2005, University of Sciences in Philadelphia. El segundo medicamento usado en la invención se formula para que sea adecuado para la administración subcutánea.

20 [0041] En esta forma de realización preferida, un medicamento adecuado para la administración intradérmica se puede administrar simultáneamente con un medicamento adecuado para la administración subcutánea. Alternativamente, ambos medicamentos se pueden administrar de forma consecutiva intradérmica y subcutáneamente o viceversa (primero la administración subcutánea seguida de la administración intradérmica). En esta forma de realización preferida, como en la forma de realización preferida anterior dedicada a la administración intradérmica, la administración intradérmica y/o subcutánea de una agrupación de péptidos como se ha definido anteriormente en este documento y/o de un adyuvante se puede repetir si es necesario y/o de agrupaciones de péptidos diferentes y/o de adyuvantes diferentes se puede administrar intradérmica y/o subcutáneamente de manera consecutiva. Además está abarcado por la presente invención que un péptido de la invención se administra intradérmica y/o subcutáneamente mientras que un adyuvante, tal y como se define aquí, se administra de manera consecutiva. El adyuvante se puede administrar intradérmica y/o subcutáneamente. No obstante, cualquier otra forma de administración se puede utilizar para el adyuvante.

35 [0042] Esperamos que la combinación de una administración intradérmica y subcutánea de un medicamento (o una composición o una agrupación de péptidos) según la invención sea ventajosa. Las DC de la epidermis son claramente diferentes de las DC de la dermis y del tejido subcutáneo. La inmunización intracutánea (intradérmica) provocará el procesamiento del antígeno y la activación de las DC epidérmicas (células de Langerhans positivas de langerina) que a través de su red dendrítica están en contacto cercano con los queratinocitos. Esto también activará de manera óptima las rutas inflamatorias en las interacciones entre la célula de Langerhans y los queratinocitos, seguido de tráfico de célula de Langerhans activada y cargada de antígeno a los ganglios linfáticos de drenaje de la piel.

40 [0043] La administración subcutánea activará otros subconjuntos de DC, que también se cargarán con antígeno y se desplazarán independientemente a los ganglios linfáticos de drenaje de la piel. Posiblemente, el uso de un medicamento que se pueda administrar tanto intradérmica como subcutáneamente puede llevar a una estimulación sinérgica de las células T, en estos nodos de drenaje por los diferentes subconjuntos de DC.

45 [0044] En este documento y en su reivindicación, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para referirse a que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos que no se mencionan específicamente no están excluidos. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en", lo que significa que un péptido o una composición tal y como se define en este documento puede comprender componentes adicionales además de los específicamente identificados, sin que dichos componentes adicionales alteren la característica única de la invención. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un", "uno" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno de los elementos esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un", "uno" o "una", de este modo, normalmente significa "al menos uno".

55 Breve descripción de los dibujos

[0045]

60 Figura 1. Productos de escisión proteasómica

Figura 2. Explicación del mecanismo de formación de los productos de escisión proteasómica.

65 Figura 3. Diagrama de flujo de fase I y II del ensayo clínico en paciente con cáncer ovárico como se presenta en el ejemplo 2 y en pacientes con cáncer de colon como se presenta en el ejemplo 3. Para el paciente con cáncer ovárico se

usan cuatro inyecciones de vacuna, mientras que para el paciente con cáncer de colon se usan dos inyecciones de vacuna. Para el paciente con cáncer de colon, la biopsia de piel se realizó en el segundo sitio de vacuna.

5 Figura 4. Respuestas específicas del péptido p53 en el ensayo clínico de pacientes con cáncer ovárico según se midió por ensayo de proliferación (n=8). A-F) respuesta inducida por la vacuna (*) si muestra de post-vacunación ≥ 1000 cpm & índice de proliferación ≥ 3 y si valor cpm de post-vacunación $\geq 2x$ valor cpm de pre-vacunación. G) Respuestas a mezcla de recuperación de memoria (MRM).

Barras gris claro: pre-vacunación, barras negras: post-vacunación.

10

Figura 5. Respuestas específicas del péptido p53 en el ensayo clínico de pacientes con cáncer de colon según se ha medido por ensayo de proliferación y producción de citocina. La capacidad proliferativa específica de p53 (A y C) y la producción de citocina (B y D) de 2 pacientes varones con cáncer colorectal se muestran antes y después de la vacunación con la vacuna de péptido largo de p53. Se vacunó dos veces a los pacientes con péptidos de superposición de p53 que cubrían la secuencia de aminoácidos 70-248 (indicada por las agrupaciones de 2 péptidos: V70-115, V102-155, V142-203, V190-248). Las PBMC de los pacientes también se evaluaron contra la región N-terminal de p53 (aa 1-78) y la región C-terminal de p53 (aa 241-393).

15

Figura 6. Respuestas específicas del péptido p53 según se midió por ELISPOT de IFN γ (n=7) en pacientes con cáncer ovárico. A-F) Respuesta inducida por la vacuna (*) si {número medio de puntos - (número medio de puntos en el medio + 2SD) > 10 puntos } Y valor de post-vacunación $\geq 2x$ valor de pre-vacunación.

20

Barras gris claro: pre-vacunación, barras negras: post-vacunación.

Figura 7. Respuestas específicas del péptido p53 en las biopsias de piel de los sitios de vacunación obtenidas de pacientes con cáncer ovárico según se midió por ensayo de proliferación (n=7). Se toman biopsias, tres semanas después de la última vacunación, del último sitio de inyección. A-D) respuesta inducida por la vacuna (*) si recuentos por minuto ≥ 1000 e índice de proliferación ≥ 3 .

25

Figura 8. Las células T específicas de p53 inducidas por la vacuna pueden migrar a áreas donde el antígeno p53 esté presente y reconocer naturalmente la proteína p53 procesada y presentada. Se tomó una biopsia del segundo sitio de vacuna de un paciente con cáncer colorectal y las células T que infiltran la piel estaban expandidas. Las células T que infiltran la piel se evaluaron contra diferentes agrupaciones de péptidos p53 (indicados por el número del primer y último aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína p53 que está cubierta por la agrupación de péptidos usada) al igual que la proteína p53 y la proteína de control. Las barras indican el medio y la desviación típica de pocillos triplicados.

30

35

Figura 9. La vacunación con la vacuna p53-SLP induce respuestas de memoria de células T y extensión del antígeno en pacientes con cáncer colorectal.

40

Las PBMC aisladas pre-vacunación, después de 2 vacunaciones y a los 6 meses (#1) o 9 meses (#2) después de la vacunación se evaluaron para la presencia de células T específicas de p53 en un ensayo de proliferación mediante la estimulación de las PBMC durante 6 días con diferentes agrupaciones de péptidos p53 (indicadas por el número del primer y último aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína p53 que está cubierta por la agrupación de péptidos usada). Las barras indican el medio y la desviación típica de 8 pocillos.

45

Figura 10. Respuestas en pacientes con cáncer ovárico para péptidos p53 largos sintéticos individuales según se midió por ensayo de proliferación después de cuatro inmunizaciones. Respuesta positiva (*) si ≥ 1000 cpm & índice de proliferación ≥ 2 .

50

Figura 11. Respuestas específicas del péptido p53 en las biopsias de piel de los sitios de vacunación obtenidas de pacientes con cáncer ovárico según se midió por ensayo de proliferación. Se obtuvieron biopsias del último sitio de inyección de 17 pacientes con cáncer ovárico tres semanas después de la última vacunación. Se pudo cultivar un número insuficiente de linfocitos para ensayo de proliferación de dos biopsias (015 & 020). Respuesta positiva (*) si recuento por minuto ≥ 1000 e índice de proliferación ≥ 3 .

55

Figura 12. Respuestas de células T específicas de p53 según se midieron por ensayo de proliferación antes de la primera y después de la última vacunación, así como después de la quimioterapia en pacientes con cáncer ovárico. Muestras de post-quimioterapia se obtuvieron 12 meses (009) resp. 9 meses (019) después de la última vacunación y al menos un mes después de la última quimioterapia. Respuesta inducida por la vacuna (*) si cpm ≥ 1000 & S.I. ≥ 3 y si el cpm después de la vacunación / quimioterapia fue ≥ 2 el valor de pre-vacunación.

60

Figura 13. Niveles de suero CA-125 en pacientes con cáncer ovárico antes, durante y después de la vacunación. Valores que faltan: 04 visita 4/5/FU; 05 visita 3/4/5/FU; 11 visita FU

65

Figura 14: una visión de conjunto del número, día de aparición y antígeno inyectado que indujo unas reacciones cutáneas positivas en el grupo de 19 donantes sanos (HD). Las reacciones cutáneas se consideraron positivas cuando surgieron pápulas superiores a 2 mm de diámetro no menos de 2 días después de la inyección. La disposición indicada se usa para las 8 agrupaciones de péptidos, se indica el primero y el último aminoácido de la proteína de la agrupación de péptidos usada. La disposición en negrita indica al menos una reacción positiva dentro de este plazo; un cuadrado relleno representa una reacción cutánea positiva de nuevo desarrollo para la agrupación de péptidos indicada.

Figura 15. La detección de células T específicas de HPV 16 por IFN γ ELISPOT en la muestra de sangre pre-desafío de donantes sanos se correlaciona significativamente con la aparición de una reacción cutánea positiva temprana (<13 días) para la agrupación de péptidos reconocida ($p= 0.0003$, prueba exacta de FISHER de dos colas). Se calcularon respuestas específicas mediante la substracción del número medio de puntos + 2xSD del medio de control a partir del número medio de puntos en pocillos experimentales. Se da el número de puntos específicos por 100.000 PBMC. Las respuestas se consideraron positivas si las frecuencias de célula T específica de la agrupación de péptidos era ≥ 5 en 100.000 PBMCs.

Figura 16. A. La asociación entre la aparición de una reacción cutánea positiva y la detección simultánea (ELISPOT de IFN γ) de células T específicas de HPV 16 circulantes en la muestra de sangre post-desafío de donantes sanos ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher de dos colas). De un total de 88 pruebas de piel, 39 fueron positivas. Veinticinco de estas 39 reacciones estaban asociadas a una reacción positiva en el ELISPOT (frecuencia de célula T ≥ 5 en 100.000 PBMCs). De los 49 sitios de prueba de piel que no mostraron una reacción cutánea, 10 estaban asociados a un ELISPOT positivo.

Figura 17.

[0046]

A. Las respuestas de célula T específica de HPV 16 detectadas por ELISPOT de IFN γ en la muestra de sangre post-desafío de donantes sanos muestran una reacción cutánea positiva. Está representado el número medio de puntos por 100.000 PBMCs. La mezcla de respuesta de memoria (MRM) se usó como un control positivo. La barra rellena indica el sitio de reacción cutánea positiva de la que se tomó una biopsia por punción y se puso en cultivo.

B. Los linfocitos T que se exfiltran a partir de biopsias por perforación se evaluaron, después de un periodo de 14 a 28 días de expansión impulsada por citocina, para su capacidad para proliferar a la estimulación con monocitos pulsados con péptidos (10 $\mu\text{g/ml}$) -como se inyectó en la prueba de piel- o con proteína (20 $\mu\text{g/ml}$). Fitohemaglutinina (pHa) sirvió como control positivo. Se midió la proliferación por incorporación de [^3H]timidina y una respuesta proliferativa se definió específica si el índice de estimulación (SI) ≥ 3 . El donante sano 17 (HD17) es un ejemplo de un sitio de reacción cutánea positiva que consiste en células T no específicas.

C. Los sobrenadantes de las respuestas proliferativas en B se analizaron para presencia de IFN γ , interleuquina 4 (IL4), IL5 y factor α de necrosis tumoral, IL2, IL10 (no mostrada) por Cytometric Bead Array. Los valores de corte se basaron en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 pg/ml IFN γ y 20 pg/ml para las citocinas restantes). La producción de citocina específica del antígeno fue definida como una concentración de citocina por encima del nivel de corte y $>2x$ la concentración del medio de control. El donante sano 15 (HD15) muestra un alto nivel de fondo de IL5, pero se aumenta $>2x$ después de la estimulación por antígeno.

Figura 18.

[0047] El cultivo de células T de la biopsia de piel de la agrupación 4 (E6₄₁₋₆₅, E6₅₅₋₈₀, E6₇₁₋₉₅) del donante sano 15 (HD15) consiste en las células T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ específicas de HPV 16. La especificidad del cultivo se evaluó en una tinción de citocina intracelular (ICS) contra la proteína (20 $\mu\text{g/ml}$) y los péptidos (10 $\mu\text{g/ml}$) correspondientes a la prueba de piel inyectada. Notablemente, en 3 de cada 4 biopsias se detectaron las células T específicas de HPV 16 CD8 $^+$.

Ejemplos

Ejemplo 1: Relación entre unión de HLA, digestión proteasómica y tolerancia

[0048] Una expresión de superficie modesta de ciertos péptidos restringidos por MHC de clase I se puede conseguir mediante diferentes mecanismos, no excluyentes entre sí: 1) disminuir la expresión o disminuir la rotación de las proteínas en la célula dando como resultado la generación de números insuficientes de epítomos que permiten el reconocimiento por CTL (Vierboom MP *et al.*), 2) péptidos con sólo una capacidad de unión débil a MHC pueden perder la competición ante péptidos con mejores propiedades de unión a MHC y como tales se expresan escasamente en la superficie celular y 3) generación proteasómica de epítomos de CTL pueden ser insuficiente para generar números eficaces de complejos MHC-péptido. Como parte de la regulación celular normal, la proteína p53 está dirigida a la degradación mediada por proteasoma y, por lo tanto, una escasez de proteína entrando en el proteasoma no es probable que desempeñe un papel importante en el escape de selección negativa. Por lo tanto, hemos analizado la capacidad de unión de péptidos derivados de p53 al igual que la capacidad de inmunoproteasomas y proteasomas domésticos para generar estos péptidos *in vitro*.

Resultados y discusión

5 [0049] De un conjunto grande de péptidos que se seleccionaron sobre la base de la presencia de los llamados residuos de anclaje principales para HLA-A*0101, HLA-A*0301, HLA-A*1101 y HLA-A*2401, se encontraron 43 péptidos que se unen con una afinidad de intermedia a alta (tabla 1). Estos péptidos y 7 péptidos de unión HLA-A*0201 (Houbiers JG *et al.*, Nijman HW *et al.*, Theobald M *et al.* 1995) se analizaron después *in vitro* tanto para la estabilidad de unión (van der Burd SH *et al.* 1995 and 1996) como para la liberación del C-término exacto por inmunoproteasomas y proteasomas domésticos (Kessler JH *et al.* 2001) (tabla 1). En general, los resultados obtenidos con ambos tipos de proteasomas fueron comparables. Salvo los péptidos p53110-120, p53111-120, p53112-120, y p53113-120 que se unían a HLA-A*0301 y/o HLA-A*1101 y llevaban la misma lisina de C-terminal, no se detectó ninguna disparidad en la generación de epítipo entre los domésticos y los inmunoproteasomas (tabla 1).

15 [0050] Actualmente, se han identificado 5 epítomos de CTL diferentes en p53 (tabla 2). Cuatro de estos epítomos fueron restringidos por HLA-A*0201 y uno por HLA-A*2401. El análisis de unión peptídica reveló que el péptido p53264-272 mostraba afinidad de unión intermedia y el péptido p53149-157 mostraba una capacidad débil para formar complejos estables péptido-HLA-A*0201, los otros 4 péptidos mostraron una unión buena y estable a sus moléculas HLA de restricción. De manera interesante, el análisis de escisión proteasómica de los péptidos precursores de 30 residuos de largo demostró que sólo dos (p53149-157 y p53187-197) de estos cinco péptidos fueron eficazmente generados tanto por los domésticos como por los inmunoproteasomas (Figura 1). Para el péptido p53264-272 un fragmento que corresponde a la parte después de la escisión de C-terminal se encontró después de 4 horas de digestión, pero el péptido en sí o los precursores extendidos de forma N-terminal no se detectaron (Figura 1). Recientemente, se ha demostrado que los péptidos precursores podrían ser detectados después de digestión *in vitro* por los proteasomas 20S, sin embargo en pequeñas cantidades (Theobald M *et al.* 1998). Tomados en conjunto, hay dos epítomos p5365-73 y p53125-134 que muestran buena capacidad de unión pero no son o son ineficazmente procesados por los proteasomas 20S, mientras que un tercer péptido (p53149-157) es bien procesado por ambos tipos de proteasomas pero demuestra una capacidad débil para formar complejos estables péptido-HLA. Además, p53264-272 se une con afinidad intermedia a HLA-A*0201 pero no es bien procesado por los proteasomas (tabla 2). Muy probablemente, el número de complejos MHC-péptido formados por estos péptidos en la superficie de las APC tímicas es insuficiente para eliminar los CTL específicos de p53 correspondientes, que permiten a estas células egresar a la periferia. El péptido (p53187-197) que muestra buena capacidad de unión a HLA-A*0201 forma complejos péptido-HLA estables y es bien generado tanto por inmunoproteasomas como por proteasomas domésticos (tabla 2) tolerancia de células T inducida (Theobald M *et al.* 1997), como se esperaba. Teniendo esto en cuenta, será interesante averiguar si los otros péptidos procesados ineficazmente, presentados en la tabla 1, que se unen a HLA-A*0101, HLA-A*0301, HLA-A*110 o HLA-A*2401, forman epítomos de CTL genuinos.

40 [0051] Recientemente hemos informado sobre la identificación de epítomos de CTL en el autoantígeno PRAME asociado al cáncer (Kessler JH *et al.* 2001). La comparación de la capacidad de unión y la liberación del C-término por proteasomas de p53 y péptidos derivados de PRAME revela que los péptidos PRAME son bien procesados mientras que los epítomos de CTL derivados de p53 no lo son (tabla 2). PRAME se expresa en una variedad de tumores, testículos y, a niveles bajos, en el endometrio normal, pero no se expresa en el timo y como resultado los CTL específicos de PRAME no se eliminan en el timo. Todos estos datos sugieren que la combinación de unión estable al péptido y liberación proteasómica de C-terminales exactos puede llevar a una predicción precisa de epítomos de CTL para los que CTL estará disponible (p. ej. antígenos víricos, antígenos tumorales tales como PRAME) mientras que para antígenos de expresión ubicua tales como p53 puede revelar para cuales existirá tolerancia de péptidos.

50 [0052] Se ha establecido bien ahora que los epítomos de CTL se pueden generar mediante rutas de procesamiento alternativas (Benham AM *et al.*, Glas R *et al.*, Geier E *et al.*, Reimann J *et al.*) y que esto produce moléculas de HLA de clase I que contienen péptidos con diversos carboxi terminales y a partir de proteínas dispersas en toda la célula (Luckei CJ *et al.* 1998). Una amplia variedad de tumores muestra niveles de expresión mejorados de p53, debido a las mutaciones en el gen p53 u otros genes de la ruta reguladora de p53, como resultado de una digestión proteasómica disminuida (Honda R *et al.*). De manera interesante, la expresión del epítomo dominante de CTL de matriz de gripe restringido por HLA-A*0201 se mejora cuando las células se tratan con inhibidores de proteasoma (Luckey CJ *et al.* 1998). Además, se demostró que el 50-60% de los niveles de expresión normales de las moléculas de HLA A*0201 reaparecían en superficie a pesar de la presencia de inhibidores de proteasoma (Luckey CJ *et al.* 2001). Esto sugiere que es más probable que las proteínas que no son bien degradadas/son menos degradadas por los proteasomas se procesen de otras formas. Esto puede significar que la sobreexpresión de p53 produce una expresión mejorada de epítomos de CTL (entre otros restringidos por HLA-A*0201) generados mediante otras rutas que no sean el proteasoma (Figura 2). La activación de los CTL específicos de p53 puede ocurrir después de la absorción de p53 derivado del tumor por las APC periféricas. Esto produce la presentación de los péptidos p53 en la ruta de MHC de clase II (van der Brug SH *et al.* 2001 and Tilkin AF *et al.*) y también puede conducir a la presentación en MHC de clase I (Reimann J *et al.*) (figura 2).

Observaciones finales

5 [0053] Recientemente hemos demostrado que la liberación eficaz del C-término exacto de epítomos de CTL putativos presentes en péptidos precursores de 25-30 aminoácidos de largo por proteasomas 20S identificaba con precisión los péptidos procesados naturales para los que los CTL están presentes en la sangre periférica (Kessler JH *et al.* 2001).
 10 Respecto a los antígenos de expresión ubicua que, como parte de su regulación normal, son degradados por el proteasoma, debe hacerse algunas diferenciaciones necesarias. Una combinación de una alta capacidad para formar complejos estables MHC-péptido y una liberación eficaz por digestión proteasómica hace que un péptido induzca tolerancia. En cambio, los péptidos desfavorecidos por cualquiera de estas dos pueden formar objetivos naturales para los CTL que llegaron a la periferia.

Material y métodos

Péptidos, unión peptídica y ensayo de estabilización

15 [0054] Péptidos de 8-11 residuos de longitud se seleccionaron basados en los residuos de anclaje típico para HLA-A*0101, A*0301, A*1101 y HLA-A*2401 (Rammensee HG *et al.*). La capacidad de los péptidos para enlazar se evaluó en un ensayo de unión celular basado en la competición, tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg SH *et al.* 1995). Los péptidos de referencia marcados con FL se sintetizaron como derivados de Cys (van der Burg SH *et al.* 1995).
 20 Los péptidos de referencia marcados con fluorescencia usados fueron: YLEPAC(FL)AK (HLA-A*0101) y KVFPC(FL)ALINK (HLA-A*1101) (Sette A *et al.*), KVFPC(FL)ALINK (HLA-A*0301) (van der Burg SH *et al.* 1995) y RYLKC(FL)QQLL (A*2401) (Dai LC *et al.*). Las líneas de células B usadas son: CAA (A*0101), EKR (A*0301), BVR (A*1101), VIJF (A*2401). La capacidad de unión relativa de los péptidos se expresa como la concentración peptídica para inhibir 50% (IC₅₀) de la unión del péptido de referencia. La afinidad se categoriza de la siguiente manera: buena IC₅₀ <5µM, intermedia IC₅₀ =5-15µM y baja IC₅₀ >15-50µM. La estabilización peptídica para HLA-A*0201 se realizó tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg SH *et al.*, 1996).
 25 Los péptidos de >50% de los complejos iniciales que se perdieron en 2 horas se consideraron inestables. La estabilidad de otros complejos péptido-HLA se determinó de la siguiente manera. Se llevó a cabo la unión peptídica a 4°C y 20°C y IC₅₀ fueron determinados. Los péptidos estables mostraron IC₅₀ a 20°C que desvió <2 veces del IC₅₀ a 4°C. Los péptidos que mostraron IC₅₀ a 20°C superior a dos veces el IC₅₀ a 4°C pero IC₅₀ <15µM se consideró que enlazan con estabilidad intermedia. Los demás se designaron como unión de péptido inestable.
 30

Digestiones mediadas por proteasoma *in vitro* y espectrometría de masas

35 [0055] Los inmunoproteasomas 20S se purificaron a partir de una línea de células B de ratón (RMA) y una línea de células B-LCL humana (JY) y los proteasomas domésticos 20S se purificaron a partir de la línea de célula tumoral humana (HeLa) como se describe (Kessler JH *et al.* 2001). Para valorar la cinética, se llevaron a cabo digestiones con periodos de incubación diferentes como se indicó. Brevemente, los péptidos con los epítomos de CTL (potenciales) (30 meros, 20 µg) se incubaron con 1 µg de proteasoma purificado a 37°C durante 1 h, 4 h y 24 h en 300 µl de tampón de digestión de proteasoma, se añadió ácido trifluoroacético (30 µl) para detener la digestión y se almacenaron muestras a -20°C antes del análisis de espectrometría de masas. La espectrometría de masas por ionización de electrospray se llevó a cabo en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuádruplo híbrido, un Q-TOF (Micromass), equipado con un interfaz de nanoelectrospray en línea con una velocidad de flujo aproximada de 250 nL/min como se describe (Kessler JH *et al.* 2001).
 40 Los picos en el espectro de masa se buscaron en el péptido precursor digerido utilizando el software Biolynx/proteins (Micromass) suministrado con el espectrómetro de masas. La intensidad de los picos en los espectros de masa se usó para establecer las cantidades relativas de péptidos generados después de la digestión de proteasoma. Las cantidades relativas de los péptidos se dan como un porcentaje de la cantidad total de péptido digerido por el proteasoma en el periodo de incubación indicado. Los sitios de escisión principales se definen como más que > 1% del péptido digerido total en la primera hora.
 45
 50

Ejemplo 2: Estudio de vacunación con los péptidos p53 en pacientes con cáncer ovárico. Resultados inmunológicos de 7 pacientes vacunados

Objetivos de la prueba

2.1 Objetivos Generales

Objetivo primario:

60 [0056]

- Evaluar la seguridad y la tolerabilidad de una vacuna de "péptido largo" específica de p53 en combinación con un adyuvante definido con un modo de acción conocido (Montanide ISA) (parte de fase I del estudio)
 - Evaluar la inmunogenicidad de una vacuna de "péptido largo" específica de p53 en combinación con un adyuvante definido con un modo de acción conocido (Montanide ISA) (parte de fase II del estudio)
- 65

2.2 Criterios de evaluación

[0057] El criterio de evaluación primario del estudio de fase I es seguridad y tolerabilidad

[0058] El criterio de evaluación primario del estudio de fase II es inmunogenicidad (respuestas de células T específicas de p53)

2.3. Diseño del ensayo

[0059] Se llevó a cabo un estudio de vacunación de fase I / II en pacientes con cáncer ovárico, usando 10 péptidos p53 solapantes en combinación con un adyuvante con una capacidad de activación de célula dendrítica prolongada (Montanide-ISA-51). La fase de diagrama de flujo se da en la figura 3.

2.4. Criterios para selección de pacientes

2.4.1. Criterios de inclusión

[0060]

- Carcinoma ovárico epitelial probado histológico
- Al menos 4 semanas después de la terminación del tratamiento de primera línea (cirugía de citorreducción y quimioterapia a base de platino)
- Aumento de los niveles de suero CA125 después del tratamiento de primera línea y enfermedad no medible según los criterios RECIST (criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos) (Terasse P *et al.*).
- Aumento de los niveles de suero CA125 después del tratamiento de primera línea con enfermedad medible según los criterios RECIST (criterio de evaluación de respuesta en tumores sólidos) (Terasse P *et al.*) pero sin querer recibir, o de otra manera, que no se ajustan para recibir quimioterapia de segunda línea.

Un aumento en el CA125 se conoce como un marcador de pronóstico para el cáncer ovárico (Ferrandina G *et al.*, Goonewardene *et al.* and Rustin *et al.*).

- 18 años de edad o mayor, una esperanza de vida prevista de al menos 3 meses.
- Ausencia de cualquier condición psicológica, familiar, sociológica o geográfica que pueda obstaculizar potencialmente el cumplimiento del protocolo del estudio y el calendario de seguimiento. Esas condiciones se deben discutir con el paciente antes de la inscripción en el ensayo.
- Antes de la inscripción/aleatorización del paciente, se debe dar consentimiento informado por escrito de acuerdo con las buenas prácticas clínicas (GCP) y regulaciones nacionales/locales.
- Estado de rendimiento de 0 a 2 (escala WHO)
- Función hepática, renal y de médula ósea adecuada, tal y como se define:
- INR < 1, 5; WBC > 3, 0 x 10⁹/L; trombocitos > 100 x 10⁹/L; hemoglobina > 6, 0 mmol/l.

2.4.2. Criterios de exclusión

[0061]

- Embarazo y/o lactancia.
- Otras neoplasias (anteriores o actuales), excepto carcinoma de célula escamosa o basal de la piel.
- Dosis alta de agentes inmunosupresores.
- Terapia previa con un modificador de la respuesta biológica.
- Hipertensión descontrolada, angina de pecho inestable, arritmias que requieren tratamiento o infarto de miocardio en los 3 meses anteriores.
- Insuficiencia cardíaca congestiva descontrolada o miocardiopatía severa.
- Señales o síntomas de metástasis de CNS.
- Trastornos psiquiátricos o neurológicos severos.

2.4.3 Criterios de retirada

[0062]

- Enfermedad progresiva que necesita otras formas de terapia anti-tumoral.
- Toxicidad inaceptable (gr 3-4 toxicidad debido a vacunación que persiste durante más de 2 semanas).
- Denegación del paciente.
- Perdido para seguimiento

2.5. Regímenes terapéuticos, toxicidad prevista.

[0063] Muchas respuestas de Th y CTL reconocen péptidos en los residuos 70-251 de la proteína p53. Por lo tanto, la vacuna abarca esta región de la proteína p53. Los péptidos usados se dan en la tabla 3. Los péptidos de grado clínico para vacunación se preparan en el Peptide Laboratory, sección IGFL, departamento de Clinical Pharmacy and Toxicology, Leiden University Medical Center. Los detalles técnicos sobre los procesos de producción o el producto se describen en el IMPD pertinente. Los péptidos p53 son 9 30-meros y 1 25-meros superponiéndose entre sí por 15 residuos (véase la tabla 3). Este conjunto de 10 péptidos se espera que contenga los epítomos de CTL posibles para todos los alelos de clase I al igual que los epítomos T auxiliares posibles para todos los alelos clase II. Montanide-ISA-51 se usa como un adyuvante: Montanide ISA 51 o adyuvante de Freund purificado incompleto está compuesto de 10±2%(p/p) oleato de manida (Montanide 80) en 90±2%(p/p) Drakeol 6VR, un aceite mineral de grado farmacéutico. Montanide ISA 51 se comercializa como un adyuvante estéril libre de pirógeno para uso humano por Seppic (París, Francia). La monitorización a largo plazo (35 años) de 18.000 pacientes - que recibieron la vacuna adyuvada de Freund incompleta - y 22.000 controles no mostró una diferencia significativa en el índice de mortalidad debido al cáncer: 2,18% y 2,43% para vacunas con y sin adyuvante, respectivamente.

15 2.6. Dosificación y descripción del tratamiento

[0064] Se lleva a cabo un estudio de vacunación de fase I al principio en 5 pacientes con niveles de CA125 en aumento. La dosis de péptidos consiste en 300 µg/péptido. Esta dosis se elige sobre la base de ensayos clínicos previos de vacunación con péptidos (Rosenberg SA *et al.*, Hersey P *et al.*) y tiene su origen en el ensayo de péptido largo E6/E7 de HPV de fase I/II realizado en LUMC (datos no publicados). La vacunación se realiza 4 veces con un intervalo de 3 semanas con evaluación inmunológica y clínica entremedias. La vacuna se inyecta por vía subcutánea profunda, en cuatro sitios diferentes, en una dosis de 300 µg por péptido en DMSO/20mM de tampón de fosfato pH 7,5/adyuvante Montanide ISA-51. La primera inyección es en la parte superior del brazo derecho, la segunda en la parte superior del brazo izquierdo, la tercera en la parte superior de la pierna izquierda y la cuarta y última en la parte superior de la pierna derecha. Antes de la vacunación, las células mononucleares de la sangre (PBMC; almacenadas en 10 % de DMSO en nitrógeno líquido) y el suero se aíslan para evaluar el estado inmunológico de línea base hacia p53 antes de la vacunación. El efecto de la vacunación en la inmunidad de p53 se evalúa en muestras de PBMC y de suero tomadas 2 semanas después de la segunda y última vacunación (de refuerzo). Se miden las respuestas de célula T contra los péptidos individuales en la vacuna. Además, se toma una biopsia de piel de los cuatro sitios de vacunación, 2 semanas después de la vacunación, para aislar las células T de infiltración. Estas células T se evalúan con respecto a su especificidad y polarización. Si no se produce ningún grado 3 o 4 de toxicidad en ninguno de los 5 pacientes incluidos en el estudio de fase I se inicia el estudio de vacunación de fase II. Si un paciente experimenta un grado 3 o 4 de toxicidad inesperada, el número de pacientes en la fase I se aumentará a 10. Debe observarse que en los estudios de vacunación con péptido precedentes se produjo una toxicidad menor o ninguna. Debido a la buena condición general relativa que normalmente se encuentra en estos pacientes, este grupo de pacientes es ideal para probar la inmunogenicidad de la vacuna en un ensayo de fase II tradicional. Al principio se introdujeron 14 pacientes en este estudio de fase II. Se comparan las respuestas de células T específicas de P53 antes y después de la vacunación. Si no se encuentran respondedores (respuesta definida de forma arbitraria como > 30% de aumento de respuestas de células T específicas de p53) entre los primeros 19 pacientes, el estudio se interrumpe debido a la aparente falta de inmunogenicidad de la vacuna. En caso de respuestas, el número total de pacientes del estudio depende del número de respuestas observadas. La vacunación en el estudio de fase I / II se inicia 3 meses después de la última quimioterapia de primera línea y se continúa durante un total de 4 vacunaciones distanciadas por 3 semanas. Si la vacunación de fase II no muestra ningún resultado en términos de respuestas de células T positivas, este método se interrumpirá.

45 2.7. Cuidado de apoyo en caso de toxicidad

[0065] En caso de toxicidad cutánea, se permiten antihistaminas sistémicas o esteroides tópicos. No se permite que los pacientes reciban factores de crecimiento para mielosupresión. Los analgésicos son están permitidos.

50 2.8. Terapia concomitante

[0066] No se permite otra quimioterapia, inmunoterapia, agentes hormonales (excepto esteroides tópicos para erupciones cutáneas), terapia de radiación, fármacos experimentales, radioterapia y/o cirugía mientras los pacientes están en el estudio. Cualquier progresión de la enfermedad que precise otras formas de terapia anti-tumoral es causa para la retirada del paciente del estudio. No se permiten los corticoesteroides sistémicos durante el estudio. Los pacientes deben recibir cuidado de apoyo completo.

2.9 Evaluación clínica, pruebas de laboratorio y seguimiento

60 2.9.1 Antes del inicio del tratamiento

[0067] Menos de 14 días antes de la inscripción en el ensayo se requiere el registro de los siguientes parámetros:

- Historia médica pertinente, incluyendo fecha de primer diagnóstico, tipo histológico, enfermedades concurrentes y cualquier uso concurrente de medicación.
- Examen físico, incluyendo rendimiento WHO, altura, peso, constantes vitales, síntomas clínicos de línea de base.

- Electrocardiograma (ECG) y análisis de orina para excluir una cistitis asintomática.
- Hematología: hemoglobina, trombocitos, leucocitos.
- Bioquímica: creatinina de suero, INR, bilirrubina, ASAT, ALAT, LDH, INR.

5 Cuando el paciente se registra en la prueba, el tratamiento de estudio comienza 7 días después de la inclusión.

2.9.2. Durante el tratamiento

10 [0068] Menos de 28 días antes del inicio de la vacunación (300 ml), durante la vacunación (3 x 50 ml) y
aproximadamente 14 días después de la última vacunación (300 ml) se recogen PBMC para medir respuestas de célula
T específica de p53. Dos semanas después de la última vacunación se toma una biopsia por perforación de los cuatro
sitios de vacunación. Inmediatamente antes de la administración de cada vacunación, de 10 a 14 días después de la
última administración de la vacuna, se llevan a cabo los siguientes exámenes: (1) examen físico, incluyendo evaluación
15 neurológica, constantes vitales, saturación de O₂ y ECG antes y tres-cuatro horas después de cada vacunación; (2)
evaluación de todos eventos adversos (el peor grado de eventos que ocurre durante esta vacunación debería
registrarse), así como peso y rendimiento WHO; (3) hematología y bioquímica, incluyendo hemoglobina, trombocitos,
leucocitos, creatinina de suero, INR, bilirrubina, ASAT, ALAT, LDH e INR; (4) cualquier medicación concomitante.

2.9.3. Después del final del tratamiento (seguimiento)

20 [0069] Si el paciente no ha progresado después de la vacunación, la extensión de la enfermedad se registra cada 3
meses siguiendo los mismos procedimientos que durante el tratamiento. En caso de progresión, se hace un seguimiento
de los pacientes para supervivencia cada 3 meses. El comienzo de cualquier forma de otro tratamiento anti-tumoral se
registra. La tabla 4 resume toda la vacunación y el proceso de análisis.

25 [0070] La evaluación de toxicidad se registra durante la vacunación. Hematología y bioquímica, incluyendo
hemoglobina, trombocitos, leucocitos, creatinina de suero, INR, bilirrubina, ASAT, ALAT, LDH e INR.

2.10. Inmunovigilancia

30 [0071] En cinco momentos temporales diferentes durante el estudio se recogen PBMC: antes de la vacunación (300 ml),
después de cada vacunación (3 x 50 ml) y después de la última vacunación (300 ml). PBMC y suero se aíslan. La
evaluación de las respuestas de célula T específica de p53 en sujetos vacunados del estudio de fase I/II se realiza de la
siguiente manera:

35 Las respuestas positivas de célula T colaboradora CD4⁺ después de la vacunación se definen por:

- 40 a) Significativamente aumentadas (una reacción inducida por la vacunación se considera positiva
cuando el índice de proliferación de muestras de post-vacunación es al menos dos veces tan alto
como el índice de proliferación de muestras de pre-vacunación y el índice de proliferación de muestras
de post-vacunación debería ser al menos 2 y/o b) significativamente aumentada producción de IFN γ
de PBMC, que se han estimulado dos veces con péptido *in vitro*, contra péptidos p53 como medidos
45 por ELISA tras 1 día de cultivo, y/o c) un porcentaje significativamente aumentado de PBMC CD4⁺ que
producen IFN γ en 6 horas de estimulación *in vitro* con péptidos p53 en presencia de brefeldina A,
utilizando tinción FACS intracelular tricolor con anticuerpos contra CD4, el marcador de activación
temprana CD69 e IFN γ , y/o d) un número significativamente aumentado de células T específicas del
antígeno que producen IFN γ , IL-4 o IL-10 como se miden en el ensayo de ELISPOT en el que una
50 frecuencia de $\geq 1/10.000$ PBMC se considera positiva y un aumento de dos veces en el número de
puntos entre la pre-vacunación y la post-vacunación se elige como una respuesta positiva a la vacuna.

2.11. Consideración estadística

2.11.2. Análisis

55 [0072] Los pacientes que no cumplen los criterios de inclusión no son elegibles. Los pacientes no evaluados debido a
retirada o por otros motivos (p. ej. denegación de los pacientes, perdido para seguimiento, infracción del protocolo) se
señalan claramente. Es necesario introducir un total de 19 pacientes completos evaluables en el estudio, con un máximo
de 20% de abandono, este número puede aumentar a 23 pacientes. La respuesta inmune específica para p53 de la
vacuna medida antes y después de las vacunaciones se comparará por la prueba Sign (2-caras, 5% nivel de
60 significancia). Se estimarán los índices de respuesta e índices de toxicidad de grado 3-4 encontrados durante la
vacunación y se calcularán los límites de confianza exactos al 95%. El tiempo para la progresión se computará por
curvas Kaplan-Meier y se comparará con un grupo de control histórico mediante la prueba de rango logarítmico.

2.12. Investigación traslacional

65 [0073] Se realizan los siguientes análisis:

La respuesta de células T específicas de p53 se analiza usando PBMC recientes aisladas para proliferación específica de p53. Las citocinas (IFN γ , TNF α , IL-10, IL-5, IL-4, IL-2) que se producen específicamente en esta estimulación antigénica se evalúan por el Cytokine Bead Array (según el protocolo del fabricante Becton-Dickinson). Se evalúan PBMC recién aisladas antes, durante y después de la cuarta vacunación. Las respuestas se clasifican como Th1 (IFN γ , TNF α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), Th0 (IFN γ , IL-4, IL-5, IL-10) o debilitados con respecto a la producción de citocina (sin producción).

La presencia de grandes números de células T específicas de p53 en la sangre periférica puede no llevar en todos los casos a la migración de estas células T al sitio de inyección de la vacuna, a pesar de la presencia del antígeno peptídico. El éxito o el fracaso de las células T para migrar en la piel puede ser un reflejo de lo que ocurre en el sitio de la enfermedad. Por lo tanto, 2 semanas después de la última vacunación se toma una biopsia de los cuatro sitios de vacunación. Las células T que han infiltrado el sitio de vacunación se aíslan de la biopsia. La especificidad, polarización y tipo de las células T de infiltración se evalúa por Cytokine Bead Array (protocolo del fabricante) y por FACS.

15 2.13. Resultados

2.13.1. Ensayo de proliferación

[0074] La figura 4 representa el ensayo de proliferación realizado como se ha indicado. Demuestra que la vacuna que contiene péptidos que cubren p5370-248 es capaz de inducir una respuesta inmune en la mayoría de los pacientes. Claramente, los péptidos derivados de la región p53102-248 inducen de forma más eficaz una respuesta de célula T después de la vacunación, como se midió por proliferación después de la estimulación *in vitro* con agrupaciones de péptidos de vacuna (Fig. 4b-d). La primera agrupación de péptidos de vacuna, que cubre p5370-101, induce difícilmente la proliferación de células T después de la estimulación *in vitro* (Fig. 4a). Las células T aisladas de pacientes vacunados también se estimularon con péptidos que no estaban presentes en la vacuna. Estos péptidos en cuestión cubren la región N-terminal y C-terminal de la proteína p53. Como se muestra en la fig. 4f, la región N-terminal es capaz de inducir una respuesta de célula T en algunos pacientes con cáncer ovárico. Esto podría indicar que la vacuna es muy eficaz en inducción de células T asesinas, lo que implicaría eventualmente la extensión del epítipo. Por otro lado, la región C-terminal de p53 en estos pacientes no induce una respuesta de célula T mensurable.

30 2.13.2. ELISPOT de IFN γ

[0075] Se consideró la vacuna como inductora de una respuesta positiva si:

- 35 - el número medio de puntos - (número medio de puntos en el medio +2SD)>10 puntos
- SI post-vacunación \geq dos veces el SI de pre-vacunación. Los resultados se representan en la figura 6. Este ensayo muestra resultados similares en comparación con el ensayo de proliferación: los péptidos de vacuna derivados de la región p53102-248 han inducido células T específicas para epítipos contenidos en esa área (Fig. 6b-d), mientras que los péptidos derivados de la región p5370-101 no (Fig. 6a). Por otra parte, este ensayo además confirma que el principio de la extensión del epítipo puede tener lugar en algunos pacientes (Fig. 6f).

Ejemplo 3: Estudio de vacunación con péptidos p53 en pacientes con cáncer colorectal. Resultados inmunológicos en 2 pacientes vacunados

45 [0076] El principio del estudio es similar al ejemplo 2 (véase también la figura 3). Las diferencias son que en este estudio los pacientes sólo recibieron dos vacunaciones (en vez de cuatro).

[0077] La capacidad proliferativa específica de p53 (figura 5A y C) y la producción de citocina (figura 5B y D) de 2 pacientes masculinos con cáncer colorectal se muestra antes y después de la vacunación con vacuna de péptido largo p53. Los pacientes fueron vacunados dos veces con péptidos p53 solapantes que cubren la secuencia de aminoácidos 70-248 (indicados por las agrupaciones de 2 péptidos: V70-115, V102-155, V 142-203, V190-248). También se evaluaron las PBMC de los pacientes contra la región N-terminal de p53 (aa 1-78) y la región C-terminal de p53 (aa 241-393). Véase que, en ambos casos, la vacunación produce la activación de la reactividad de las células T contra la región C-terminal (fuera de la vacuna) también, indicativo de extensión del epítipo de la respuesta inmune tras la vacunación. La proliferación específica de p53 está asociada a la producción de IFN γ , IL-10 e IL-5, como medido por Cytokine Bead Array (CBA).

Ejemplo 4: Estudio de vacunación con péptidos p53 en pacientes con cáncer colorectal. Respuestas inmunológicas de en 9 pacientes vacunados

60 [0078] La tabla 6 muestra una visión de conjunto de respuestas de célula T específica de p53 en pacientes con cáncer colorectal que han sido vacunados dos veces con la vacuna SLP p53. En conclusión, todos los pacientes exhibieron una respuesta de célula T específica de p53. Los péptidos que parecen ser los más inmunogénicos se encuentran en la parte más N-terminal de la proteína p53 como están presentes en la vacuna (aa 190-248): 8 de los 9 pacientes respondió contra estos péptidos. No obstante, también los péptidos derivados de aa 102-155 y 142-203 son capaces de inducir respuestas específicas de p53 (6 de los 9 pacientes responden a uno o más péptidos derivados de estas

regiones). Claramente, la parte C-terminal de p53 parece ser menos inmunogénica. De manera importante, los péptidos derivados de la parte N-terminal de p53 que no estaban presentes en la vacuna SLP p53 todavía fueron capaces de inducir una respuesta de célula T *in vitro*. Este fenómeno se conoce como extensión de antígeno y ocurre a través de la estimulación de células T por DC que han absorbido p53 derivado del tumor liberado por las células tumorales moribundas. Como esto se observa después de la vacunación, sólo es indicativo de una respuesta eficaz anti-tumoral inducida por la vacuna.

[0079] Para determinar si el vacuna SLP p53 es capaz de inducir células T específicas de p53 que puedan migrar a áreas en las que el antígeno p53 esté presentado, se aislaron los sitios de vacuna y se expandieron células T que infiltran la piel. La figura 8 muestra los resultados de 1 paciente con cáncer colorectal. Las células T han migrado al sitio de vacuna y mayoritariamente son específicas para péptidos de vacuna 5-10 (aa 142-248). Además, también los péptidos que codifican la parte N-terminal de la proteína p53 (aa 241-393) pueden ser reconocidos por las células T de infiltración, mientras que esta parte de la proteína no está presente en la vacuna SLP p53. Nuevamente evidencia de extensión del antígeno después de la vacunación eficaz. De manera importante, los resultados también muestran que las células T inducidas por vacuna que han migrado al área de presentación del antígeno pueden también reconocer células que han procesado la proteína p53 entera. Esto indica que la ruta de procesamiento natural procesa proteína p53 en epítomos que pueden ser reconocidos por las células T inducidas por vacuna. Esto implica que las células tumorales que también procesan la proteína p53 entera de manera natural pueden también ser reconocidas y lisadas por estas células T.

[0080] Para determinar si los pacientes con carcinoma de colon vacunados también fueron capaces de inducir una respuesta de célula T de memoria, se evaluaron PBMC aisladas antes y después de las 2 vacunaciones y después de 6 o 9 meses para la presencia de células T específicas de p53. En la figura 9 se muestra que las respuestas de células T específicas de p53 que no estaban presentes antes de la vacunación y que se indujeron después de las 2 vacunaciones estaban todavía presentes en la circulación de los pacientes evaluados 6-9 meses después de la vacunación, lo que es indicativo de respuestas de células T de memoria específicas de p53. Por otra parte, ambos pacientes mostraron una respuesta a aminoácidos 241-393 de la proteína p53 después de las 2 vacunaciones e incluso a los 6 meses del seguimiento (#1), lo que indica que las células T inducidas como resultado de la extensión del epítomo también estaban presentes todavía.

Ejemplo 5: Estudio de vacunación con péptidos p53 en pacientes con cáncer ovárico. Resultados inmunológicos en todas las pacientes vacunadas (18)

[0081] La tabla 7 resume las respuestas inmunológicas y clínicas de todas las pacientes con cáncer ovárico tratadas con la vacuna SLP p53.

Respuestas inmunológicas

[0082] En el 100% de las pacientes con cáncer ovárico que recibieron las cuatro inmunizaciones (N=18), respuestas específicas de p53 inducidas por la vacuna contra los péptidos de vacuna estaban presentes en dos o más momentos temporales (I-IV) después de la inmunización según se midió por ELISPOT de IFN γ (tabla 8). Las respuestas específicas de p53 inducidas por la vacuna fueron dirigidas contra al menos dos de las agrupaciones de péptidos de la vacuna en todas las pacientes con cáncer ovárico. Después de cuatro inmunizaciones, las células T circulantes específicas de p53 que secretan IFN γ se pudieron detectar en 61,1% (11/18) de las pacientes. Las respuestas proliferativas específicas de p53 inducidas por la vacuna contra los péptidos de vacuna se observaron en 82,4% (14/17) de las pacientes con cáncer ovárico (tabla 9). Como se representa en la figura 12, las respuestas proliferativas contra los péptidos de vacuna se podían demostrar aún 9-12 meses después de la última inmunización, aunque las pacientes se habían tratado con quimioterapia desde entonces. Además, también en las pacientes con cáncer ovárico, respuestas específicas de p53 contra la primera (aa 1-78) y la última (aa 241-393) parte de la proteína p53 no cubierta por los péptidos de vacuna, se observaron en 11, 8% (2/17) y 23, 5% (4/17) de las pacientes, respectivamente, después de las cuatro inmunizaciones (tabla 9). La figura 10 ilustra la capacidad proliferativa de PBMC en respuesta a la estimulación *ex vivo* con péptidos de vacuna única según se ha analizado en 7 pacientes con cáncer ovárico después de cuatro inmunizaciones. Las respuestas fueron observadas para todos los péptidos, salvo el péptido de vacuna 1 (aa70-99). Para analizar la capacidad de las células T específicas de p53 para migrar a sitios en los que antígeno p53 se presenta, se realizó un ensayo de proliferación con linfocitos cultivados de biopsias de piel tomadas en los cuatro sitios de inyección (n=17). Números insuficientes de linfocitos se pudieron cultivar a partir de las biopsias de piel de dos pacientes (P15 y P20). Se observaron respuestas específicas de p53 en los linfocitos cultivados de biopsias de piel en 52, 9% (9/17) de las pacientes. La mayoría de las respuestas se observaron contra el péptido de vacuna p8-p10 (aa 190-248) (figura 11). De manera importante, todas las pacientes con respuestas específicas de p53 en linfocitos cultivados de biopsias de piel mostraron también respuestas específicas de p53 inducidas por la vacuna en PBMC según se analizó por ensayo de proliferación (tabla 7), aunque las respuestas no siempre se dirigían contra los mismos epítomos. Autoanticuerpos P53 estaban presentes en 40% (8/20) de las pacientes antes de la inmunización. Después de una o más inmunizaciones, los autoanticuerpos P53 estaban presentes en 45% (9/20) de las pacientes. Se detectó un aumento inducido por la vacuna en el título de autoanticuerpos p53 en 15% (3/20) de las pacientes (tabla 7).

Respuestas clínicas

[0083] Debido a la enfermedad rápidamente progresiva, dos pacientes recibieron sólo dos inmunizaciones (P04, P12). Las respuestas clínicas del resto de las 18 pacientes con cáncer ovárico se evaluaron basadas en los niveles de CA-125 y evaluación de escáneres TC según los criterios RECIST y GCIG (tabla 10). Una paciente tuvo una respuesta parcial según se midió por CA-125 (P05) y seis pacientes tuvieron niveles de CA-125 estables (P02, P03, P06, P09, P17, P21, P23) (figura 13). Dos de estas pacientes (11, 1%) también tuvieron enfermedad estable en el TAC (P17, P23). En ambas pacientes, las respuestas específicas de p53 inducidas por la vacuna fueron detectadas en PBMC. P23 también mostró respuestas específicas de p53 en linfocitos cultivados de la biopsia de piel. Las otras pacientes (16/18, 88,9%) se clasificaron como pacientes que tenían enfermedad progresiva. Todas las pacientes con enfermedad progresiva habían desarrollado lesiones nuevas desde su último TAC.

Ejemplo 6: Demostración de la ventaja de la administración intradérmica de un péptido de vacuna

[0084] En este ejemplo, los péptidos derivados de una proteína HPV se usan en una vacuna intradérmica. Las ventajas de una vacuna intradérmica como se demuestra en este documento son generalizables para cualquier otro péptido, entre otros los derivados de una proteína que expresa de forma ubicua autoantígenos y conocida por estar asociada al cáncer, tal como p53.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

[0085] Un estudio piloto de corte transversal para analizar respuestas de células T específicas de E2, E6 y E7 de HPV 16, según se midió por inyección intradérmica de agrupaciones de péptidos de HPV 16 de grado clínico en la parte superior del brazo, se realizó en pacientes con trastornos relacionados con el HPV del cérvix y en individuos sanos. Dado que una reacción tipo hipersensibilidad retardada representa una respuesta de las células T de memoria, no hubo ningún prerrequisito para positividad de HPV 16 en el momento del análisis.

Sujetos

[0086] Un grupo de diez individuos sanos (HD) participó en este estudio después de dar su consentimiento informado. El grupo de individuos sanos presentaba una edad media de 31 años (intervalo, 20-51 años) y estaba compuesto por 80% de mujeres y 20% de hombres. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron de todos los sujetos inmediatamente antes de la administración de la prueba de piel. La aparición tardía de pruebas de piel positivas en individuos sanos dio como resultado el aislamiento de una segunda muestra de sangre de 11 de los 19 voluntarios sanos. El diseño del estudio fue aprobado por el Medical Ethical Committee del Leiden University Medical Centre.

Prueba de piel DTH

[0087] Las pruebas de piel, basadas en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), se pueden usar como un método simple y sensible para medición *in vivo* de respuestas inmunológicas celulares específicas de HPV (Hopfl R *et al.*, 2000; Hopfl R *et al.*, 1991). Las preparaciones de la prueba de piel consistieron en 8 agrupaciones de péptidos sintéticos largos de grado clínico abarcando toda la proteína E6 y E7 de HPV 16 y la mayoría de las regiones inmunogénicas de la proteína E2 de HPV 16 (de Jong A *et al.*, 2004). Estos péptidos de grado clínico se produjeron en la instalación GMP interdepartamental del LUMC. Cada agrupación de la prueba de piel consistía en 2 o 3 péptidos sintéticos, indicados por el primer y el último aminoácido de la región de la proteína cubierta por los péptidos. *Agrupación 1*: E2₃₁₋₆₀, E2₄₆₋₇₅, *Agrupación 2*: E2₃₀₁₋₃₃₀, E2₃₁₆₋₃₄₅, *Agrupación 3*: E6₁₋₃₁, E6₁₉₋₅₀, *Agrupación 4*: E6₄₁₋₆₅, E6₅₅₋₈₀, E6₇₁₋₉₅, *Agrupación 5*: E6₈₅₋₁₀₉, E6₉₁₋₁₂₂, *Agrupación 6*: E6₁₀₉₋₁₄₀, E6₁₂₇₋₁₅₈, *Agrupación 7*: E7₁₋₃₅, E7₂₂₋₅₆, *Agrupación 8*: E7₄₃₋₇₇, E7₆₄₋₉₈. La secuencia de E2, E6 y E7 de HPV 16 está respectivamente representada por SEC ID n°: 22, 23 y 24. Por agrupación de péptidos, 0,05 ml de 0,2 mg/ml de péptidos en 16% de DMSO en 20 mM de tampón de fosfato isotónico (10 µg/péptido) se inyectó por vía intracutánea. Las agrupaciones de péptidos y un control negativo (disolvente sólo) se inyectaron separadamente en los sitios de prueba de piel individuales de la parte superior del brazo. Los sitios de prueba de piel se inspeccionaron al menos tres veces, a las 72 horas y a los 7 días después de la inyección (Hopfl R *et al.* 2000, 2001) de los péptidos y a las 3 semanas después del primer informe de una reacción cutánea muy tardía en uno de los primeros sujetos sanos. Las reacciones se consideraron positivas cuando aparecieron pápulas mayores de 2 mm de diámetro, no antes de 2 días después de la inyección. De los sitios de reacción cutánea positiva se obtuvieron biopsias por perforación (4 mm), se cortaron en pequeñas piezas y se cultivaron en IMDM conteniendo 10% de suero humano AB, 10 % de TCGF y 5 ng/ml de IL7 e IL15 para permitir la migración de linfocitos fuera del tejido de piel. Después de 2 a 4 semanas de cultivo, las células T expandidas se cosecharon y evaluaron para su reactividad específica de HPV.

Antígeno para ensayos inmunológicos *in vitro*

[0088] Un conjunto de péptidos, similares a los péptidos usados en la prueba de piel, se usó para ensayos de estimulación de células T y ensayos ELISPOT de IFN γ . Los cuatro péptidos E2 de HPV 16 consistían en péptidos de 30-meros solapando 15 residuos, E6 de HPV 16 consistían en 32-meros y E7 de HPV 16 en 35-meros, ambos solapando 14 residuos. Los péptidos se sintetizaron y disolvieron tal y como se ha descrito anteriormente (van der Burg SH *et al.*, 1999). En particular, en los ensayos de ELISPOT de IFN γ las agrupaciones de péptidos 4 y 5 difirieron ligeramente de las agrupaciones de péptidos usadas en la prueba de piel, la agrupación 4 contenía los péptidos E6₃₇₋₆₈, E6₅₅₋₈₆, E6₇₃₋₁₀₄ y la agrupación 5 comprendía los péptidos E6₇₃₋₁₀₄, E6₉₁₋₁₂₂. La mezcla de respuesta de memoria (MRM 50x), que consiste en una mezcla de toxoide tétanico (0,75 *Limus flocculentus*/ml; National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, Países Bajos), *Mycobacterium tuberculosis* sometida a ultrasonido (5 μ g/ml; generosamente donada por el Dr. P. Klatser, Royal Tropical Institute, Ámsterdam, Países Bajos) y *Candida albicans* (0,15mg/ml, HAL Allergen Lab., Haarlem, Países Bajos) se usó como control positivo. Se produjeron proteínas E2, E6 y E7 de HPV 16 recombinante en *Escherichia coli* recombinante como se ha descrito previamente (van der Burg SH *et al.*, 2001).

Análisis de células Th específicas del antígeno por ELISPOT de IFN γ

[0089] La presencia de células Th específicas de HPV 16 se analizó por ELISPOT según se ha descrito previamente (van der Burg SH *et al.*, 2001). En resumen, se sembraron PBMCs frescas en una densidad de 2×10^6 células/pocillo de una placa de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en 1 ml de IMDM (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) enriquecido con 10% de suero humano AB, en presencia o ausencia de las agrupaciones de péptidos E2, E6 y E7 de HPV 16 indicadas. Los péptidos se usaron en una concentración de 5 μ g/ml/péptido. Después de 4 días de incubación a 37°C, las PBMCs se cosecharon, se lavaron y se sembraron en cuatro pocillos duplicados en una densidad de 10^5 células por pocillo en 100 μ l de IMDM enriquecido con 10% de FCS en una placa de 96 pocillos multipantalla (Millipore, Etten-Leur, Países Bajos) revestida con un anticuerpo de captura de IFN γ (Mabtech AB, Nacha, Suecia). Se llevaron a cabo más incubaciones de anticuerpos y el desarrollo del ELISPOT según las instrucciones del fabricante (Mabtech). Se contaron los puntos con un sistema de análisis de formación imágenes de vídeo asistido por ordenador completamente automatizado (Bio Sys). Los puntos específicos se calcularon mediante la substracción del número medio de puntos + 2xSD del medio de control a partir del número medio de puntos de los pocillos experimentales (van der Burg SH *et al.*, 2001).

Ensayo de proliferación de células T

[0090] Los cultivos de células T de las biopsias de piel se evaluaron para reconocimiento de proteína y péptidos específicos en un ensayo de proliferación de 3 días (van der Burg SH *et al.*, 2001). En resumen, se aislaron los monocitos autólogos de las PBMCs por adherencia a una placa de 96 pocillos de fondo plano durante 2 h en el medio X-vivo 15 (Cambrex) a 37°C. Los monocitos se usaron como APCs, cargadas durante toda la noche con 10 μ g/ml de péptido y 20 μ g/ml de proteína. Se sembraron linfocitos de infiltración de prueba de piel en una densidad de $2-5 \times 10^4$ células/pocillo en IMDM suplementado con 10% de suero AB. El medio solo se adoptó como control negativo, la fitohemaglutinina (0,5 μ g/ml) sirvió como control positivo. La proliferación se midió por incorporación de [3 H]timidina (5 μ Ci/mmol). Una respuesta proliferativa se definió específica cuando el índice de estimulación (SI) ≥ 3 . Los sobrenadantes de los ensayos de proliferación se cosecharon 48 horas después de la incubación para el análisis de producción de citocina específica del antígeno.

Análisis de citocinas asociadas a respuestas proliferativas específicas de HPV 16

[0091] La detección simultánea de seis citocinas Th1 y Th2 diferentes: IFN γ , factor a de necrosis tumoral, interleuquina 2 (IL2), IL4, IL5 e IL10, se llevó a cabo usando el Cytometric Bead Array (Becton Dickinson) según las instrucciones del fabricante. Los valores de corte estaban basados en las curvas estándar de las diferentes citocinas (100 pg/ml de IFN γ y 20 pg/ml para las citocinas restantes). La producción de citocina específica del antígeno se definió como una concentración de citocina por encima del nivel de corte y >2x la concentración del medio de control (de Jong A *et al.*, 2004).

Tinción de citocina intracelular (ICS)

[0092] La especificidad y el carácter de los cultivos de célula T derivados de los sitios de reacción cutánea positiva se evaluaron por ICS como se ha explicado previamente (de Jong A *et al.*, 2005). Brevemente, se cosecharon los linfocitos de infiltración de la prueba de piel, se lavaron y se suspendieron en IMDM + 10% de suero AB y $2-5 \times 10^4$ células se añadieron a los monocitos autólogos que se pulsaron durante toda la noche con 50 μ l de péptido (10 μ g/ml) o proteína (20 μ g/ml) en el medio X vivo. El medio solo se adoptó como control negativo, la fitohemaglutinina (0,5 μ g/ml) sirvió como control positivo. Se mancharon muestras simultáneamente con IFN γ ratón-antihumano marcado con FITC (0,5 g/ml, BD PharMingen), IL5 ratón-antihumano marcado con PE (0,2 mg/ml, BD PharMingen), anti-CD4 marcado con APC (BD Bioscience) y anti-CD8 marcado con PerCP (BD Bioscience). Tras la incubación a 4°C, las células se lavaron, se fijaron con 1% de paraformaldehído y se analizaron por citometría de flujo (FACScan, BD Biosciences).

Análisis estadístico

[0093] Se usó la prueba exacta de FISHER (de 2 colas) para analizar la relación entre la detección de células T específicas de HPV que producen IFN γ en PBMC, la presencia de una reacción de prueba de piel o la presencia de células T específicas de HPV en las biopsias de piel, al igual que las diferencias entre los pacientes y los controles sanos con respecto al tamaño o el número de reacciones de piel dentro de estos grupos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Graphpad InStat (versión 3.0) y Graphpad Prism 4.

Resultados

Reacciones cutáneas para inyección intracutánea con péptidos E2, E6 y E7 de HPV 16

[0094] Estudiamos las reacciones cutáneas en sujetos sanos después de la inyección intracutánea con péptidos E2, E6 y E7 de HPV 16. Las reacciones cutáneas positivas aparecieron como pápulas rojizas planas de 2 a 20 mm de diámetro, surgiendo dentro del intervalo de 2 a 25 días después de la inyección. Una reacción cutánea positiva se detectó en 46 de las 152 pruebas de piel en los voluntarios sanos. En total, cada agrupación de péptidos en la prueba de piel pudo dar lugar a una reacción cutánea positiva. Se observaron reacciones más frecuentemente contra E2₃₁₋₇₅ (10 de cada 19 sujetos), E6₃₇₋₁₀₄ (9/16) y E7₄₃₋₉₈ (7/19) en el grupo de control. Este modelo de reacción se asemeja al que hemos observado previamente en PBMC (de Jong A *et al.*, 2002; Welters *et al.*, 2003) (figura 14). Estas reacciones cutáneas se correspondieron con la presencia de una respuesta de célula T específica del péptido como se detectó en las PBMC de estos individuos (datos no mostrados). Las reacciones cutáneas en donantes sanos están asociadas a frecuencias más altas de células T específicas de HPV 16 en la sangre periférica.

[0095] Para comparar los resultados de la prueba de piel con la presencia de células T de tipo 1 específicas de HPV 16 circulantes, se realizó un ensayo de ELISPOT de IFN γ con PBMC recogidas antes de que se diera el desafío intradérmico del péptido. En 5 de cada 19 voluntarios sanos pudimos detectar una respuesta inmune específica de HPV 16 mediante ELISPOT de IFN γ . La detección de ≥ 5 células T específicas de HPV 16 circulantes por 100.000 PBMC en la muestra de sangre pre-desafío de los individuos sanos estaba asociada a una reacción cutánea temprana positiva (≤ 13 días) a la misma secuencia peptídica ($p = 0,0003$, prueba exacta de Fisher de dos colas; Figura 15). No se detectó ninguna célula T específica de HPV 16 circulante en la muestra de sangre pre-desafío de los donantes sanos para péptidos que inducían una reacción cutánea tardía positiva (14 a 25 días). Esto sugiere que la frecuencia de células específicas del antígeno circulantes determina el tiempo que tardan en aparecer las reacciones cutáneas. Para valorar la frecuencia de células T específicas de HPV en el momento en el que aparecía una reacción cutánea, se recogieron muestras de sangre adicionales de 11 voluntarios sanos. En estos individuos, 39 de las 88 pruebas de piel fueron positivas. En 25 de las 39 reacciones cutáneas positivas y en 10 de las 49 reacciones cutáneas negativas ≥ 5 células T específicas de HPV 16 fueron detectadas por 100.000 PBMC. En este punto, se encontró una correlación significativa entre la detección de células T circulantes productoras de IFN γ específicas de HPV en la muestra de sangre post-desafío y la presencia de una reacción cutánea ($p < 0,0001$, prueba exacta de FISHER; Figura 16). Esto muestra que la frecuencia de células T específicas de HPV 16 en la sangre de voluntarios sanos es significativamente superior después de un desafío intradérmico con péptido de HPV 16 e indica que la inyección intracutánea de antígenos peptídicos mejora el número de células T específicas de HPV 16 en la sangre de los voluntarios sanos.

Las biopsias de los sitios de reacción cutánea positiva consisten en células T específicas de HPV 16 CD4⁺ y CD8⁺ de Th1/Th2.

[0096] Aproximadamente el 25% de las reacciones cutáneas positivas de los voluntarios sanos no estaban asociadas a la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 en la sangre, lo que sugiere que otros tipos de células T productoras de IFN γ pueden infiltrar la piel después de la inyección intradérmica de péptidos de HPV 16. Para caracterizar las células en un sitio de reacción cutánea positiva se tomaron biopsias por perforación. En total se tomaron 8 biopsias de distintos sitios de reacción cutánea positiva de 7 controles sanos y se cultivaron con un cóctel de citocinas que permitió el crecimiento de las células T *in vitro* sin estimulantes antigénicos. En 7 de los 8 casos, las células T exfiltraron el tejido y se expandieron en 3-4 semanas. Las células T expandidas se evaluaron para su especificidad en un ensayo de proliferación de corta duración. La figura 17 muestra ejemplos de cultivos de células T que proliferaron específicamente por estimulación con monocitos autólogos pulsados con la agrupación de péptidos, también inyectados en este sitio durante la prueba de piel (HD2, HD10, HD15) al igual que monocitos pulsados con la proteína E6 de HPV 16 (Figura 17AB). Esto indica que estas células T fueron capaces de reconocer sus complejos HLA-péptido afines después de que se procesara y presentara de forma natural el antígeno. El análisis de los sobrenadantes de estos cultivos de células T proliferativos reveló un perfil de citocina Th1/Th2 mezclado en el que las células T específicas de HPV 16 producían IFN γ , IL-4 e IL-5 (Figura 17C). En cada caso en el que se detectaron células T específicas de HPV en el cultivo de la biopsia (4 de 8) coincidió con la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 circulantes en la muestra de sangre post-desafío mediante ELISPOT (compárense las figuras 17A y B). En 3 de las otras 4 biopsias de reacción cutánea positiva (HD2, HD 17, HD 18) las células T no respondieron a los péptidos de HPV 16 (Figura 17; HD 17) y en un caso ninguna célula T exfiltró el tejido en absoluto (HD13). En estos 4 casos no fuimos capaces de detectar células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 en la muestra de sangre post-desafío. La cotinción de las células T de la biopsia mediante los marcadores de superficie celular CD4 y CD8 mostró que no sólo las células T CD4⁺ específicas de HPV 16, sino también las CD8⁺ específicas de HPV 16 infiltraron el sitio de piel tras el

desafío intradérmico con péptido de HPV 16 (Figura 18). En general, en 3 de las 4 biopsias infiltradas por células T específicas de HPV 16, fuimos capaces de detectar células T CD8⁺ específicas de HPV 16. Las células T CD8⁺ aisladas de la biopsia (agrupación 6) de HD2 respondieron a ambos péptidos solapantes de la prueba de piel inyectada: HPV 16 E6₁₀₉₋₁₄₀ y E6₁₂₇₋₁₅₈ (datos no mostrados), mientras que las células T CD8⁺ de ambos sujetos HD15 y HD16 respondieron a HPV 16 E6₃₇₋₆₈ (véase el ejemplo para HD15, Fig. 18). Tomada en conjunto, la población de células inmunológicas que migran dentro de la piel tras el desafío intradérmico con péptidos de HPV 16 comprende células T citotóxicas CD8⁺ y CD4⁺ Th1, Th2 específicas de HPV 16. Esta infiltración está acompañada por la aparición de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 que circulan en la sangre.

10 Discusión

[0097] Las pruebas de piel se usan comúnmente como un ensayo simple para la medición *in vivo* de la inmunidad mediada por la célula. Hemos validado el uso del ensayo de prueba de piel para la medición de respuesta inmune celular específica de HPV 16 contra los antígenos tempranos E2, E6 y E7 *in vivo* comparando los resultados con los de las mediciones paralelas de reactividad de célula T mediante ensayos *in vitro*. En el grupo de voluntarios sanos las reacciones cutáneas tempranas aparecieron entre 4 y 12 días después del desafío intradérmico del antígeno. En estos individuos, conocidos por mostrar respuestas de célula T de tipo 1 específica de HPV 16 *in vitro* (de Jong A *et al.*, 2002; Welters *et al.*, 2003), la aparición de una reacción cutánea temprana (dentro de 13 días) estaba asociada de manera importante a la detección de células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 en una frecuencia de al menos 1 por 20.000 PBMC (Figura 15, p<0,001). Los mismos criterios de corte para una reacción positiva en el ensayo ELISPOT de IFN γ son recomendados por Jeffries *et al.* (Jeffries DJ *et al.*, 2006), que usaron herramientas matemáticas para definir el corte apropiado del ELISPOT en relación con las pruebas de Mantoux. El bajo número de células T de memoria circulantes (Figura 15) puede explicar por qué las reacciones cutáneas aparecen con cierto retardo en comparación con las pruebas de DTH tradicionales. Las células T necesitan ser estimuladas o reactivadas y comienzan a dividirse antes de que se hayan producido suficientes células para causar una reacción local inflamatoria: la prueba de piel positiva. De hecho, al mismo tiempo que aparece una reacción cutánea positiva, se puede detectar una frecuencia más alta de respuestas Th1 específicas de HPV 16 en la sangre periférica (Figura 16). Históricamente se ha postulado que la célula Th1 induce respuestas de DTH, no obstante, varios estudios han mostrado ahora que también las células Th2 que infiltran los sitios de prueba de piel (Wang S *et al.*, 1999; Woodfolk JA *et al.*, 2001). De forma similar, este estudio muestra que los sitios de prueba de piel positiva de los voluntarios sanos contienen ambas células T de tipo Th1 y Th2 específicas de HPV 16 (figuras 17 y 18). Además, las reacciones cutáneas positivas pueden ser también el resultado del flujo de células T no específicas, como se desprende de dos estudios en profundidad de los sitios de prueba de piel positiva usados para analizar la respuesta inmune específica después de la vacunación de pacientes con cáncer de células renales o melanoma (Bleumer I *et al.*, 2007). Este estudio también mostró que varios sitios de prueba de piel positiva de sujetos sanos eran infiltrados con células T que no respondían a los antígenos de HPV 16 inyectados. Hasta el momento, la causa de las reacciones cutáneas positivas específicas sigue estando poco clara. De forma imprevista, observamos que la mayoría de las reacciones cutáneas en individuos sanos aparecieron de 2 a 3 semanas después de la inyección intradérmica del antígeno. Mientras, estas reacciones cutáneas positivas tardías no se correlacionaban con la detección de células T de memoria CD4⁺ específicas de HPV circulantes en la sangre pre-desafío (Figura 15) la constitución inmunológica de estos sitios de prueba de piel es similar a la de las pruebas de DTH clásicas (Platt JL *et al.*, 1983; Poulter LW *et al.*, 1982) y está compuesta por células Th1- y Th2- CD4⁺ específicas de HPV 16 al igual que células T CD8⁺ específicas de HPV 16 (Figura 17 y 18). Nuestra hipótesis es que estas reacciones pueden ser el resultado del cebado de células T. Esto también se ha detectado en el 29% de los pacientes que fueron sometidos a un protocolo de prueba de piel de tuberculina de 2 pasos y que sólo fueron positivos en la segunda ronda de prueba (Akca A *et al.*, 2003). En general, se alcanza el valor máximo de respuestas de célula T inducida por la vacuna en 10 a 14 días después de la vacunación y no en tres semanas. No obstante, deberíamos tener presente que en tal protocolo se inyecta una dosis de antígeno más alta, así como adyuvantes fuertes. Es por lo tanto razonable asumir que las respuestas de células T inducidas por desafío intradérmico se desarrollan más lentamente y alcanzan el valor máximo más tarde. Dado que el desafío intradérmico del péptido en voluntarios sanos produce la inducción de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas de HPV16, por lo tanto, éste debería considerarse como una vacunación de dosis baja, única. El objetivo principal de este estudio piloto era validar el uso de la prueba de piel específica de HPV 16 para detectar *in vivo* respuestas inmunológicas de tipo 1. En voluntarios sanos, una reacción cutánea positiva dentro de 13 días, de hecho, se correlaciona con la presencia de células T circulantes de memoria que producen IFN γ según se detectó por ELISPOT de IFN γ *in vitro*. De manera importante, también observamos discrepancias entre los resultados obtenidos por la prueba de piel y el ELISPOT. En un número de casos, se detectaron células T productoras de IFN γ específicas de HPV 16 circulantes en las muestras de sangre post-desafío pero sin una reacción cutánea concomitante y viceversa (Figura 16) y esto se puede considerar como un resultado falso negativo o falso positivo. Para entender completamente el impacto de esto en la interpretación de la detección de la inmunidad de tipo 1 contra el HPV, hemos iniciado una prueba de campo en un grupo grande de pacientes positivos de HPV y voluntarios sanos en Indonesia.

Tabla 1 unión de HLA y escisión de C-terminal por proteasomas de epítomos de CTL potenciales

	Unión Peptídica ¹		Escisión proteasómica de C-terminal ²		
	Afinidad	Estabilidad	IP (RMA)	IP (JY)	HH (HeLa)
HLA-A*0101					
117-126 GTAKSVTCTY	intermedia	+	-	-	-
196-205 RVEGNLRVEY	intermedia	+	-	-	-
205-214 YLDDRNTFRH	intermedia	+			
226-234 GSDCTTIHY	alta	+	+		+
229-236 CTTIHYNY	intermedia	-	-		-
HLA-A*0201 ³					
24- 32 KLLPENNVL	intermedia	NT	+	+	+
65- 73 RMPEAAPPV	alta	6h	-	-	-
113-122 FLHSGTAKSV	baja	6h	+	+	+
149-157 STPPPGTRV	baja	<2h	+	+	+
187-197 GLAPPQHLIRV	alta	6h	+	+	+
264-272 LLGRNSFEV	intermedia	6h	-	-	-
322-330 PLDGEYFTL	intermedia	?	+	+	+
HLA-A*0301					
101-110 KTYQGSYGFR	alta	+/-	-	-	-
110-120 RLGFLHSGTAK	alta	+	+	+	-
111-120 LGFLHSGTAK	alta	+/-	+	+	-
112-120 GFLHSGTAK	intermedia	-	+	+	-
113-120 FLHSGTAK	intermedia	+/-	+	+	-
117-126 GTAKSVTCTY	intermedia	-	+/-	+	+/-
122-132 VTCTYSPALNK	intermedia	+	-	-	-
124-132 CTYSPALNK	alta	+	-	-	-
129-139 ALNKMFCQLAK	alta	+	+	+	+
132-139 KMFCQLAK	alta	+	+	+	+
154-163 GTRVRAMAIY	intermedia	-	-	-	-
154-164 GTRVRAMAIYK	alta	+	-	-	-
156-163 RVRAMAIY	intermedia	-	-	-	-
156-164 RVRAMAIYK	alta	+	-	-	-
172-181 WRRCPHHER	intermedia	+	-	-	-
360-370 GGSRAHSSHLK	intermedia	-			
361-370 GSRAHSSHLK	alta	+			
363-370 RAHSSHLK	alta	+			
363-372 RAHSSHLKSK	intermedia	+/-			
363-373 RAHSSHLKSKK	alta	+			
373-381 KGQSTSRHK	intermedia	+/-	+	+	+

376-386 STSRHKKLMFK	alta	+/-	-	-	-
101-110 KTYQGSYGFR	alta	+/-	-	-	-
111-120 LGFLHSGTAK	alta	+	+	+	-
112-120 GFLHSGTAK	intermedia	-	+	+	-
124-132 CTYSPALNK	alta	+	-	-	-
132-139 KMFCQLAK	alta	+	+	+	+
156-164 RVRAMAIYK	alta	+	-	-	-
311-319 NTSSSPQPK	alta	+/-	-	-	-
311-320 NTSSSPQPKK	alta	+/-	-	-	-
312-319 TSSSPQPK	alta	+/-	-	-	-
283-291 RTEEENLRK	intermedia	+/-			
363-370 RAHSSHLK	intermedia	+/-			
374-382 GQSTSRHKK	intermedia	+/-	-	-	-
HLA-A*2401					
18- 26 TFSDLWKLL	alta	+	+	+	+
102-111 TYQGSYGFRL	alta	+	+	+	+
106-113 SYGFRLGF	alta	+	+	+	+
106-114 SYGFRLGFL	alta	+/-	+	+	+
125-134 TYSPALNKMF	alta	+	-	-	-
204-212 EYLDDRNTF	alta	+			
340-348 MFRELNEAL	alta	+/-	-	-	-

¹ La afinidad de unión peptídica se caracteriza de la siguiente manera: buena IC₅₀ <5µM, intermedia IC₅₀ =5-15µM, y baja IC₅₀ >15-50µM.

Para determinar la estabilidad del complejo péptido-MHC, se llevó a cabo unión peptídica a 4°C y 20°C e IC₅₀ se determinó.

Los péptidos estables mostraron IC₅₀ a 20°C que desviaron <2 veces del IC₅₀ a 4°C. Los péptidos que mostraron IC₅₀ a 20°C superior a dos veces el IC₅₀ a 4°C pero IC₅₀ <15µM se consideraron con unión de estabilidad intermedia.

Los demás se consideraron con unión peptídica inestable.

² Escisión proteasómica de C-término. Péptidos de 30 residuos de largo fueron digeridos por inmunoproteasomas (IP) derivados tanto de ratón (células de RMA) y como de humano (B-LCL JY) y proteasomas domésticos (HH) derivados de humano (células HeLa).

³ péptidos de unión a HLA-A *0201.

La capacidad de unión al péptido se determinó previamente por (16, 24, 25). Estabilidad peptídica.

Tabla 2 Relación entre unión peptídica, digestión proteasómica y tolerancia.

Secuencia y restricción de HLA de epítomos de CTL procesados de forma natural		Tolerancia			Unión peptídica			Escisión proteasómica de C-término		
Posición	Secuencia	Restricción de HLA	Humano	WTp53 ratón	p53-/- ratón	Afinidad	Estabilidad	IP (RMA)	IP (JY)	HH (HeLa)
P53 65-73	RMPEAAPPV	HLA-A*0201	NO			alta	6h	-	-	-
P53 149- 157	STPPPGTRV	HLA-A*0201	NO			baja	<2 h	+	+	+
P53187- 197	GLAPPQHILIR V	HLA-A*0201		Sí	NO	alta	6h	+	+	+
P53125- 134	TYSPALNKMF	HLA-A*2401	NO			alta	+	-	-	-
P53 264- 272	LLGRNSFEV	HLA-A*0201	NO			intermedia	6h	-	-	-
PRA 100- 108	VDGLDVLL	HLA-A*0201	NO			intermedia	2,5h		+	
PRA 142- 151	SLYSFPEPEA	HLA-A*0201	NO			alta	3h		+	
PRA 300- 309	ALYVDSLFFL	HLA-A*0201	NO			alta	>4h		+	
PRA 425- 433	SLLQHDGL	HLA-A*0201	NO			alta	>4h		+	

Tabla 3 10 péptidos p53 usados en el estudio de vacunación de fase I/II

Aminoácidos	Secuencia	Número
70-99	APPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPS	1
86-115	APAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRGLH	2
102-131	TYQGSYGFRGLHSGTAKSVTCTYSPALN	3
126- 155	YSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGT	4
142-171	PVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMT	5
157-186	VRAMAIYKQSQHMTVVRRCPHHERCSDSD	6
174-203	RRCPHHERCSDSDGLAPPQHILIRVEGNLRV	7
190-219	PPQHILIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVP	8
206-235	LDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYN	9
224-248	EVGSDCTTIHYNMCMSSCMGGMNR	10

Tabla 4: proceso de análisis y vacunación completo en pacientes con cáncer ovárico

	Screening	Visita 1 Día 0	Visita 2 Día 10	Visita 3 Día 21	Visita 5 Día 31	Visita 6 Día 42	Visita 7 Día 52	Visita 8 Día 63	Visita 9 Día 76	Seguimiento
Consentimiento informado										
N. estudio										
Estado de rendimiento WHO										
Evaluación médica										
Evaluación física										
Medicación										
Escáner CT										Día 105-126
EKG										
Hematología, CA 125 y bioquímica										
Orina										
Recolección de PBMC										
Biopsia por perforación										
Vacunación										
Agenda										
Eventos adversos										
Seguimiento estándar										

Tabla 5: Análisis de la afinidad y la estabilidad de los epítomos para unión a HLA al igual que procesamiento de proteasoma de algunos péptidos preferidos

Vacuna peptídica ISA	Epítomos previstos de tipo HLA (p53 aa)	Unión a HLA		Escisión proteasómica	Tolerancia
		Afinidad	Estabilidad		
p53 86-115	A3 (101-110)	alta	+/-	-	
	A11 (101-110)	alta	+/-	-	
p53 102-131	A1 (117-126)	intermedia	+	-	
	A2 (113-122)	baja	6h	+	
	A3 (111-120)	alta	+/-	+	
	A3 (112-120)	intermedia	-	+	
	A3 (113-120)	intermedia	-	+/-	
	A3 (117-126)	intermedia	-	+/-	
	A11 (112-120)	intermedia	-	+	
	A24 (106-114)	alta	+/-	+	
p53 142-171	A2 (149-157)	baja	-	+	no
	A3 (154-163)	intermedia	-	-	
	A3 (154-164)	alta	+	-	
	A3 (156-163)	intermedia	-	-	
	A3 (156-164)	alta	+	-	
	A11 (156-164)	alta	+	-	
p53 157-186	A3 (172-181)	intermedia	+	-	
p53 190-219	A1 (196-205)	intermedia	+	-	
	A1 (205-214)	intermedia	+	?	
	A24 (204-212)	alta	+	?	
p53 224-248	A1 (226-234)	alta	+	+	
	A1 (229-236)	baja	-	-	
p53 225-254	A1 (229-236)	baja	-	-	
p53 257-286	A2(264-272)	intermedia	6h	-	
p53 273-302	A11 (283-291)	intermedia	+/-	?	
p53 305-334	A11 (311-319)	alta	+/-	-	
	A11 (311-320)	alta	+/-	-	
	A11 (312-319)	alta	+/-	-	
p53 337-366	A24 (340-348)	alta	+/-	-	
p53 353-382	A3 (360-370)	intermedia	-	?	
	A3 (361-370)	alta	+	?	
	A3 (363-370)	alta	+	?	
	A3 (363-372)	intermedia	-	?	
	A3 (363-373)	alta	+	?	

	A3 (373-381)	intermedia	-	+	
	A11 (363-370)	intermedia	+/-	?	
p53 369-393	A3 (376-386)	alta	-	-	
	A11 (374-382)	intermedia	+/-	-	

Tabla 6: Resumen de respuestas de células T específicas de p53 de pacientes con cáncer colorectal vacunados dos veces con la vacuna p53-SLP.

Paciente		1-78 ¹	70-115	102-155	142-203	190-248	241-393
1	ELISPOT	-	-	-	+ ²	+	-
	LST	-	-	+	+	+	+
2	ELISPOT	-	-	-	+	+	-
	LST	-	-	-	+	+	+
3	ELISPOT	-	+	-	-	-	-
	LST	-	-	-	-	+	-
4	ELISPOT	+	+	+	+	+	+
	LST	-	-	-	+	-	-
5	ELISPOT	-	-	-	-	-	-
	LST	-	-	-	-	-	-
7	ELISPOT	-	-	-	-	-	+
	LST	-	-	+	-	+	-
8	ELISPOT	-	-	+	+	+	-
	LST	-	-	-	-	-	-
9	ELISPOT	-	+	+	+	+	-
	LST	-	-	-	-	+	-
10	ELISPOT	-	-	-	-	-	-
	LST	-	-	+	+	+	-
Puntos positivos totales		1	3	6	6	8	4

¹ Se presenta el número del primer y del último aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína p53 cubierto por la agrupación de péptidos. Las columnas con el primero y último aminoácido en negrita representan las partes de la proteína p53 que se usan en la vacuna.

² El signo más indica que este paciente mostró una respuesta de células T específica de p53 inducida por la vacuna para esta agrupación de péptidos p53.

Tabla 7. Respuestas de células T humorales y celulares inducidas por la vacuna y respuestas clínicas para vacuna p53-SLP en pacientes con cáncer ovárico

Paciente	Respuestas de células T inducidas por la vacuna en PBMC (ELISPOT de IFN γ) ¹	Respuestas de células T inducidas por la vacuna en PBMC (ensayo de proliferación) ²	Respuestas de células T específicas de p53 en linfocitos de biopsias de piel ³	Anticuerpos específicos de p53 después de inmunización ⁴	Respuesta clínica	
					CA-125 ⁶	CT ⁷
P01	+	+	+	-	PD	PD
P02	+	+	+	-	SD	PD
P03	+	+	-	+ (4,8) ⁵	SD	PD
P04	na	na	na	-	na ⁸	na ⁸
P05	-	+	+	+	PR	PD
P06	-	+	-	+	SD	PD
P08	+	+	+	-	PD	PD
P09	-	-	-	+	SD	PD
P11	+	nt	na	-	PD	PD
P12	na	na	na	-	na ⁸	na ⁸
P13	+	+	+	+ (2,9)	PD	PD
P 14	-	-	-	-	PD	PD
P15	-	-	nt	+	PD	PD
P17	-	+	-	-	SD	SD
P18	+	+	-	+	PD	PD
P19	+	+	+	+ (2,5)	PD	PD
P20	-	+	nt	-	PD	PD
P21	+	+	+	-	SD	PD
P22	+	+	+	-	PD	PD
P23	+	+	+	+	SD	SD

¹ Respuestas de célula T inducidas por la vacuna después de 4 inmunizaciones según se midió por ELISPOT de IFN- γ . - ninguna respuesta inducida por la vacuna, + una respuesta inducida por la vacuna. ² Respuestas de células T inducidas por la vacuna después de 4 inmunizaciones según se midió por ensayo de proliferación. - ninguna respuesta inducida por la vacuna, + una respuesta inducida por la vacuna. ³ Respuestas específicas de p53 en linfocitos cultivados de biopsias de piel según se midió por ensayo de proliferación. - ninguna reactividad de células T específicas de p53, + reactividad de células T específicas de p53. ⁴ Títulos de IgG de p53 en suero después de la inmunización según se midió por ELISA cuantitativa. - ningún anticuerpo específico de p53, + anticuerpos específicos de p53. ⁵ El pliegue de aumento inducido por la vacuna en el título del anticuerpo específico de p53. ⁶ Niveles de CA-125 evaluados según criterio GCIG. ⁷ Escáner CT evaluado según los criterios RECIST. ⁸ Paciente no evaluado por nivel de CA-125 o escáner CT debido a enfermedad rápidamente progresiva clínicamente evidente. na = no disponible. nt = no terminado.

Tabla 8. Respuestas inmunológicas específicas de p53 inducidas por la vacuna en PBMC de pacientes con cáncer ovárico inmunizadas con la vacuna p53-SLP según se analizó por ELISPOT de IFN γ

Paciente ¹	Después de una vacunación (I)				Después de dos vacunaciones (II)				Después de tres vacunaciones (III)				Después de cuatro vacunaciones (IV)			
	vac p1-p2 ²	vac p3-p4	vac p5-p7	vac p8-p10	vac p1-p2	vac p3-p4	vac p5-p7	vac p8-p10	vac p1-p2	vac p3-p4	vac p5-p7	vac p8-p10	vac p1-p2	vac p3-p4	vac p5-p7	vac p8-p10
P01	-	62 ³	17	106	-	14	-	33	-	-	-	-	-	20	-	56
P02	-	-	-	-	-	-	28	-	-	-	21	-	-	-	66	27
P03	-	52	37	166	-	29	15	81	-	43	58	132	-	15	20	57
P04	-	-	-	-	-	-	-	-	na	na	na	na	na	na	na	na
P05	-	19	19	11	-	-	-	-	-	-	29	18	-	-	-	-
P06	-	12	47	22	-	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-	-
P08	110	131	241	220	76	130	200	303	42	113	44	219	-	59	32	156
P09	-	31	38	55	-	10	18	20	-	14	12	-	-	-	-	-
P11	-	71	120	138	-	-	78	-	-	-	35	-	-	-	28	-
P12	26	-	67	73	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
P13	-	65	65	81	37	83	133	144	16	-	125	93	-	-	49	21
P14	-	60	-	22	-	-	12	48	-	-	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	18	-	-	22	20	-	-	-	14	-	-	-	-	-
P17	-	63	46	21	-	-	52	20	-	-	-	-	-	-	-	-
P18	-	88	106	120	-	41	61	45	-	-	-	60	-	41	13	-
P19	-	-	183	94	-	-	75	60	-	-	-	-	-	-	-	23
P20	-	-	-	34	-	11	-	28	-	10	-	53	-	-	-	-
P21	22	119	100	178	-	88	81	32	-	33	38	32	-	12	16	-
P22	14	80	257	367	21	57	201	295	-	77	217	345	-	-	-	64
P23	-	50	106	21	-	-	35	-	-	20	55	22	-	13	-	-

¹ Pacientes analizados para respuestas específicas de p53 antes y después de cada inmunización (momentos temporales I-IV) por ELISPOT de IFN γ . ² La agrupación de péptidos de vacuna p53 usada para estimular las PBMC derivadas del paciente *in vitro* durante 4 días. ³ Sólo se muestran las respuestas específicas de p53 inducidas por la vacuna (véase definición en Material y Métodos). Las respuestas se representan como número de puntos específicos por 10⁵ PBMC (media de pocillos experimentales - (medio + 2xSD) de medio de control). - = ninguna respuesta específica de p53 inducida por la vacuna; na = PBMC no estaban disponibles.

Tabla 9. Respuestas de células T específicas de p53 inducidas por la vacuna después de cuatro inmunizaciones en PBMC recientes aisladas de pacientes con cáncer ovárico inmunizadas con la vacuna p53-SLP según se analizó por ensayo de proliferación.

Paciente ¹	Péptidos de vacuna				Péptidos que no son de la vacuna	
	vac p1-p2 ²	vac p3-p4	vac p5-p7	vac p8-p10	p1-p4	p16-p24
P01	-	13 ³	6,8	6,4	-	-
P02	-	-	-	15,8	-	-
P03	-	24	14,5	5,3	-	-
P05	-	3,9	2,5	3,3	-	-
P06	-	-	-	3,4	-	-
P08	-	-	4,4	7,8	-	4,0
P09	-	-	-	-	-	-
P11	nt	nt	nt	nt	nt	nt
P13	-	2,3	4,9	3	-	-
P14	-	-	-	-	-	-
P15	-	-	-	-	-	-
P17	-	-	-	7,1	-	-
P18	2,3	3,1	-	-	-	-
P19	-	16,5	7,4	-	-	-
P20	3,7	5,1	-	2,4	-	-
P21	6,9	25,4	4,6	8,0	6,4	5,4
P22	-	-	67,6	14,0	-	22,3
P23	6,4	3,2	-	-	3,6	2,1
Total	4 (23,5%)	8 (47,1%)	8 (47,1%)	11 (64,7%)	2 (11,8%)	4 (23,5%)

¹ Pacientes analizados para respuestas específicas de p53 antes y después de las cuatro inmunizaciones por ensayo de proliferación. ² La agrupación de péptidos p53 (péptidos de vacuna o péptidos que no son de la vacuna) usada para estimular las PBMC derivadas del paciente in vitro durante 6 días. La proliferación se midió por la incorporación de ³H-timidina. ³ Las respuestas se representan como la media de proliferación inducida por p53 después de cuatro inmunizaciones divididas por la media de proliferación inducida por p53 antes de la inmunización. Una respuesta > 2 fue considerada una respuesta inducida por la vacuna. De otro modo, la respuesta fue considerada negativa (-). nt = no evaluado.

5

Tabla 10. Respuestas clínicas para inmunoterapia de p53-SLP después de cuatro inmunizaciones según los niveles de suero CA-125 y escáner CT en pacientes con cáncer ovárico.

Paciente	Lesiones objetivo ¹	Lesiones no objetivo ¹	Lesiones nuevas	CA-125 ²	Mejor respuesta total ²
001	PD		Sí	PD	PD
002	PD		Sí	SD	PD
003	PD	PD	Sí	SD	PD
004	ND	ND	ND	ND	ND*
005			Sí	PR	PD
006	PD		Sí	SD	PD
008			Sí	PD	PD
009		PD	No	SD	PD

011	PD		Sí	PD	PD
012	ND	ND	ND	ND	ND*
013	PD	PD	Sí	PD	PD
014	PD		Sí	PD	PD
015			Sí	PD	PD
017			No	SD	SD
018	PD		Sí	PD	PD
019			Sí	PD	PD
020	PD		Sí	PD	PD
021	PD	PD	Sí	SD	PD
022	SD		Sí	PD	PD
023	SD		No	SD	SD

¹ Evaluado según los criterios RECIST; ² Evaluado según los criterios GCIG. PD = enfermedad progresiva; SD = enfermedad estable; PR = respuesta parcial; ND = no hecho
* clínicamente progresivo después de 2 inmunizaciones

Lista de referencias

[0098]

5

Akcay, A., Erdem, Y., Altun, B., Usalan, C., Agca, E., Yasavul, U., Turgan, C., and Caglar, S. The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am.J.Infect.Control*, 31: 371-374,2003.

10

Allen, P. M. Peptides in positive and negative selection: a delicate balance, *Cell*. 76: 593-6., 1994.

Alvarez D. *et al.*, *J. of Immunology*, (2005), 174:1664-1674.

15

Ashton-Rickardt, P. G., Bandeira, A., Delaney, J. R., Van Kaer, L., Pircher, H. P., Zinkernagel, R. M., and Tonegawa, S. Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus, *Cell*. 76: 651-63., 1994.

Barfoed, A. M., Petersen, T. R., Kirkin, A. F., Thor Straten, P., Claesson, M. H., and Zeuthen, J. Cytotoxic T-lymphocyte clones, established by stimulation with the HLA-A2 binding p5365-73 wild type peptide loaded on dendritic cells *In vitro*, specifically recognize and lyse HLA-A2 tumour cells overexpressing the p53 protein, *Scand J Immunol*. 51:128-33, 2000.

20

Benham, A. M., Gromme, M., and Neefjes, J. Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading, *J Immunol*. 161: 83-9., 1998.

25

Bleumer, I., Tiemessen, D. M., Oosterwijk-Wakka, J. C., Voller, M. C., De Weijer, K., Mulders, P. F., and Oosterwijk, E. Preliminary analysis of patients with progressive renal cell carcinoma vaccinated with CA9-peptide-pulsed mature dendritic cells. *J.Immunother.*, 30: 116-122, 2007.

Buckanovich RJ *et al.*, (2008), *Nature Medicine* 14:28-36.

30

Chikamatsu, K., Nakano, K., Storkus, W. J., Appella, E., Lotze, M. T., Whiteside, T. L., and DeLeo, A. B. Generation of anti- p53 cytotoxic T lymphocytes from human peripheral blood using autologous dendritic cells [In Process Citation], *Clin Cancer Res*. 5: 1281-8, 1999.

35

Dai, L. C., West, K., Littaua, R., Takahashi, K., and Ennis, F. A. Mutation of human immunodeficiency virus type 1 at amino acid 585 on gp41 results in loss of killing by CD8+ A24-restricted cytotoxic T lymphocytes, *J Virol*. 66: 3151-4., 1992.

de Jong, A., van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., van der Hulst, J. M., Franken, K. L., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Kenter, G., Vermeij, P., Melief, C. J., and Offringa, R. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy Subjects. *Cancer Res.*, 62:472-479, 2002.

- de Jong, A., van der Hulst, J. M., Kenter, G. G., Drijfhout, J. W., Franken, K. L., Vermeij, P., Offringa, R., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. Rapid enrichment of human papillomavirus (HPV)-specific polyclonal T cell populations for adoptive immunotherapy of cervical cancer. *Int.J.Cancer*, 114: 274-282, 2005.
- 5 de Jong, A., van Poelgeest, M. I., van der Hulst, J. M., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res.*, 64: 5449-5455, 2004.
- 10 Eura, M., Chikamatsu, K., Katsura, F., Obata, A., Sobao, Y., Takiguchi, M., Song, Y., Appella, E., Whiteside, T. L., and DeLeo, A. B. A wild-type sequence p53 peptide presented by HLA-A24 induces cytotoxic T lymphocytes that recognize squamous cell carcinomas of the head and neck, *Clin Cancer Res.* 6: 979-86., 2000.
- 15 Ferdinanda Gabriela, Manuela Ludovisi, Giacomo Corrado, Vito Carone, Marco Petrillo and Giovanni Scambia, Prognostic role of Ca125 response criteria and RECIST criteria: Analysis of results from the MITO-3 phase III trial of gemcitabine versus pegylated doxorubicin in recurrent ovarian cancer, (2008), *Gynecologic Oncology*, 109: 187-193.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome, *Science*. 283: 978-81., 1999.
- 20 Glas, R., Bogyo, M., McMaster, J. S., Gaczynska, M., and Ploegh, H. L. A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function, *Nature*. 392: 618-22., 1998.
- Goonewardene TI, Hall MR, Rustin GJ., Management of asymptomatic patients on follow-up for ovarian cancer with rising CA-125 concentrations. *Lancet Oncol.* (2007) 8(9):813-21.
- 25 Hernandez, J., Lee, P. P., Davis, M. M., and Sherman, L. A. The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire [In Process Citation], *J Immunol.* 164: 596-602, 2000.
- Hersey P, Menzies SW, Coventry B, *et al.* Phase I/II study of immunotherapy with T-cell peptide epitopes in patients with stage IV melanoma. *Cancer Immunol.Immunother.* 2005;54(3):208-18.
- 30 Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53, *FEBS Lett.* 420: 25-7., 1997.
- 35 Hopfl, R., Heim, K., Christensen, N., Zumbach, K., Wieland, U., Volgger, B., Widschwendter, A., Haimbuchner, S., Muller- Holzner, E., Pawlita, M., Pfister, H., and Fritsch, P. Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet*, 356: 1985-1986, 2000.
- 40 Hopfl, R., Sandbichler, M., Sepp, N., Heim, K., Muller-Holzner, E., Wartusch, B., Dapunt, O., Jochmus-Kudielka, I., ter Meulen, J., Gissmann, L., and. Skin test for HPV type 16 proteins in cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*, 337: 373-374, 1991.
- Houbiers, J. G., Nijman, H. W., van der Burg, S. H., Drijfhout, J. W., Kenemans, P., van de Velde, C. J., Brand, A., Momburg, F., Kast, W. M., and Melief, C. J. *In vitro* induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides of mutant and wild-type p53, *Eur J Immunol.* 23: 2072-7, 1993.
- 45 Jeffries, D. J., Hill, P. C., Fox, A., Lugos, M., Jackson-Sillah, D. J., Adegbola, R. A., and Brookes, R. H. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in The Gambia. *Int.J.Tuberc.Lung Dis.*, 10: 192-198, 2006.
- 50 Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus, *Cell.* 49: 273-80., 1987.
- Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Wouter Drijfhout, J., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis, *J Exp Med.* 193: 73-88., 2001.
- 55 Kloetzel PM & Ossendorp F *Curr Opin Immunol.* 2004 Feb;16(1):76-81.

- Luckey, C. J., Marto, J. A., Partridge, M., Hall, E., White, F. M., Lippolis, J. D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors, *J Immunol.* 167: 1212-21., 2001.
- 5 Luckey, C. J., King, G. M., Marto, J. A., Venkateswaran, S., Maier, B. F., Crotzer, V. L., Colella, T. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol, *Journal of Immunology J1 - JI.* 161:112-121, 1998.
- 10 Macagno, A., Gilliet, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Nestle, F. O., and Groettrup, M. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation, *Eur J Immunol.* 29: 4037-42, 1999.
- Mayordomo, J. I., Loftus, D. J., Sakamoto, H., De Cesare, C. M., Appasamy, P. M., Lotze, M. T., Storkus, W. J., Appella, E., and DeLeo, A. B. Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines, *J Exp Med.* 183: 1357-65, 1996.
- 15 Milner, J. Different forms of p53 detected by monoclonal antibodies in non-dividing and dividing lymphocytes, *Nature.* 310: 143-5., 1984.
- 20 Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Bresseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A. L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J. C., Boon, T., Gairin, J. E., and Van den Eynde, B. J. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells, *Immunity.* 12: 107-17, 2000.
- 25 Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation, *Cell.* 69: 1237-45., 1992.
- Morgan *et al.* *Science.* 2006 Oct 6;314(5796):126-9.
- 30 Nijman, H. W., Houbiers, J. G., van der Burg, S. H., Vierboom, M. P., Kenemans, P., Kast, W. M., and Melief, C. J. Characterization of cytotoxic T lymphocyte epitopes of a self-protein, p53, and a non-self-protein, influenza matrix: relationship between major histocompatibility complex peptide binding affinity and immune responsiveness to peptides, *J Immunother.* 14: 121-6, 1993.
- 35 Platt, J. L., Grant, B. W., Eddy, A. A., and Michael, A. F. Immune cell populations in cutaneous delayed-type hypersensitivity. *J.Exp.Med.*, 158: 1227-1242, 1983.
- Poulter, L. W., Seymour, G. J., Duke, O., Janossy, G., and Panayi, G. Immunohistological analysis of delayed-type hypersensitivity in man. *Cell Immunol.*, 74: 358-369, 1982.
- 40 Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanović, S. MHC ligands and peptide motifs: first listing, *Immunogenetics.* 41: 178- 228, 1995.
- 45 Reimann, J. and Schirmbeck, R. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation, *Immunol Rev.* 172: 131-52., 1999.
- Rogel, A., Popliker, M., Webb, C. G., and Oren, M. p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors, *Mol Cell Biol.* 5: 2851-5., 1985.
- 50 Romani N. *et al.*, *Springer Semin Immunopathol.*, (1992), 13:265-279.
- Ropke, M., Hald, J., Guldborg, P., Zeuthen, J., Norgaard, L., Fugger, L., Svejgaard, A., Van der Burg, S., Nijman, H. W., Melief, C. J., and Claesson, M. H. Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide, *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 14704-7, 1996.
- 55 Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, *et al.* Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat.Med.* 1998;4(3):321-7.
- Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff GJ, Barrett JC, Carter SK, Nisen PD, Sigman CC, Parkinson DR, Ruddon RW, Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3919-26.
- 60

- Sebzda, E., Wallace, V. A., Mayer, J., Yeung, R. S., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide, *Science*. 263: 1615-8., 1994.
- 5 Sette, A., Sidney, J., del Guercio, M. F., Southwood, S., Ruppert, J., Dahlberg, C., Grey, H. M., and Kubo, R. T. Peptide binding to the most frequent HLA-A class I alleles measured by quantitative molecular binding assays, *Mol Immunol*. 31: 813-22., 1994.
- 10 Shkedy, D., Gonen, H., Bercovich, B., and Ciechanover, A. Complete reconstitution of conjugation and subsequent degradation of the tumor suppressor protein p53 by purified components of the ubiquitin proteolytic system, *FEBS Lett*. 348: 126-30., 1994.
- 15 Stohwasser, R., Standera, S., Peters, I., Kloetzel, P. M., and Groettrup, M. Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits, *Eur J Immunol*. 27: 1182-7., 1997.
- 20 Terada, N., Lucas, J. J., and Gelfand, E. W. Differential regulation of the tumor suppressor molecules, retinoblastoma susceptibility gene product (Rb) and p53, during cell cycle progression of normal human T cells, *J Immunol*. 147: 698-704., 1991.
- 25 Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, *et al*. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J.Natl.Cancer Inst*. 2000;92(3):205-16.
- Theobald M & Offringa R. *Expert Rev Mol Med*. 2003 Mar 28;2003:1-13.
- 30 Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J., and Sherman, L. A. Targeting p53 as a general tumor antigen, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 11993-7., 1995.
- Theobald, M., Biggs, J., Hernandez, J., Lustgarten, J., Labadie, C., and Sherman, L. A. Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes, *J Exp Med*. 185: 833-41, 1997.
- 35 Theobald, M., Ruppert, T., Kuckelkorn, U., Hernandez, J., Haussler, A., Ferreira, E. A., Liewer, U., Biggs, J., Levine, A. J., Huber, C., Koszinowski, U. H., Kloetzel, P. M., and Sherman, L. A. The sequence alteration associated with a mutational hotspot in p53 protects cells from lysis by cytotoxic T lymphocytes specific for a flanking peptide epitope, *J Exp Med*. 188: 1017-28, 1998.
- 40 Tilkin, A. F., Lubin, R., Soussi, T., Lazar, V., Janin, N., Mathieu, M. C., Lefrere, I., Carlu, C., Roy, M., Kayibanda, M., and *et al*. Primary proliferative T cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer, *Eur J Immunol*. 25: 1765-9, 1995.
- 45 van der Burg, S. H., Ras, E., Drijfhout, J. W., Benckhuijsen, W. E., Bremers, A. J., Melief, C. J., and Kast, W. M. An HLA class I peptide-binding assay based on competition for binding to class I molecules on intact human B cells. Identification of conserved HIV-1 polymerase peptides binding to HLA-A*0301, *Hum Immunol*. 44: 189-98, 1995.
- van der Burg, S. H., Visseren, M. J., Brandt, R. M., Kast, W. M., and Melief, C. J. Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability, *J Immunol*. 156: 3308-14, 1996.
- 50 van der Burg, S. H., Kwappenberg, K. M., Geluk, A., van der, K. M., Pontesilli, O., Hovenkamp, E., Franken, K. L., van Meijgaarden, K. E., Drijfhout, J. W., Ottenhoff, T. H., Melief, C. J., and Offringa, R. Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules. *J.Immunol.*, 162: 152-160, 1999.
- 55 van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., and Offringa, R. Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV 16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int.J.Cancer*, 91: 612-618, 2001.
- 60 van der Burg, S. H., de Cock, K., Menon, A. G., Franken, K. L., Palmén, M., Redeker, A., Drijfhout, J., Kuppen, P. J., van de Velde, C., Erdile, L., Tollenaar, R. A., Melief, C. J., and Offringa, R. Long lasting p53-specific T cell memory

responses in the absence of anti-p53 antibodies in patients with resected primary colorectal cancer, *Eur J Immunol.* 31: 146-55., 2001.

5 Vierboom, M. P., Zwaveling, S., Bos, G. M. J., Ooms, M., Krietemeijer, G. M., Melief, C. J., and Offringa, R. High steady-state levels of p53 are not a prerequisite for tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes, *Cancer Res.* 60: 5508-13., 2000.

10 Wang, S., Fan, Y., Brunham, R. C., and Yang, X. IFN-gamma knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection. *Eur.J.Immunol.*, 29: 3782-3792, 1999.

15 Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., and van der Burg, S. H. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res.* 63: 636-641, 2003.

20 Woodfolk, J. A. and Platts-Mills, T. A. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. *J.Immunol.*, 167: 5412-5419, 2001.

Zanelli, E., Zhou, P., Cao, H., Smart, M. K., and David, C. S. Genomic organization and tissue expression of the mouse proteasome gene *Lmp-7*, *Immunogenetics.* 38: 400-7, 1993

25 LISTADO DE SECUENCIAS
[0099]

<110> Academisch ziekenhuis Leiden h.o.d.n. LUMC

30 <120> Vacunación de péptido p53

<130> P6014030PCT

35 <150> EP 07109802.4
<151> 2007-06-07

<150> US 60/942, 483
<151> 2007-06-07

40 <150> EP 07109287.8
<151> 2007-05-31

45 <150> US 60/941, 070
<151> 2007-05-31

<160> 24

<170> Versión de patentIn 3.3

50 <210> 1
<211> 393
<212> PRT
<213> Humano

55 <400> 1

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 20 25 30
 Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 35 40 45
 Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
 50 55 60
 Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
 65 70 75 80
 Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
 85 90 95
 Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
 100 105 110
 Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
 115 120 125
 Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
 130 135 140
 Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
 145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
 165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
 180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
 195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
 210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

<210> 2
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 2

Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser Gln Lys
 1 5 10 15

Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His
 20 25 30

<210> 3
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 3

Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn
 20 25 30

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Cebador

<400> 4

Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val
 1 5 10 15

Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu
 20 25 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 5

Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val
 1 5 10 15

Val Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp
 20 25 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 6

Pro Pro Glu His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr
 1 5 10 15

Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro
 20 25 30

5 <210> 7
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> Péptido

<400> 7
 Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn
 1 5 10 15

Ser Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg
 20 25

15 <210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> Péptido

<400> 8
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
 1 5 10 15

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile
 20 25 30

25 <210> 9
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> Péptido

<400> 9
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
 1 5 10 15

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu
 20 25 30

35 <210> 10
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

40 <220>
 <223> Péptido

<400> 10

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
 1 5 10 15

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly
 20 25 30

<210> 11
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5

<220>
 <223> Péptido

10

<400> 11
 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly
 20 25 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

15

<220>
 <223> Péptido

20

<400> 12
 Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys
 20 25 30

<210> 13
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

25

<220>
 <223> Péptido

30

<400> 13
 Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 1 5 10 15

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 20 25

<210> 14
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35

<220>
 <223> Péptido

40

<400> 14

Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu
 1 5 10 15

Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn
 20 25 30

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 15
 Arg Arg Cys Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Pro Pro Gln His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val
 20 25 30

<210> 16
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 16
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe
 20 25 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 17
 Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro
 20 25 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> Péptido

<400> 18

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 1 5 10 15

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu
 20 25 30

5 <210> 19
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> Péptido

<400> 19
 Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser
 20 25 30

15 <210> 20
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> Péptido

<400> 20
 Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys
 1 5 10 15

Pro Val Gln Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr
 20 25 30

25 <210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> Péptido

<400> 21
 Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser Val Pro Ser
 20 25 30

35 <210> 22
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> virus
 <400> 22

40

Lys Ala Val Ala Leu Gly Thr Glu Glu Thr Gln Thr Thr Ile Gln Arg
 225 230 235 240
 Pro Arg Ser Glu Pro Asp Thr Gly Asn Pro Cys His Thr Thr Lys Leu
 245 250 255
 Leu His Arg Asp Ser Val Asp Ser Ala Pro Ile Leu Thr Ala Phe Asn
 260 265 270
 Ser Ser His Lys Gly Arg Ile Asn Cys Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile
 275 280 285
 Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg
 290 295 300
 Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser Thr Trp His
 305 310 315
 Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr
 325 330 335
 Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile
 340 345 350
 Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile
 355 360 365

- <210> 23
- <211> 158
- <212> PRT
- <213> virus
- <400> 23

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
50 55 60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
85 90 95
Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
100 105 110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
115 120 125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
130 135 140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150 155

5 <210> 24
<211> 98
<212> PRT
<213> virus

<400> 24
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

10 Lys Pro

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una agrupación de péptidos que comprende los péptidos siguientes de entre 30 y 40 aminoácidos contiguos de p53, que comprenden o que consisten en las siguientes secuencias: p53 142-171, p53 157-186, p53 174-203, para la producción de un medicamento, dicho medicamento comprende además un adyuvante, dicho medicamento está previsto para el tratamiento o la prevención del cáncer.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde el medicamento comprende además un portador inerte farmacéuticamente aceptable.
3. Agrupación de péptidos que comprende los péptidos siguientes de entre 30 y 40 aminoácidos contiguos de p53, que comprenden o que consisten en las siguientes secuencias: p53 142-171, p53 157-186, p53 174-203.
- 15 4. Composición que comprende una agrupación de péptidos tal y como se define en la reivindicación 3, donde la composición comprende además un excipiente farmacéutico y/o un modulador inmunológico.
5. Agrupación de péptidos según la reivindicación 3 o composición según la reivindicación 4 para su uso como un medicamento, dicho medicamento comprende además un adyuvante.

Fig 2

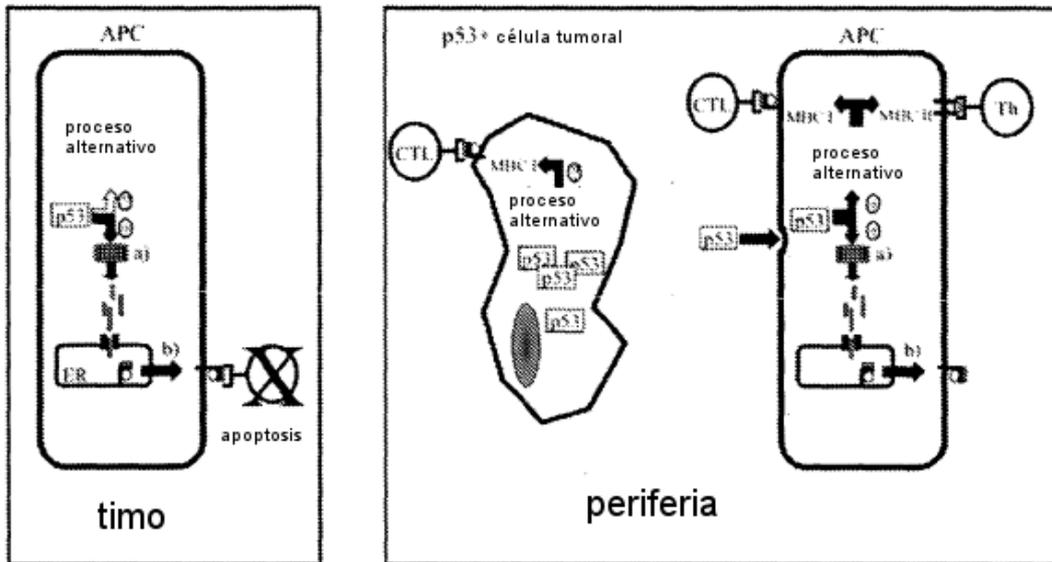


Fig 3

Diagrama de flujo de fase I (5 pacientes) - II (14 pacientes) del estudio de vacunación

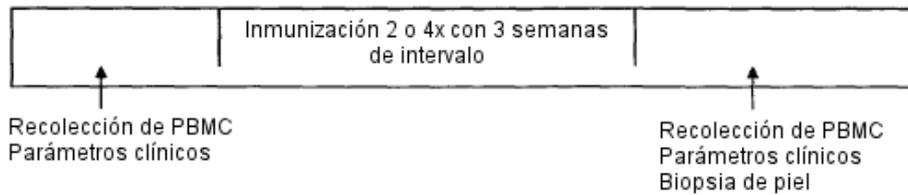


Fig 4a

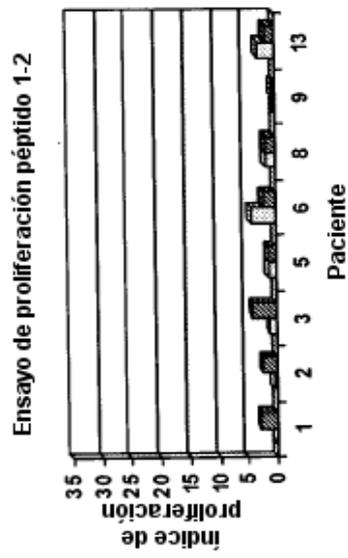


Fig 4b

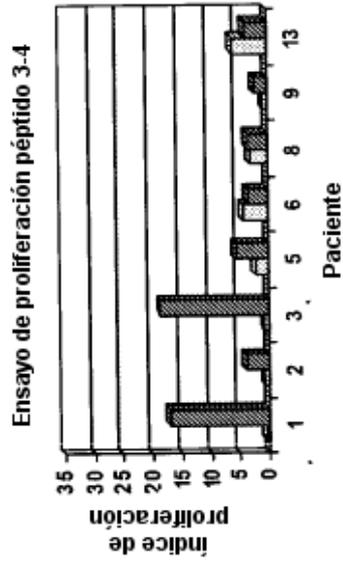


Fig 4c

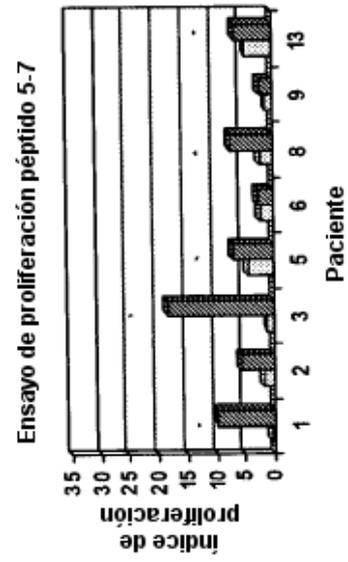


Fig 4d

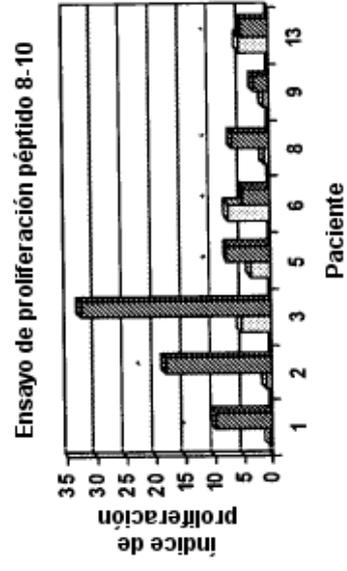


Fig 4f

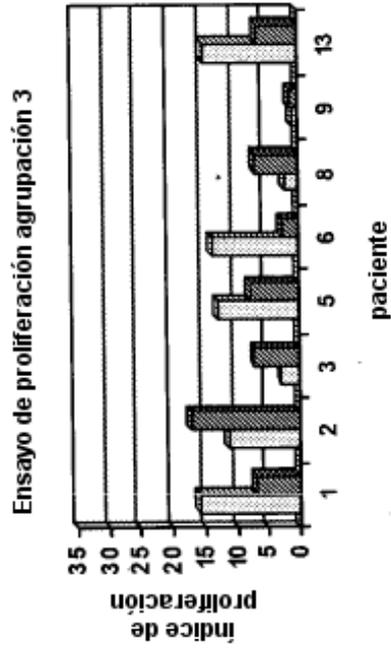


Fig 4e

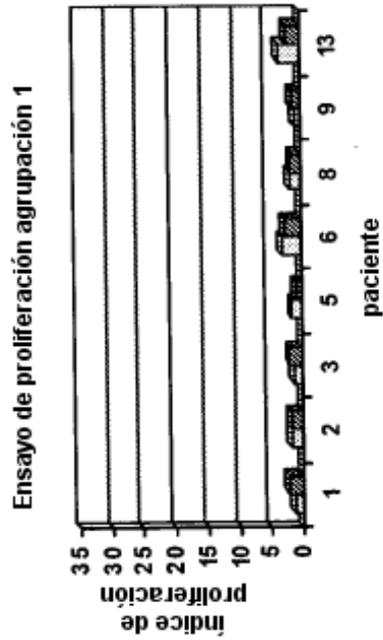


Fig 4g

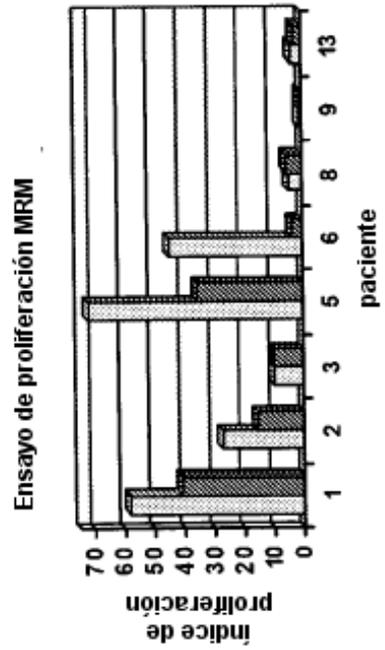


Fig 5a

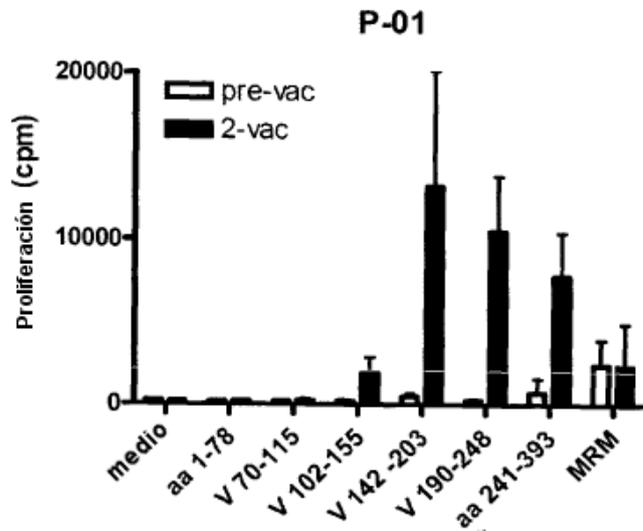


Fig 5b

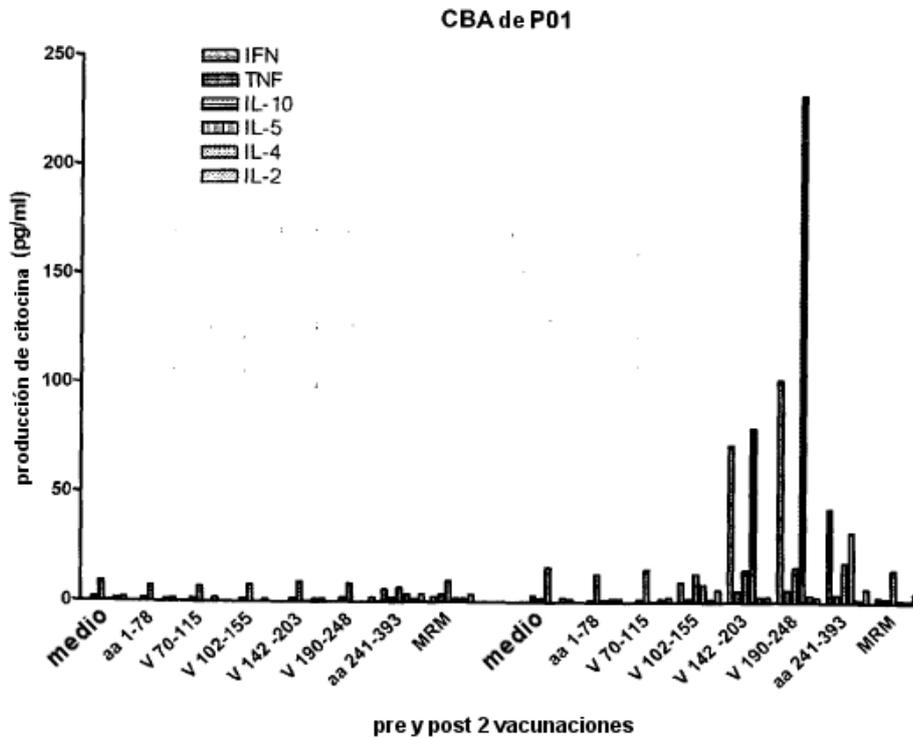


Fig 5c

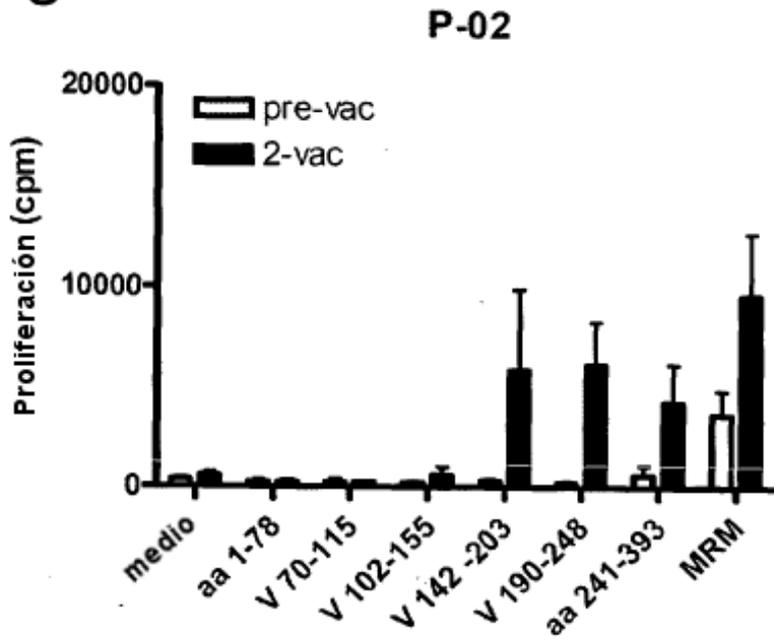


Fig 5d

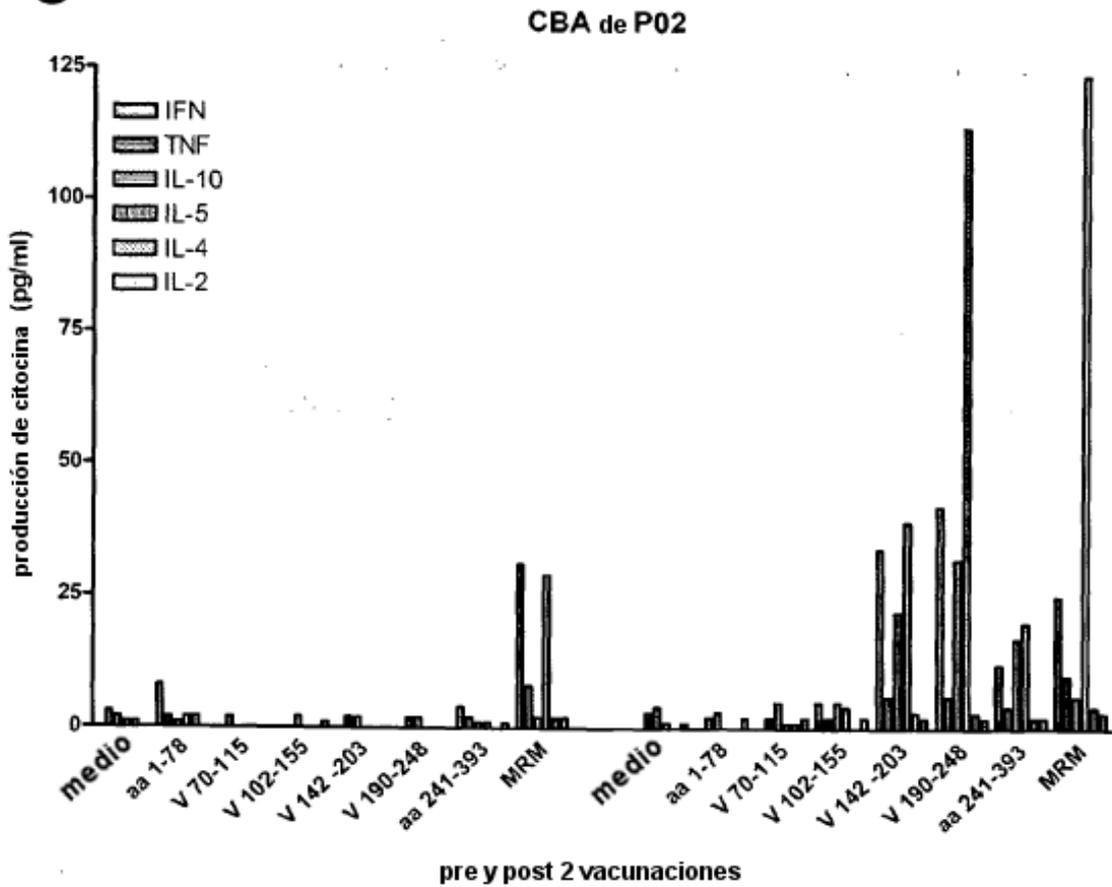


Fig 6a

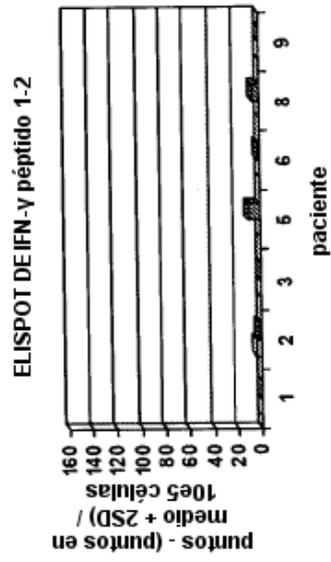


Fig 6b

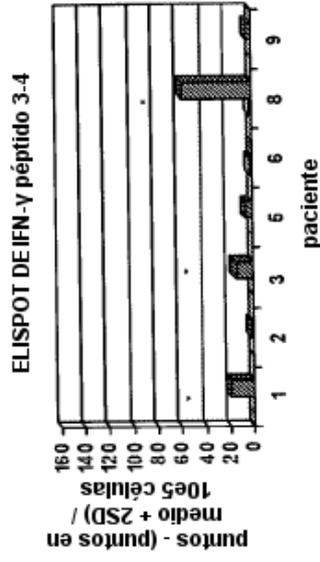


Fig 6c

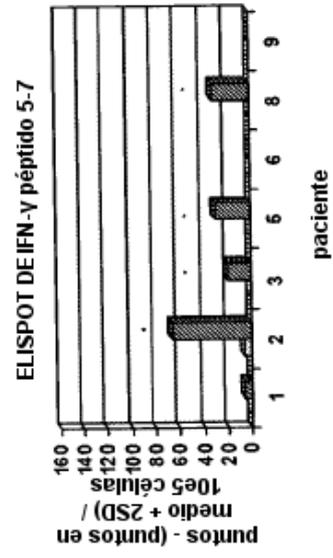


Fig 6d

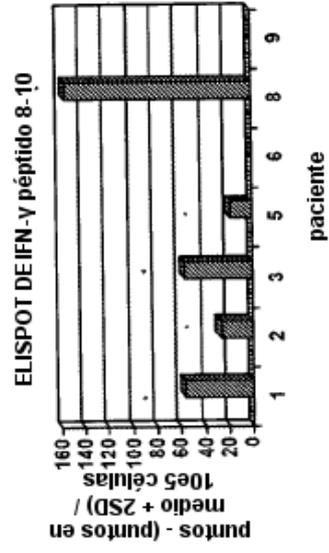


Fig 6f

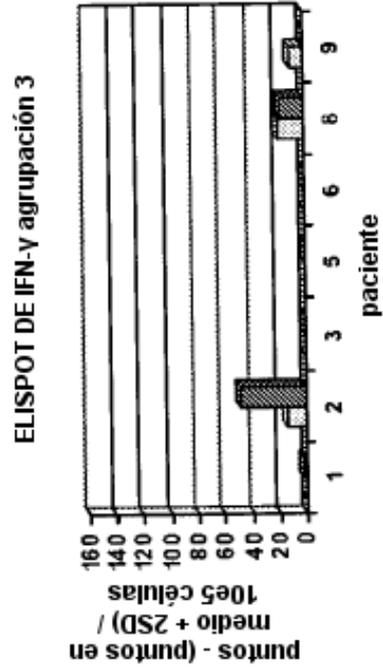


Fig 6e

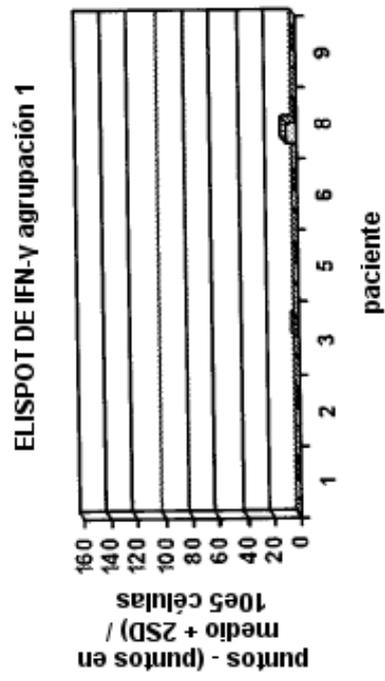


Fig 7a

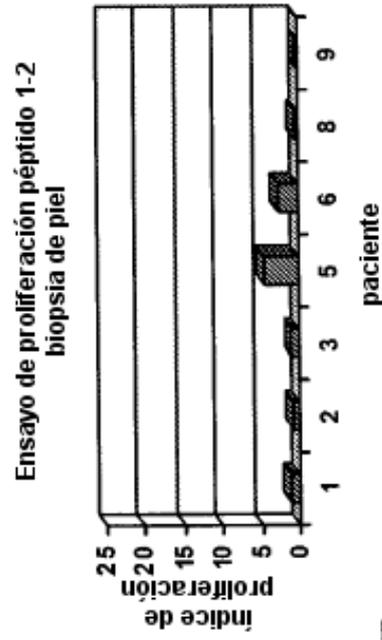


Fig 7b

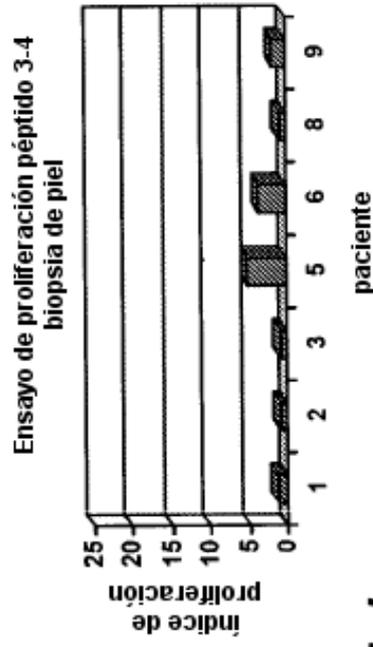


Fig 7c

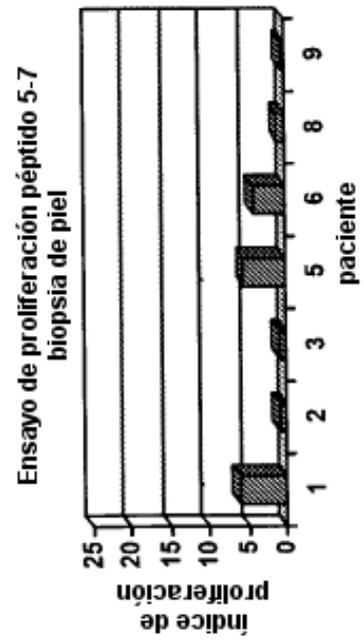


Fig 7d

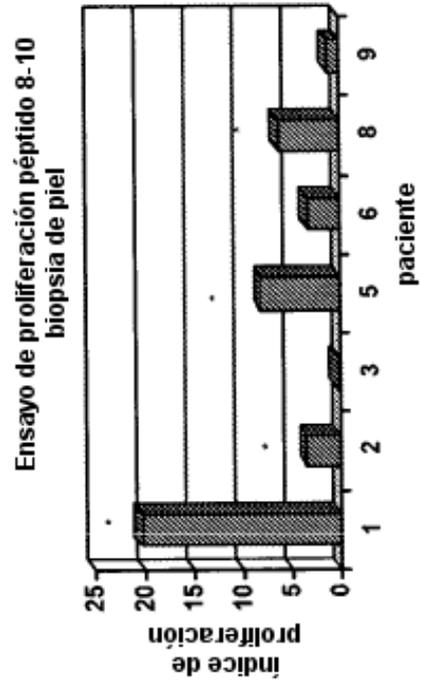


Fig 8

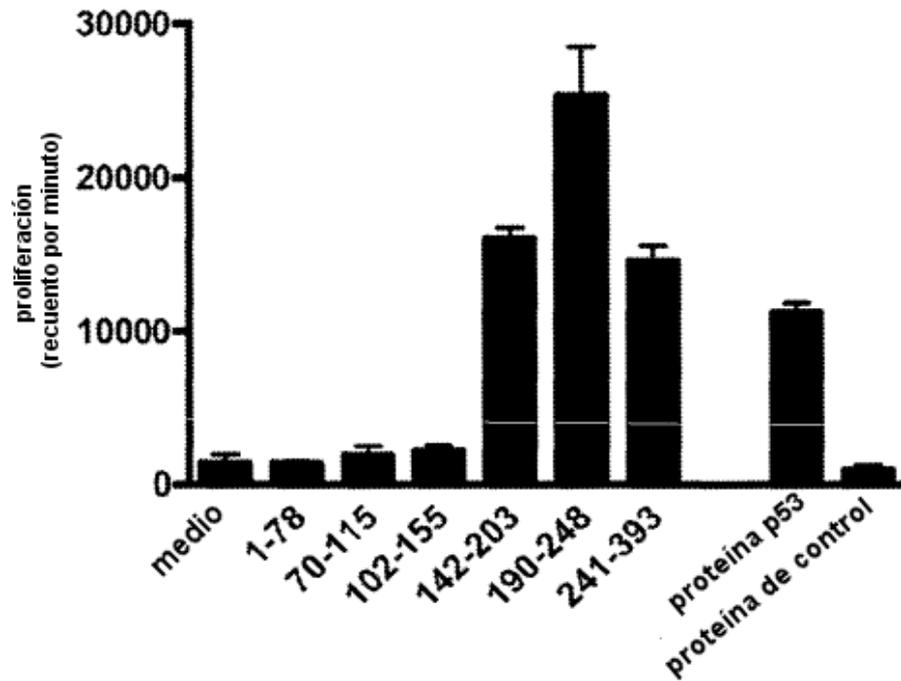


Fig 10

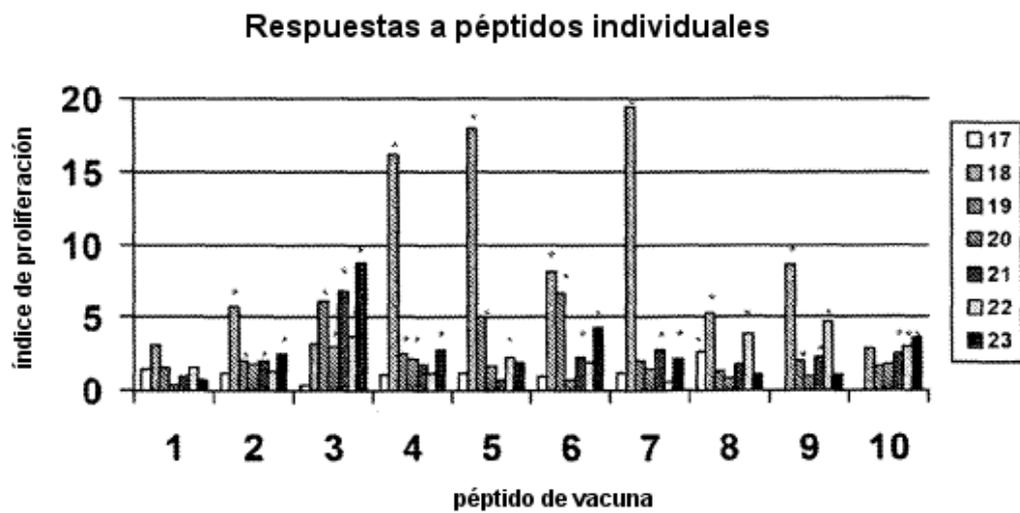
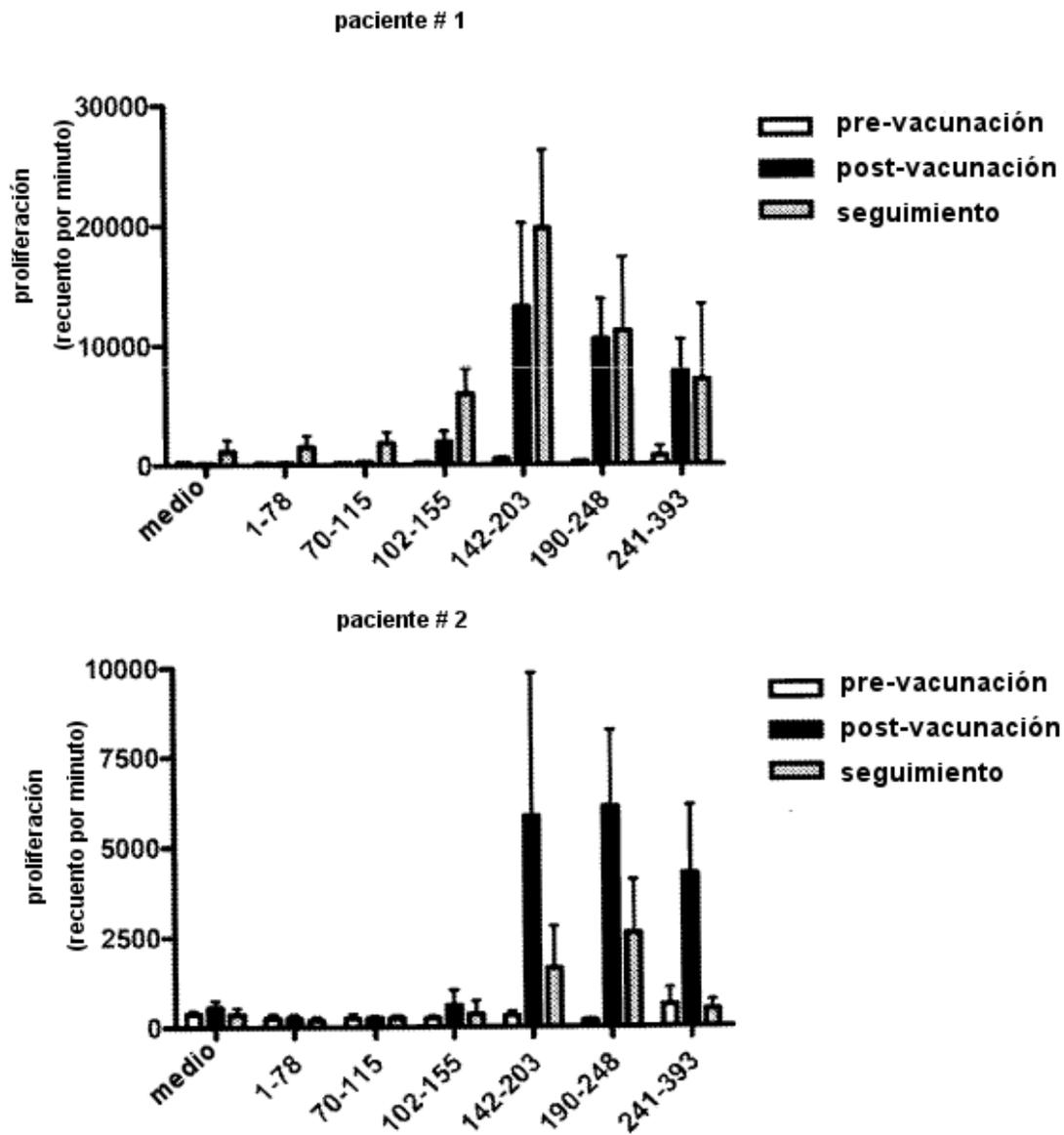


Fig 9



Para ver esta película, debe
disponer de QuickTime™ y de
un descompresor TIFF (Uncompressed).

Fig 12

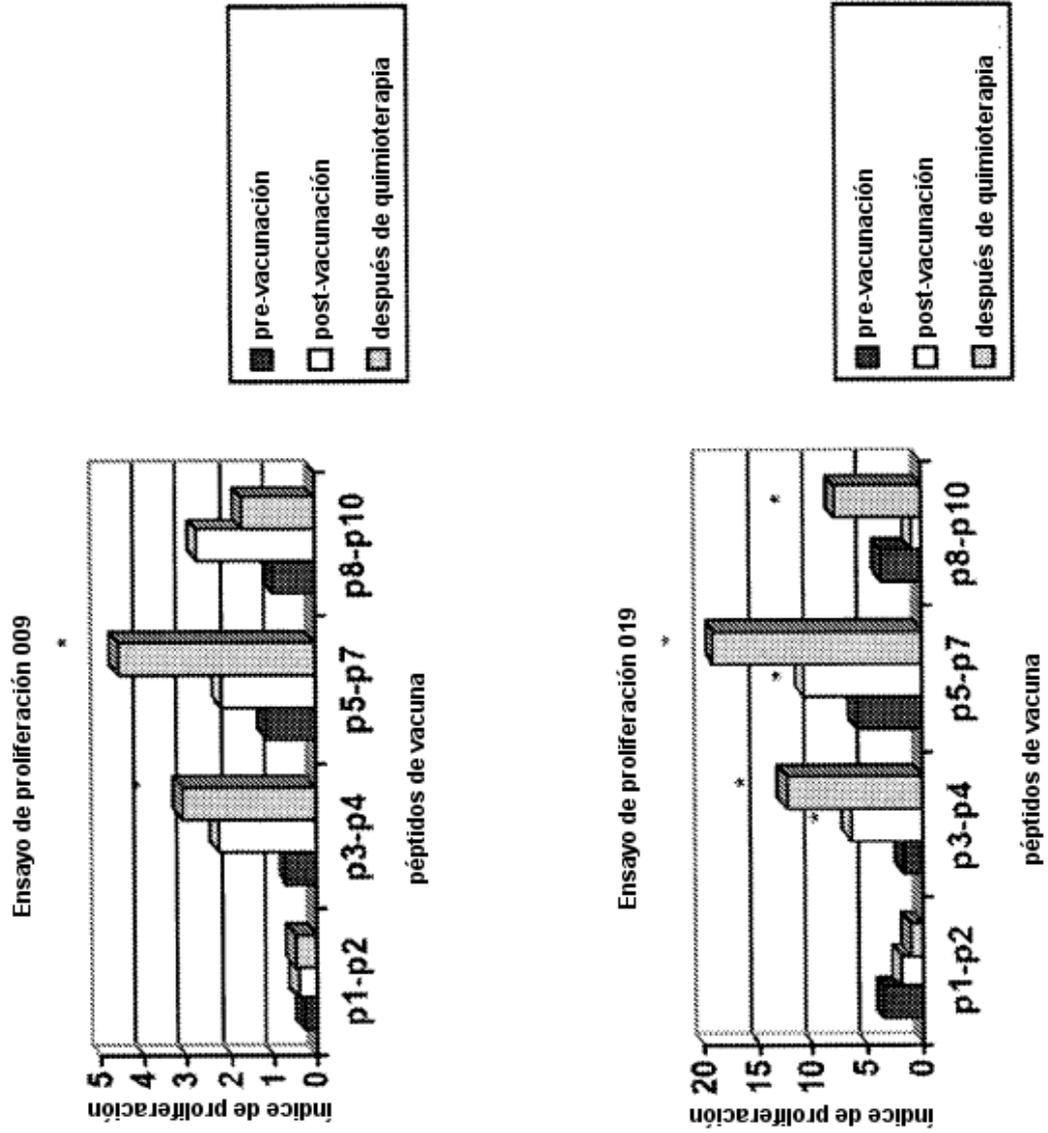


Fig 13a

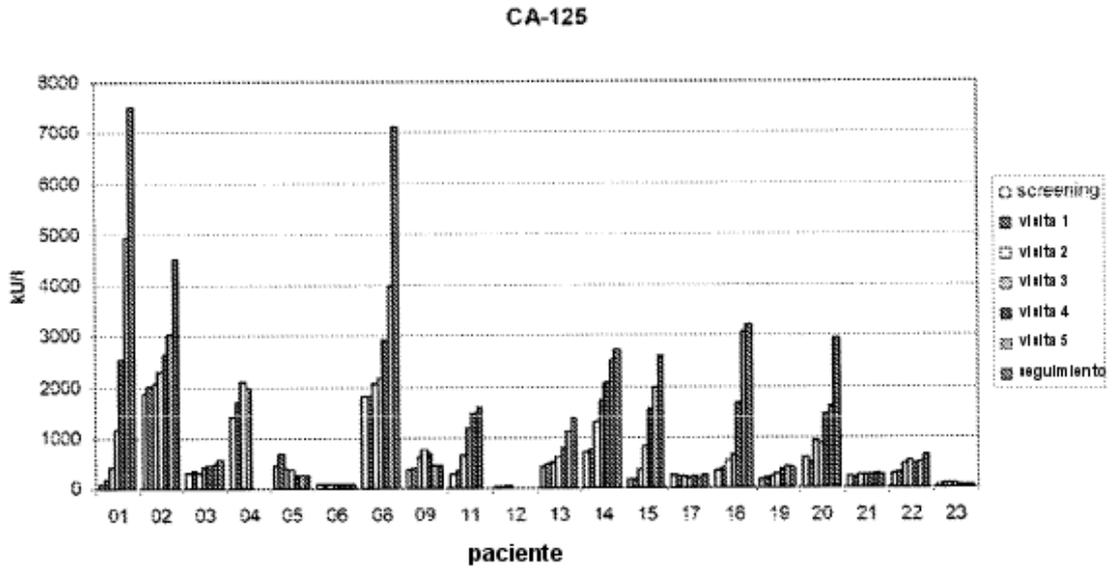


Fig 13b

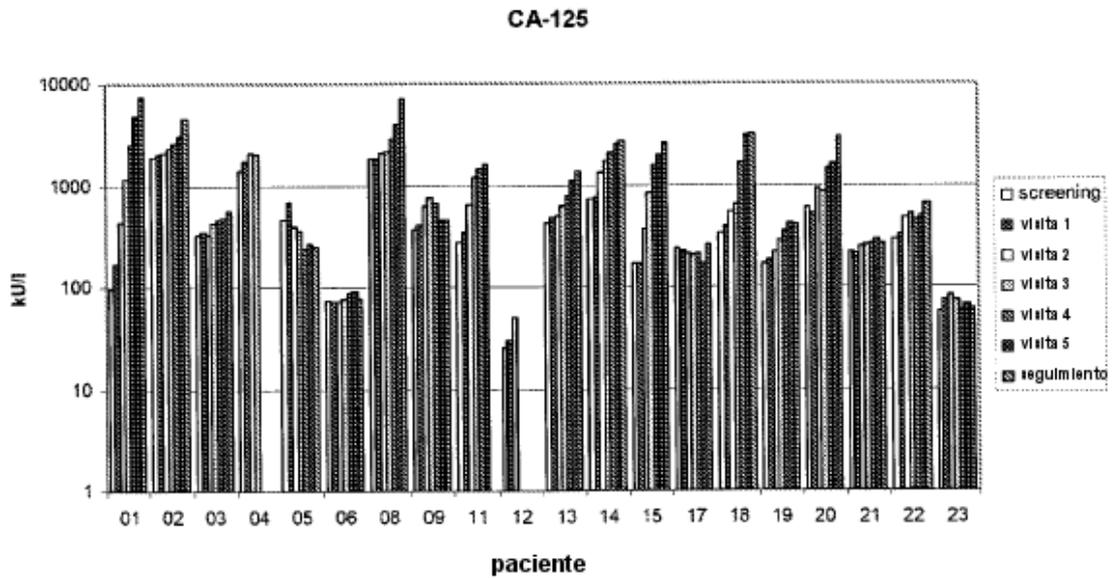


Fig 14

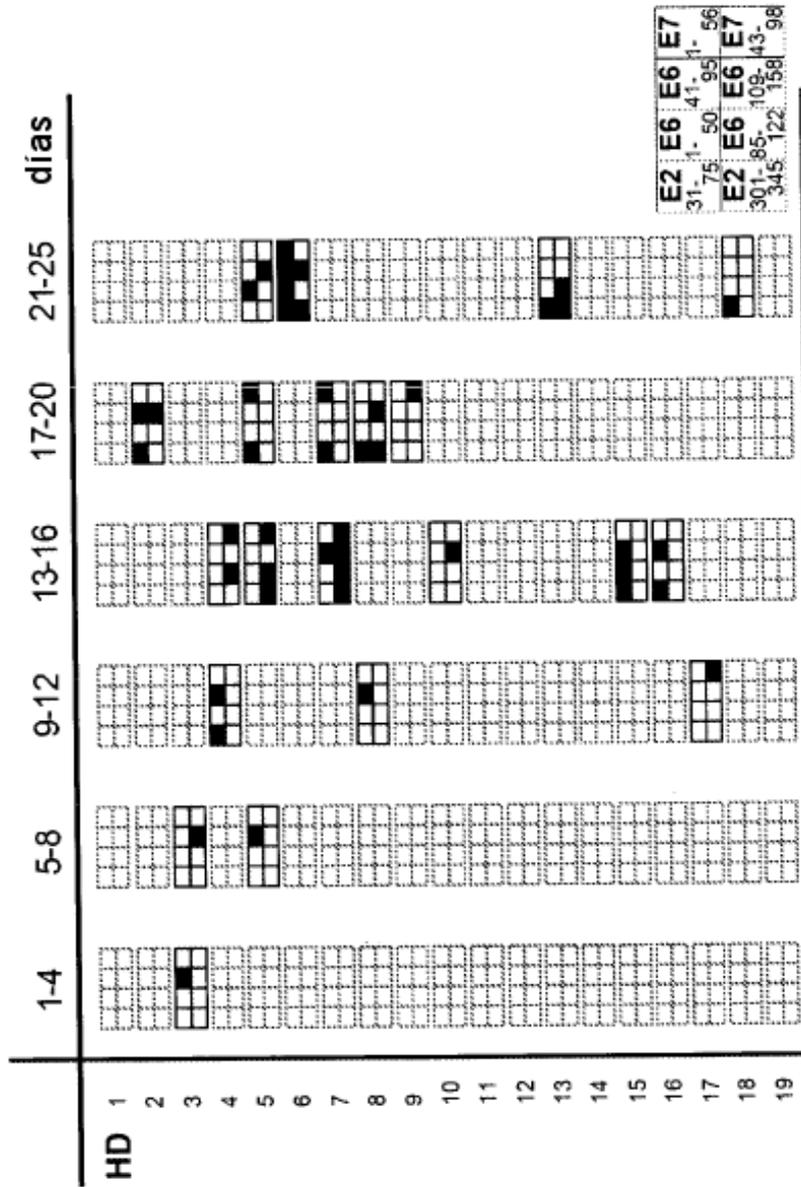


Fig 15

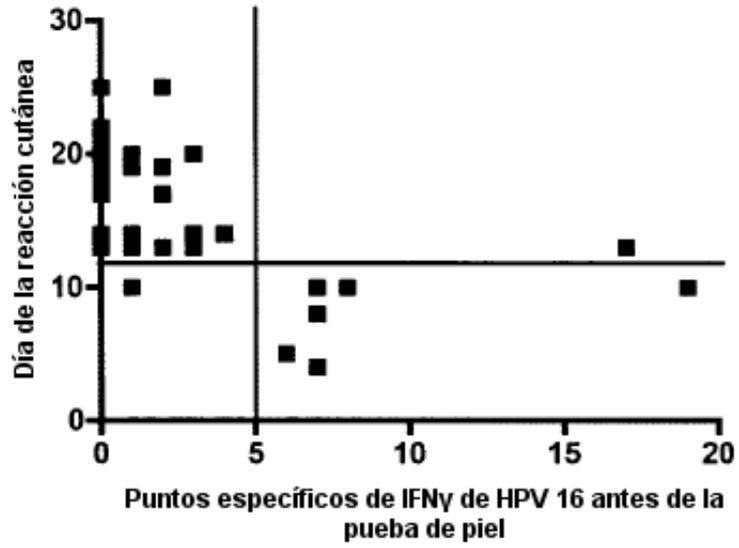


Fig 16

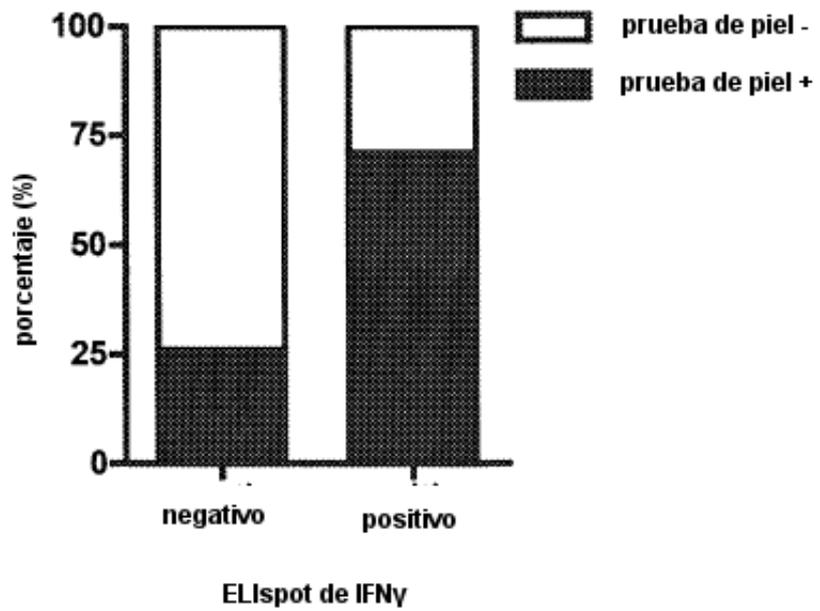


Fig 17

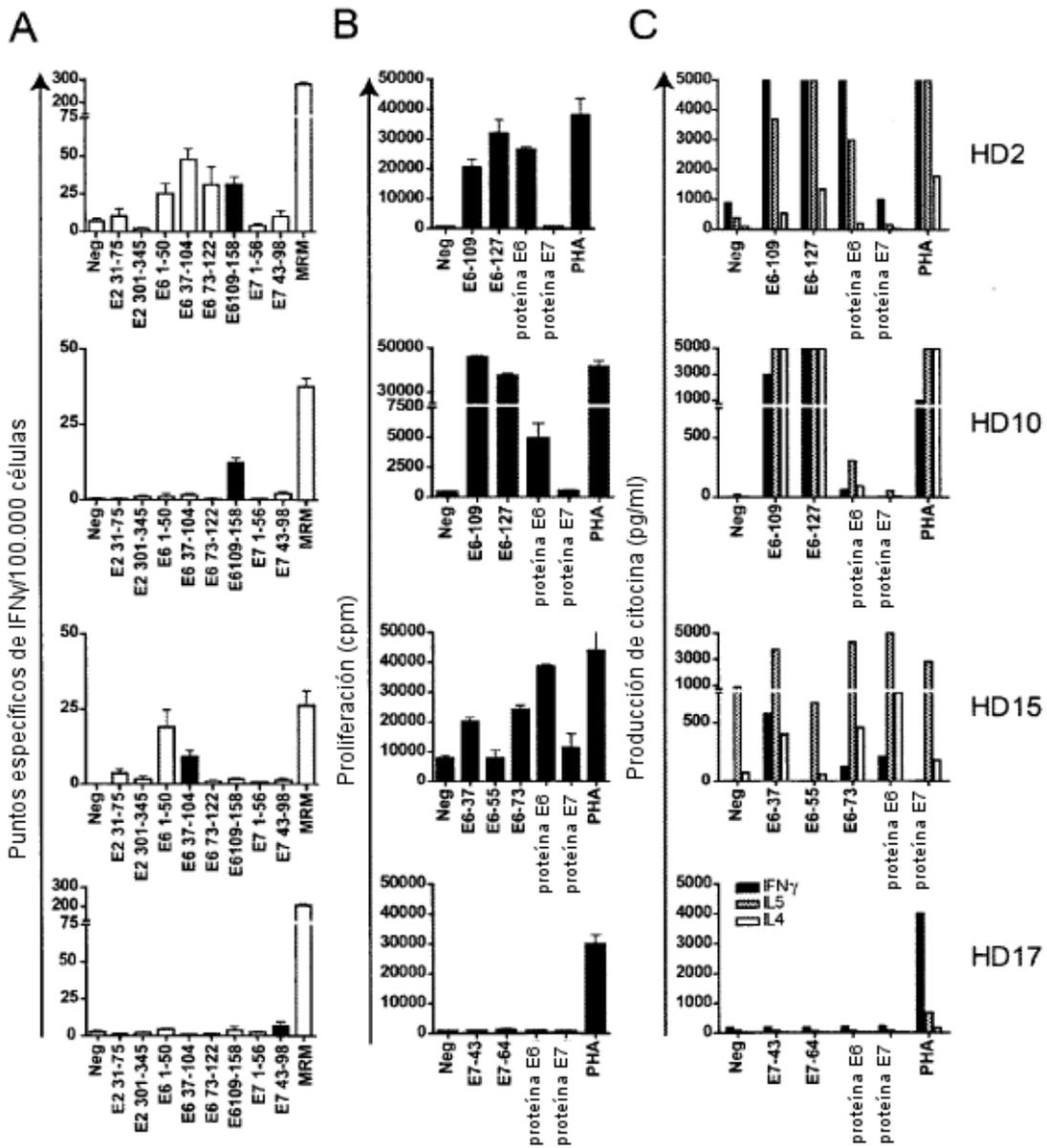


Fig 18

