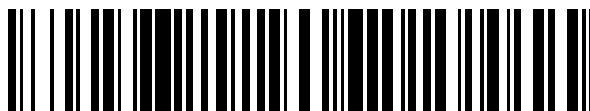


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 599**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2006 E 06790800 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1948225**

54 Título: **Uso de liposomas en un vehículo que comprende una fase hidrofóbica continua como un vehículo para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

07.10.2005 CA 2523032

13.01.2006 CA 2533705

07.04.2006 CA 2542212

05.07.2006 US 806573 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2014

73 Titular/es:

**IMMUNOVACCINE TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
SUITE 303, 1819 GRANVILLE STREET
HALIFAX, NOVA SCOTIA B3J 3R1, CA**

72 Inventor/es:

**DAFTARIAN, PIROUZ M.;
MANSOUR, MARC;
POHAJDAK, BILL;
BROWN, ROBERT G. y
KAST, WIJBE M.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 451 599 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

Uso de liposomas en un vehículo que comprende una fase hidrofóbica continua como un vehículo para el tratamiento del cáncer

5 La presente solicitud se refiere al uso de una composición que comprende liposomas y una fase hidrofóbica continua como un vehículo para la administración de un antígeno capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) en el tratamiento del cáncer.

10 En la técnica se han descrito previamente vacunas duraderas que comprenden liposomas y una variedad de antígenos. Se ha mostrado que estas composiciones de vacuna son eficaces en la inducción de una respuesta inmune humoral aumentada (determinada por una producción incrementada de anticuerpos) frente a un antígeno específico, que depende de la función de T auxiliar 2 (Th2). Sin embargo, para que una composición actúe adversamente sobre el cáncer, debe ser capaz de inducir una respuesta mediada por células (de linfocitos T citotóxicos (CTL)). Un CTL es un subgrupo de linfocitos T que es capaz de inducir la muerte de células somáticas infectadas o tumorales; matan (lisan) a las células que están infectadas con virus (u otros patógenos) o que están dañadas de otra manera o son disfuncionales. Una respuesta de CTL está mediada por citoquinas de T auxiliar 1 (Th1).

15 En general, las respuestas de CTL son cortas, durando sólo varias semanas (Knutson *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 8(5): 1014-1018, 1990; Dudley *et al.*, *J. Immunother.* 24(4): 363-73, 2002; y Fernando *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 47(5): 459-65, 1998). La recurrencia del cáncer siempre es una preocupación, así la inducción de una respuesta CTL duradera es necesaria para asegurar que los cánceres no recurran.

20 Richards *et al.*, *Immunology and Cell Biology* (2004), describen la actividad adyuvante de una emulsión de aceite en agua en la que liposomas que contienen el lípido A y el antígeno encapsulado funcionan como el agente emulsionante usando gp140 oligomérico derivado de la cubierta de VIH-1 como el antígeno. Los autores concluyeron que las emulsiones de aceite en agua liposomales estables proporcionan medios eficaces para obtener respuestas tanto de anticuerpo como CTL frente a un antígeno de cubierta de VIH.

25 Así, permanece una necesidad para el desarrollo de composiciones inmuno-terapéuticas duraderas para uso en el tratamiento del cáncer, sin la necesidad de múltiples tratamientos de refuerzo.

En una realización, se proporciona una composición que comprende: un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrofóbica; liposomas; y al menos un antígeno capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺. La composición también comprende preferiblemente al menos un epítopo de T auxiliar.

En las figuras, que ilustran las realizaciones de la invención:

30 La Figura 1 ilustra la tinción *ex vivo* de IFN- γ intracelular de esplenocitos de ratones expuestos a un epítopo E7 de HPV 16 (péptido R9F; SEQ ID NO: 1), un péptido irrelevante o sin péptido 14 días después del tratamiento con una composición que comprende oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) (SEQ ID NO: 12), y péptido R9F fusionado con PADRE encapsulado en liposomas contenidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA. Ninguno de los tratamientos control causó la expansión de las células T CD8⁺/IFN- γ por encima de los niveles basales cuando se expusieron a post-tratamiento con R9F (datos no mostrados). Por el contrario, ocurrió un incremento de 12,9 veces de los CTL que respondían a R9F en esplenocitos de ratones expuestos al péptido R9F comparado con ratones expuestos al péptido irrelevante.

40 La Figura 2 ilustra la lisis de células EL-4 cargadas con péptido R9F (SEQ ID NO: 1) (cuadrados) y cargadas con péptido irrelevante (diamantes) por esplenocitos de ratones tratados 30 días antes con una composición que comprende péptido R9F fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10) y encapsulado con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA.

45 La Figura 3 ilustra la lisis de células EL-4 por esplenocitos de ratones tratados con una de las composiciones siguientes: (i) un péptido de fusión (péptido R9F (SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10)) y CpG ODN (SEQ ID NO: 12) encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA (diamantes); (ii) péptido de fusión y CpG ODN no encapsulado (SEQ ID NO: 12) en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA (triángulos y cruces), o (iii) péptido de fusión encapsulado en liposomas en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA (círculos cerrados). Los esplenocitos se expusieron al péptido R9F (cruces, diamantes y círculos cerrados) o a un péptido irrelevante (SEQ ID NO: 13) (triángulos y círculos abiertos) 130 días después del tratamiento. Los esplenocitos de ratones tratados con el péptido de fusión solo mostraron niveles basales de lisis de células EL-4 expuestas a R9F o a un péptido irrelevante 130 días después del tratamiento (datos no mostrados).

50

La Figura 4 ilustra el efecto de una única administración de una composición que comprende CpG ODN, un péptido de fusión (péptido R9F (SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10)) encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA (cuadrados abiertos) en el tamaño de tumores C3 de 14 días en ratones. Los tumores eran indetectables por palpación hacia el día 30 (16 días después del tratamiento). Por el contrario, los tumores C3 en ratones a los que se proporcionó un tratamiento control que comprende la composición como se ha descrito anteriormente en ausencia de un péptido de fusión (cuadrados cerrados) continuó incrementando en tamaño. Todos los ratones (n= 10) se pulsaron con $0,5 \times 10^6$ células tumorales C3 14 días antes del tratamiento. La diferencia en tamaño de los tumores en los dos grupos de tratamiento fue estadísticamente significativa ($p= 0,002$ en el día 25).

La Figura 5 ilustra el efecto del tratamiento profiláctico en el porcentaje de ratones que no tienen tumor 61 días después del pulso con $0,5 \times 10^6$ células C3. Los grupos de tratamiento consistieron en ratones tratados con una de las composiciones siguientes que comprenden: (1) PBS; (2) CpG en PBS; (3) péptido de fusión (péptido R9F (SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10)) en PBS; (4) péptido de fusión encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA; (5) péptido de fusión y CpG ODN en una emulsión de agua en aceite; (6) péptido de fusión y CpG ODN encapsulados en liposomas; (7) péptido de fusión y el lipopéptido, Pam3Cys-SK KKK (Pam3c) encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite.

La Figura 6 ilustra la detección *ex vivo* de esplenocitos que producen $IFN-\gamma$ específicos de TRP-2 (células formadoras de manchas, SFC) en ratones 8 días después de un único tratamiento con una de los siguientes: (A) una composición que comprende un péptido de proteína relacionada con tirosina 2 (TRP-2) (S9L; SEQ ID NO: 7) con PADRE (SEQ ID NO: 10) y CpG ODN (SEQ ID NO: 12) encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51; (B) una composición que comprende S9L con PADRE en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite; o (C) una composición que comprende un péptido irrelevante (SEQ ID NO: 13) con CpG en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51.

La Figura 7 ilustra la detección *ex vivo* de esplenocitos que producen $IFN-\gamma$ específico de p53 (SFC) en ratones después de un único tratamiento con (A) un péptido p53 modificado (mK9M; SEQ ID NO: 8) con PADRE (SEQ ID NO: 10) y CpG ODN (SEQ ID NO: 12) encapsulados en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51, o una de las composiciones control siguientes: (B) mK9M con PADRE en una emulsión de agua en aceite; (C) mK9M con PADRE encapsulado en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite; y (D) un péptido irrelevante (SEQ ID NO: 13) con CpG encapsulado en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite.

La Figura 8 ilustra la detección *ex vivo* de esplenocitos que producen $IFN-\gamma$ específico de TRP-2 y p53 (SFC) en ratones después de un único tratamiento con una composición que comprende (A) péptidos p53 (péptido mK9M; SEQ ID NO: 8) y TRP-2 (V8L; SEQ ID NO: 6) con PADRE (SEQ ID NO: 10) y CpG ODN (SEQ ID NO: 12) encapsulados en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51, o una de las composiciones control siguientes: (B) péptidos p53 y TRP-2 con PADRE encapsulados en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51; (C) péptidos p53 y TRP-2 con PADRE y CpG ODN; (D) péptidos p53 y TRP-2 con PADRE.

La Figura 9 ilustra el efecto de un único tratamiento con péptidos que contienen el epítipo de CTL HLA-A2 E6/7 en tumores establecidos TC1/A2 de 19 días. Un único tratamiento de una composición que comprende una mezcla de cuatro péptidos HPV E6/7 (Y10T (SEQ ID NO: 2), L9V (SEQ ID NO: 3), T81 (SEQ ID NO: 4), y T10V (SEQ ID NO: 5)) encapsulados en liposomas con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y PADRE (SEQ ID NO: 10) y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51 (cuadrados) o un péptido largo que contiene los cuatro péptidos HPV E6/7 descritos anteriormente unidos entre sí con conectores "aay" (alanina-alanina-tirosina) (péptido AB2; SEQ ID NO: 14) encapsulados en liposomas con CpG ODN y PADRE y suspendidos en una emulsión de agua en aceite (diamantes) erradicó los tumores TC1/A2 hacia los 21 días después del tratamiento. El tratamiento con un péptido E7 de HPV (L9V; SEQ ID NO: 3) encapsulado en liposomas con CpG ODN y PADRE y suspendidos en una emulsión de agua en aceite redujo significativamente el tamaño de los tumores (triángulos). El tratamiento con PBS solo (cruces) no previno el crecimiento tumoral.

La Figura 10 ilustra el crecimiento tumoral en cinco ratones a los que se inyectó PBS solo 19 días después del implante del tumor.

La Figura 11 ilustra el efecto de un único tratamiento con una composición que comprende una mezcla de cuatro péptidos individuales que contienen el epítipo de CTL HLA-A2 E6/7 (Y10T, L9V, T81 y T10V; SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 5, respectivamente) encapsulados en liposomas con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y PADRE (SEQ ID NO: 10) y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51 en el crecimiento de tumores establecidos TC1/A2 de 19 días en cinco ratones.

La Figura 12 ilustra el efecto de un único tratamiento con una composición que comprende un péptido largo (AB2; SEQ ID NO: 14) encapsulado en liposomas con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y PADRE (SEQ ID NO: 10) y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51 en el crecimiento de tumores establecidos TC1/A2 de 19 días en cinco ratones.

5 La Figura 13 ilustra el efecto de un único tratamiento con una composición que comprende un epítipo de CTL HLA-A2 E7 (L9V; SEQ ID NO:13) encapsulado en liposomas con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y PADRE (SEQ ID NO: 10) y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51 en el crecimiento tumoral de tumores establecidos TC1/A2 de 19 días en cinco ratones.

10 La Figura 14 ilustra la detección *ex vivo* de esplenocitos que producen IFN- γ en ratones 9 días después de la inmunización por una única administración de una composición que comprende (A) cuatro péptidos cortos no unidos que contienen el epítipo de CTL HPV-A2 HPV E6/E7 (T81, Y10T, L9V o T10V; SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 5, respectivamente) o (B) dos dipéptidos de longitud media unidos entre sí con un conector "kkp" (Y10T-kkp-L9V (SEQ ID NO: 15) y T81-kkp-T10V (SEQ ID NO: 16)). Ambas composiciones se encapsularon en liposomas con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y PADRE (SEQ ID NO: 10) y se suspendieron en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51. Los bazos de ratones control (C) contenían números basales de esplenocitos que pudieron estimularse con cada péptido corto individual o una
15 mezcla de los cuatro péptidos cortos para producir IFN- γ . Por el contrario, los bazos de los ratones en el grupo inmunizado con cualquiera de los cuatro péptidos cortos no unidos o dos dipéptidos medios contenían mayores números de esplenocitos que se estimularon con estos péptidos para producir IFN- γ . La estimulación de los esplenocitos de los ratones inmunizados con cualquiera de las formulaciones de la invención y estimulados con la mezcla de los cuatro péptidos cortos produjo aproximadamente cinco veces más de esplenocitos que producían IFN- γ comparado con los
20 esplenocitos control lo que indica que los péptidos unidos con "kkp" no tenían efecto en la respuesta inmune.

La Figura 15 muestra el crecimiento de tumores de melanoma en ratones tratados con una de las composiciones siguientes que comprenden al menos un péptido derivado de una proteína asociada a melanoma (TRP-2 o p53) y encapsulado con CpG ODN y PADRE en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite: (i) péptido V8L (SEQ ID NO: 6) (diamantes); (ii) péptido S9L (SEQ ID NO: 7) (cuadrados); (iii) péptido mK9M (SEQ ID NO: 8) (triángulos); (iv) péptidos V8L y mK9M (cruces); y (v) péptidos S9L y mK9M (estrellas). Los ratones control se trataron con PBS solo (círculo). Se administró a los ratones el tratamiento 5 días después del implante del tumor. Cada punto de datos es el tamaño medio de los tumores en cinco ratones.

30 La Figura 16 ilustra el porcentaje de ratones con tumores de melanoma después de tratamiento con una de las composiciones siguientes que comprenden al menos un péptido derivado de una proteína asociada a melanoma (TRP-2 o p53) y encapsulada con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y PADRE (SEQ ID NO: 10) en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51: (i) péptido V8L (SEQ ID NO: 6) (diamantes); (ii) péptido S9L (SEQ ID NO: 7) (cuadrados); (iii) péptido mK9M (SEQ ID NO: 8) (triángulos); (iv) péptidos V8L y mK9M (cruces); y (v) péptidos S9L y mK9M (estrellas). Los ratones control se trataron con PBS solo (círculos). Se administró a los ratones el tratamiento 5 días después del implante del tumor. Cada punto de datos es el tamaño medio de los tumores en cinco ratones.

35 La Figura 17 ilustra la erradicación o reducción de tumores establecidos B16 de 6 días en ratones después de un único tratamiento con una composición que comprende CpG ODN (SEQ ID NO: 12), PADRE y un epítipo CTL TRP-2 y/o p53, encapsulados en liposomas que se suspendieron en PBS y se emulsionaron en ISA51. Un único tratamiento con una mezcla de epítopos CTL TRP-2 y p53 dio lugar a ratones todos sin tumor hacia los 21 días después de la administración (triángulos). Un único tratamiento con TRP-2 (diamantes) o p53 (cuadrados) solo dio lugar al 40% de los ratones sin tumor 33 días después del tratamiento. El tratamiento con PBS en los ratones control no tuvo efecto en la progresión de los tumores (cruces).

45 La Figura 18 ilustra que los tumores C3 se redujeron en tamaño en ratones tratados con una composición que comprende CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y un epítipo E7 de HPV 16 (péptido R9F; SEQ ID NO: 1) encapsulados en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51, seguido de aplicación dérmica de Aldara™ en las 15-20 horas (cuadrados). Por el contrario, los tumores C3 no se redujeron en tamaño en los ratones control que recibieron PBS (cruces) o PBS seguido de aplicación dérmica de Aldara en las 15-20 horas en el sitio de la inyección del PBS (triángulos). El tratamiento se administró 5 días después del implante del tumor en todos los grupos de tratamiento. El tamaño tumoral es el tamaño medio de los tumores en diez ratones.

50 La Figura 19 ilustra el porcentaje de ratones que tienen un tumor palpable después de tratamiento cinco días después del implante del tumor en todos los grupos de tratamiento. Sólo el 20% de los ratones 20 días después del implante del tumor tenían un tumor palpable después de tratamiento con una composición que comprende CpG ODN (SEQ ID NO: 12) y un epítipo E7 de HPV 16 (péptido R9F; SEQ ID NO: 1) encapsulados en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51, seguido de aplicación dérmica de pomada Aldara™ (5% imiquimod) en el sitio de la administración en las 15-20 horas (diamantes). Por el contrario, el 90% de los ratones tenían tumores palpables 20

días después del tratamiento con PBS solo (triángulos) y 100% de los ratones tenían un tumor palpable después de tratamiento con PBS seguido de una aplicación dérmica de Aldara (cuadrados).

La Figura 20 ilustra la detección *ex vivo* de esplenocitos que producen IFN- γ expuestos al antígeno relacionado con melanoma, TRP-2 (péptido S9L; SEQ ID NO: 7), o células B16F10, 8 días después de la inmunización con una única administración de una composición de tratamiento que comprende péptido S9L y un epítipo del toxoide del tétanos (F21E; SEQ ID NO: 11) encapsulados conjuntamente en liposomas con CpG ODN (SEQ ID NO: 12) en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51 (B). Los ratones control se inmunizaron con la composición descrita anteriormente formulada sin el epítipo de T auxiliar del toxoide del tétanos (A). Estaban presentes cinco veces más esplenocitos que fueron estimulados con células B16-F10 para producir IFN- γ en los bazo del grupo inmunizado con la composición de tratamiento de la invención comparado con el grupo control.

La presente solicitud proporciona composiciones que comprenden al menos un antígeno capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ junto con al menos un epítipo de T auxiliar y liposomas suspendidos en un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrofóbica. Además, la invención enseña el uso de dichas composiciones en un método para tratar cáncer en un sujeto.

Las composiciones como se describen en la presente memoria son útiles para tratar un amplio rango de cánceres, incluyendo, sin limitación: cánceres causados por el virus del papiloma humano (HPV), tales como, por ejemplo, cáncer cervical y/o vulvar; cánceres que implican la expresión de tirosinasa, tales como, por ejemplo, melanoma; cánceres que implican mutaciones o sobreexpresión del producto génico p53, tales como, por ejemplo, cáncer de mama o metástasis en los ganglios linfáticos; y otros cánceres como melanoma que expresan más de una proteína asociada a tumor simultáneamente. En otra realización, las composiciones descritas en la presente memoria son útiles para tratar cánceres, incluyendo, sin limitación: pulmón, ovario, mieloma múltiple, linfoma de células B, hepatoma, sarcoma, vejiga, próstata, tiroides, tumores H/N, colon, recto, renal, páncreas, gástrico, adenocarcinoma, leucemia de células T, linfosarcoma, uterino, esofágico, linfomas no de Hodgkin, endometrial, y tumores RCC. Cualquier cáncer que tiene un componente en la superficie celular que es diferente en cantidad o sustancia del tipo celular del que el cáncer deriva es un candidato para tratamiento por la invención. En particular, p53 es una diana candidata para tratamientos de cáncer ampliamente aplicables (DeLeo, A.B., *Crit. Rev. Immunol.*, 18: 29, 1998; Vierboom, M.P.M. et al., *Peptide-Based Cancer Vaccines*. W.M. Kast, ed. Landes Bioscience, Georgetown, 2000).

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "tumor", "células tumorales", "cáncer" y "células cancerosas" (usados indistintamente) se refieren a células que presentan crecimiento anormal, caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular o células que se han inmortalizado. El término "cáncer" o "tumor" incluye cáncer o tumores metastásicos así como no metastásicos. Un cáncer puede diagnosticarse usando los criterios aceptados generalmente en la técnica, incluyendo la presencia de un tumor maligno.

"Tratar" o "tratamiento de" cáncer se refiere a una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no están limitados a, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución del grado de la enfermedad, estabilización del estado de la enfermedad, prevención del desarrollo de la enfermedad, prevención de la diseminación de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, retraso o ralentización del inicio de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total). "Tratar" también puede significar prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento. "Tratar" también puede significar inhibir la progresión de la enfermedad temporalmente, aunque más preferiblemente, implica parar la progresión de la enfermedad permanentemente en un sujeto.

El sujeto que se va a tratar puede ser cualquier vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

Los antígenos adecuados de la composición son aquellos que son capaces de inducir una respuesta inmune mediada por células (CTL) en un sujeto.

La inmunidad mediada por células es una respuesta inmune que no implica anticuerpos sino que implica la activación de macrófagos y células asesinas naturales, la producción de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y la liberación de varias citoquinas en respuesta a un antígeno. Los linfocitos T citotóxicos son un sub-grupo de linfocitos T (un tipo de célula sanguínea blanca) que son capaces de inducir la muerte de células somáticas infectadas o tumorales; matan a las células que están infectadas con virus (u otros patógenos) o están dañadas de otra manera o son disfuncionales.

La mayor parte de las células T citotóxicas expresan receptores de células T que pueden reconocer un antígeno peptídico específico unido a moléculas de MHC Clase I. Estos CTL también expresan CD8 (células T CD8⁺), que está atraído a partes de la molécula de MHC Clase I. Esta afinidad mantiene al CTL y a la célula diana unidos entre sí estrechamente durante a activación específica de antígeno.

La inmunidad celular protege al cuerpo mediante, por ejemplo, la activación de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno que son capaces de lisar células del cuerpo que presentan epítopos de antígeno extraño en su superficie, tales como células infectadas con virus, células con bacterias intracelulares y células cancerosas que presentan antígenos tumorales; la activación de macrófagos y células asesinas naturales, lo que les permite destruir patógenos intracelulares; y la estimulación de células para secretar una variedad de citoquinas que influyen en la función de otras células implicadas en respuestas inmunes adaptativas y respuestas inmunes innatas.

El antígeno puede ser, por ejemplo, un péptido, una proteína o polipéptido adecuada nativa, no nativa, recombinante o desnaturalizada, o un fragmento de ésta, o un epítipo que es capaz de producir una respuesta inmune de CTL en un sujeto.

El término "polipéptido" engloba cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud (por ejemplo, al menos 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 aminoácidos) o modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glicosilación o fosforilación) e incluye, por ejemplo, proteínas naturales, polipéptidos y péptidos sintéticos o recombinantes, epítopos moléculas híbridas, variantes, homólogos, análogos, peptoides, peptidomiméticos, etc. Una variante o derivado por lo tanto incluye delecciones, incluyendo truncamientos y fragmentos; inserciones y adiciones, por ejemplo sustituciones conservativas, mutantes dirigidos a sitio y variantes alélicas; y modificaciones, incluyendo peptoides que tienen uno o más grupos no amino acilo (por ejemplo, azúcar, lípido, etc.) unidos covalentemente al péptido y modificaciones posteriores a la traducción. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sustituciones de aminoácidos conservadas" o "sustituciones conservativas" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro en una localización dada en el péptido, en la que la sustitución puede hacerse sin pérdida sustancial de la función relevante. Haciendo estos cambios, pueden hacerse sustituciones de residuos de aminoácidos semejantes tomando como base la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral, por ejemplo, su tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad y semejantes, y dichas sustituciones pueden ensayarse para su efecto en la función del péptido por ensayo rutinario.

Pueden usarse polipéptidos, péptidos o epítopos que tienen identidad sustancial con los descritos en la presente memoria. Se considera que dos secuencias tienen identidad sustancial si, cuando se alinean de manera óptima (con huecos permitidos), comparten al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, o si las secuencias comparten restos funcionales definidos. En realizaciones alternativas, puede considerarse que las secuencias alineadas de manera óptima son sustancialmente idénticas (es decir, que tienen identidad sustancial) si comparten al menos 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de identidad sobre una región especificada. El término "identidad" se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptido. La identidad puede determinarse comparando cada posición en las secuencias alineadas. Un grado de identidad entre secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos o concordantes en posiciones compartidas por las secuencias, por ejemplo, sobre una región especificada. El alineamiento óptimo de secuencias para comparaciones de identidad puede llevarse a cabo usando una variedad de algoritmos, como se conoce en la técnica, incluyendo el programa ClustalW, disponible en <http://clustalw.genome.ad.jp>, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math 2: 482, el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443, la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 y las implementaciones computerizadas de estos algoritmos (tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete Informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, Madison, WI, EEUU). La identidad de secuencia también puede determinarse usando al algoritmo BLAST, descrito en Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10 (usando los ajustes por defecto publicados). El software para llevar a cabo análisis con BLAST está disponible a través del National Center for Biotechnology Information (a través de internet en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La cantidad de antígeno usada en un único tratamiento con una composición como se describe en la presente memoria puede variar dependiendo del tipo de antígeno y el tamaño del sujeto. Un experto en la técnica será capaz de determinar, sin experimentación excesiva, la cantidad eficaz de antígeno para usarse en una aplicación particular. El término "cantidad eficaz" tal y como se usa en la presente memoria significa una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado deseado.

En una realización, el antígeno puede ser al menos un epítipo de CTL capaz de inducir una respuesta CTL. Por ejemplo, el antígeno puede ser un epítipo de CTL derivado de un virus, tal como HPV.

Se describe que el antígeno puede ser un epítipo de CTL seleccionado del grupo que consiste en un epítipo derivado de la proteína E6 o E7 de HPV.

Se describe que el epítipo de la proteína E6 de HPV comprende la secuencia peptídica TIHDIILECV (T10V) (SEQ ID NO: 5). En otra realización, el epítipo de la proteína E7 de HPV comprende una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en RAHYNIVTF (R9F) (SEQ ID NO: 1), YMLDLQPETT (Y10T) (SEQ ID NO: 2), LLMGTLGIV (L9V) (SEQ ID NO: 3) y TLGIVCPI (T81) (SEQ ID NO: 4).

Se describe que el epítipo de CTL puede ser un epítipo de una proteína asociada a tumor, tal como por ejemplo, una proteína asociada a melanoma. En una realización más, la proteína asociada a melanoma es una proteína relacionada con tirosina 2 (TRP-2) o p53, que puede obtenerse por varios métodos incluyendo tecnología recombinante o síntesis química.

5 Se describe que un epítipo de una proteína derivada de TRP-2 comprende la secuencia peptídica, por ejemplo, SVYDFFVWL (S9L; SEQ ID NO: 7). En otra realización, un epítipo de una proteína derivada de TRP-2 comprende la secuencia peptídica VYDFFWL (V8L; SEQ ID NO: 6). En otra realización, un epítipo de una proteína derivada de p53 comprende una secuencia peptídica seleccionada de KYMCNSSCM (K9M; p53 de tipo salvaje; SEQ ID NO: 9),
 10 KYICNSSCM (mK9M; p53 modificado; SEQ ID NO: 8) y AKXVAAWTLKAAKYICNSSCM (mK9M (SEQ ID NO: 9) acoplada a PADRE (SEQ ID NO: 10)).

En una realización, la composición puede comprender una mezcla de epítopos de CTL como antígenos para inducir una respuesta CTL.

15 Se describe que el antígeno puede ser cualquier péptido o polipéptido que es capaz de inducir una respuesta específica de CTL que es capaz de reconocer eficazmente una conformación específica en células tumorales diana y causar su destrucción.

Se describe que el antígeno puede comprender una secuencia peptídica seleccionada de la tabla siguiente:

Tabla 1.

Antígeno	Secuencia	HLA	Patente
Mart-1/ Melan-A	AAGIGILTV (SEQ ID NO: 18)	A2	US 5,844,075
	EAAGIGILTV (SEQ ID NO: 19)	A2	US 5,844,075
	ILTVILGVL (SEQ ID NO: 20)	A2	US 5,844,075
	AEEAAGIGIL (SEQ ID NO: 21)	B45	US 7,037,509
	AEEAAGIGILT (SEQ ID NO: 22)	B45	Desconocida
MC1R	TILLGIFFL (SEQ ID NO: 23)	A2	Desconocida
	FLALIICNA (SEQ ID NO: 24)	A2	Desconocida
Gp100	KTWGQYWQV (SEQ ID NO: 25)	A2	US 5,844,075

Antígeno	Secuencia	HLA	Patente	
Gp100	AMLGHTHTMEV (SEQ ID NO: 26)	A2	Desconocida	
	MLGHTHTMEV (SEQ ID NO: 27)	A2	Desconocida	
	SLADTNSLAV (SEQ ID NO: 28)	A2	US 5,844,075	
	ITDQVPFSV (SEQ ID NO: 29)	A2	US 5,844,075	
	LLDGTATLRL (SEQ ID NO: 30)	A2	US 5,844,075	
	YLEPGPVTA (SEQ ID NO: 31)	A2	US 5,844,075	
	VLYRYGSFSV (SEQ ID NO: 32)	A2	US 5,844,075	
	RLPRIECSC (SEQ ID NO: 33)	A2	Desconocida	
	LIYRRRLMK (SEQ ID NO: 34)	A3	Desconocida	
	ALNFPGSQK (SEQ ID NO: 35)	A3	Desconocida	
	SLIYRRRLMK (SEQ ID NO: 36)	A3	Desconocida	
	ALLAVGATK (SEQ ID NO: 37)	A3	US 6,558,671	
	ALLAVGATK (SEQ ID NO: 38)	A3	US 6,977,074	
	VYFFLPDHL (SEQ ID NO: 39)	A24	Desconocida	
	SNDGPTLI (SEQ ID NO: 40)	Cw8	Desconocida	
	PSA	VSHSFPHPLY (SEQ ID NO: 41)	A1	US 6,037,135
		FLTPKKLQCV (SEQ ID NO: 42)	A2	US 6,881,405
		VISNDVCAQV (SEQ ID NO: 43)	A2	Desconocida
PSM	HSTNGVTRII (SEQ ID NO: 44)	A1	Desconocida	
Tirosinasa	KCDICTDEY (SEQ ID NO: 45)	A1	US 7,019,112	
	SSDYVIPIGTY (SEQ ID NO: 46)	A1	Desconocida	

Antígeno	Secuencia	HLA	Patente
Tirosinasa	YMDGTMSQV (SEQ ID NO: 47)	A2	US 6,096,313
	MLLAVLYCL (SEQ ID NO: 48)	A2	US 6,291,430
	AFLPWHRLF (SEQ ID NO: 49)	A24	US 6,291,430
	SEIWRDIDF (SEQ ID NO: 50)	B44	US 6,291,430
	MSLQRQFLR (SEQ ID NO: 51)	A31	US 5,831,016
TRP1	SVYDFFVWL (SEQ ID NO: 52)	A2	US 7,067,120
TRP2	TLDSQVMSL (SEQ ID NO: 53)	A2	Desconocida
	LLGPGRPYR (SEQ ID NO: 54)	A31	US 5,831,016
p53	ANDPIFVVL (SEQ ID NO: 55)	Cw8	Desconocida

Como se ha indicado anteriormente en la Tabla 1, las proteínas (polipéptidos) varían en el número de secuencias peptídicas que pueden servir como epítomos de CTL y consecuentemente pueden usarse en la presente invención. Los genes siguientes, sin limitación, codifican proteínas asociadas a tumores que tienen secuencias peptídicas que pueden incorporarse como antígenos: p53, HPV E6 y E7, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, HER2/neu, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RUI, RU2, SART-1, SART-3, WT1, PSA, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1/Melan A, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, BAGE, DAM-6, DAM-10, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, NA88-A, NY-ESO-1, NY-ESO-1a (CAG-3), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, Ras, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2 y 707-AP.

Epítomos de T auxiliar

Los epítomos de T auxiliar son una secuencia de aminoácidos (aminoácidos naturales o no naturales) que tienen actividad de T auxiliar. Los epítomos de T auxiliar son reconocidos por los linfocitos T auxiliares, que juegan un papel importante en establecer y maximizar las capacidades del sistema inmune y están implicados en activar y dirigir otras células inmunes, tales como los linfocitos T citotóxicos.

Un epítomo de T auxiliar puede consistir en un epítomo continuo o discontinuo. Por lo tanto, cada aminoácido de un T auxiliar no es necesariamente parte del epítomo. De acuerdo con esto, los epítomos de T auxiliar, incluyendo análogos y segmentos de epítomos de T auxiliar, son capaces de aumentar o estimular una respuesta inmune. Los epítomos de T auxiliar inmunodominantes son ampliamente reactivos en poblaciones animales y humanas con tipos de MHC ampliamente divergentes (Celis *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140: 1808-1815; Demotz *et al.* (1989) *J. Immunol.* 142: 394-402; Chong *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 60: 4640-4647). El dominio de T auxiliar de los péptidos objeto tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 aminoácidos y preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos. Cuando están presentes múltiples epítomos de T auxiliar, entonces cada epítomo de T auxiliar actúa independientemente.

En una realización, la composición descrita en la presente memoria también comprende al menos un epítomo de T auxiliar. En algunos casos, el epítomo de T auxiliar puede formar parte del antígeno. En particular, si el antígeno tiene un tamaño suficiente, puede contener un epítomo que funciona como un epítomo de T auxiliar. En otras realizaciones, el epítomo de T auxiliar es una molécula separada del antígeno.

Se describe que los análogos de epítomos de T auxiliar pueden incluir sustituciones, deleciones e inserciones de uno a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos en el epítomo de T auxiliar. Los segmentos de T auxiliar son partes

contiguas de un epítipo de T auxiliar que son suficientes para aumentar o estimular una respuesta inmune. Un ejemplo de segmentos de T auxiliar es una serie de péptidos superpuestos que derivan de un único péptido más largo.

Las fuentes de epítipos de T auxiliar incluyen, por ejemplo, epítipos de células T auxiliares del antígeno de la superficie de la hepatitis B, epítipos de células T auxiliares de la toxina pertussis, epítipo de células T auxiliares de la proteína F del virus del sarampión, epítipo de células T auxiliares de la proteína principal de la membrana externa de *Chlamydia trachomatis*, epítipos de células T auxiliares de la toxina de la difteria, epítipos de células T auxiliares de circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum*, epítipos de células T auxiliares de la triosa fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, epítipos de células T auxiliares de TraT de *Escherichia coli* y análogos y segmentos que aumentan la respuesta inmune de cualquiera de estos epítipos de T auxiliar.

En una realización, el epítipo de T auxiliar es un epítipo de T auxiliar universal. Un epítipo de T auxiliar universal tal como se usa en la presente memoria se refiere a un péptido u otra molécula inmunogénica, o un fragmento de ésta, que se une a una multiplicidad de moléculas de MHC clase II de una manera que activa la función de las células T de una manera restringida a la clase II (células T CD4⁺) o la clase I (células T CD8⁺).

El epítipo de T auxiliar puede ser un epítipo de T auxiliar universal tal como PADRE (epítipo pan-DR) que comprende la secuencia peptídica AKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 10), en el que X puede ser ciclohexilalanil. PADRE tiene específicamente un epítipo de T auxiliar CD4⁺, esto es, estimula la inducción de una respuesta de T auxiliar CD4⁺ específica de PADRE.

El toxoide del tétanos tiene epítipos de T auxiliar que funcionan de una manera similar a PADRE. Las toxinas del tétanos y la difteria tienen epítipos universales para células CD4⁺ humanas. (Diethelm-Okita, B.M. *et al.*, Universal epitopes for human CD4⁺ cells on tetanus and diphtheria toxins. *J. Infect. Diseases*, 181: 1001-1009, 2000). El epítipo de T auxiliar puede ser un péptido toxoide del tétanos tal como F21E que comprende la secuencia peptídica FNNFTVSWFLRVPKVSASHLE (aminoácidos 947-967; SEQ ID NO: 11).

En otra realización, el epítipo de T auxiliar se fusiona con al menos un antígeno (es decir, un péptido) o una mezcla de antígenos, para hacer un péptido de fusión.

25 Vehículos

El vehículo de la composición comprende una fase continua de una sustancia hidrofóbica, preferiblemente una sustancia hidrofóbica líquida. La fase continua puede ser una sustancia hidrofóbica esencialmente pura o una mezcla de sustancias hidrofóbicas. Además, el vehículo puede ser una emulsión de agua en una sustancia hidrofóbica o una emulsión de agua en una mezcla de sustancias hidrofóbicas, siempre que la sustancia hidrofóbica constituya la fase continua. Además, el vehículo puede funcionar como un adyuvante.

Las sustancias hidrofóbicas que son útiles en las composiciones como se describen en la presente memoria son aquellas que son farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. El vehículo es preferiblemente un líquido pero determinadas sustancias hidrofóbicas que no son líquidos a temperatura atmosférica pero pueden licuarse, por ejemplo por calentamiento, y también son útiles en esta invención. El vehículo hidrofóbico puede ser una emulsión PBS/FIA.

Las emulsiones de aceite o agua en aceite son vehículos particularmente adecuados para uso en la presente invención. Los aceites deben ser farmacéuticamente y/o inmunológicamente aceptables. Los ejemplos preferidos de aceites son aceite mineral (especialmente aceite mineral ligero o de viscosidad baja), aceite vegetal (por ejemplo aceite de maíz o de colza), aceite de fruto seco (por ejemplo, aceite de cacahuete) y escualeno. Un aceite mineral de viscosidad baja es lo más preferido. También pueden usarse las grasas animales y materiales poliméricos hidrofóbicos artificiales, particularmente aquellos que son líquidos a temperatura atmosférica o que pueden licuarse relativamente fácilmente.

Liposomas

Los liposomas son membranas con bicapa lipídica completamente cerrada que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilamelares (que poseen una membrana con una única bicapa) o vesículas multilamelares caracterizadas por bicapas multimembrana, cada bicapa puede estar o no separada de la siguiente por una capa acuosa. Una discusión general de liposomas puede encontrarse en Gregoriadis G. *Immunol. Today*, 11: 89-97, 1990; y Frezard, F., *Braz. J. Med. Bio. Res.*, 32: 181-189, 1999.

Aunque puede usarse cualquier liposoma en esta invención, incluyendo liposomas preparados a partir de lípidos de arqueobacterias, los liposomas particularmente útiles usan fosfolípidos y colesterol no esterificado en la formulación del liposoma. El colesterol se usa para estabilizar los liposomas y cualquier otro compuesto que estabiliza los liposomas puede reemplazar al colesterol. Otros compuestos que estabilizan los liposomas son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los fosfolípidos saturados producen liposomas con temperaturas de transición mayores lo que

indica una estabilidad incrementada. Para evitar limitar la asociación electrostática entre el antígeno y los liposomas, el antígeno puede secuestrarse en el interior de los liposomas.

Los fosfolípidos que se usan preferiblemente en la preparación de liposomas son aquellos con al menos un grupo de cabeza seleccionado del grupo que consiste en fosfoglicerol, fosfoetanolamina, fosfoserina, fosfocolina y fosfoinositol. Más preferidos son los liposomas que comprenden lípidos en fosfolipon 90 G. Cuando también se usa colesterol no esterificado en la formulación de liposomas, el colesterol se usa en una cantidad equivalente a aproximadamente 10% de la cantidad de fosfolípido. Si se usa un compuesto distinto del colesterol para estabilizar los liposomas, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad necesaria en la composición.

Las composiciones de liposomas pueden obtenerse, por ejemplo, usando lípidos naturales, lípidos sintéticos, esfingolípidos, lípidos éter, esteroides, cardiolipina, lípidos catiónicos y lípidos modificados con poli (etileno glicol) y otros polímeros. Los lípidos sintéticos pueden incluir los constituyentes de ácidos grasos siguientes; lauroil, miristoil, palmitoil, estearoil, araquidoil, oleoil, linoleoil, erucoil o combinaciones de estos ácidos grasos.

Adyuvantes

La composición puede comprender además uno o más adyuvantes, excipientes, etc., farmacéuticamente aceptables, como se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EEUU 1985) y La Farmacopea de los Estados Unidos: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada en 1999. En una realización, los adyuvantes adecuados incluyen un oligodesoxinucleótido que contiene CpG (CpG ODN). Por ejemplo, 5'-TCCATGACGTTTCCTGACGTT-3'. El experto en la técnica puede seleccionar un CpG apropiado tomando como base la especie diana y la eficacia. En lugar de CpG, puede usarse un lipopéptido, tal como Pam3Cys-SKKK (EMC Microcollections, Alemania) o variantes, homólogos y análogos de éste. A este respecto, se ha mostrado que la familia Pam2 de lipopéptidos es una alternativa eficaz a la familia Pam3 de lipopéptidos.

La cantidad de adyuvante usada depende de la cantidad de antígeno y del tipo de adyuvante. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de adyuvante necesaria en una aplicación particular.

Composiciones

En una realización, las composiciones como se describen en la presente memoria pueden formularse encapsulando un antígeno (definido como una sustancia que interacciona específicamente con anticuerpo libre y/o con receptores de unión a antígeno en linfocitos) o un complejo antígeno/adyuvante en liposomas para formar un antígeno encapsulado en liposomas y mezclando el antígeno encapsulado en liposomas con un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrofóbica. Si no se usa un complejo antígeno/adyuvante en la primera etapa, puede añadirse un adyuvante adecuado al antígeno encapsulado en liposomas, a la mezcla de antígeno encapsulado en liposomas y vehículo o al vehículo antes de mezclar el vehículo con el antígeno encapsulado en liposomas. El orden del proceso puede depender del tipo de adyuvante usado. El antígeno encapsulado en liposomas resultante se mezcla con el vehículo. (Debe indicarse que el término "antígeno encapsulado en liposomas" puede referirse a la encapsulación en liposomas del antígeno solo o a la encapsulación del complejo antígeno/adyuvante dependiendo del contexto.). Esto estimula el contacto íntimo entre el adyuvante y el antígeno y puede, al menos en parte, ser responsable de la buena respuesta inmune. Para facilitar el uso de algunos adyuvantes, el antígeno puede encapsularse en primer lugar en liposomas y el antígeno encapsulado en liposomas resultante se mezcla entonces con el adyuvante en un vehículo que comprende una fase continua de sustancia hidrofóbica.

En la formulación de una composición que carece sustancialmente de agua, el antígeno o complejo antígeno/adyuvante puede encapsularse con liposomas, que pueden o no estar liofilizados y suspenderse en una sustancia hidrofóbica. En la formulación de una composición en una emulsión de agua en una sustancia hidrofóbica, el antígeno o complejo antígeno/adyuvante puede encapsularse en liposomas, suspenderse en un medio acuoso seguido de mezclado del medio acuoso con una sustancia hidrofóbica para formar una emulsión. En el caso de la emulsión, para mantener la sustancia hidrofóbica en la fase continua, el medio acuoso que contiene los liposomas puede añadirse en alícuotas con mezclado a la sustancia hidrofóbica.

En una realización, el antígeno o el antígeno encapsulado en liposomas puede estar liofilizado antes de mezclarse con la sustancia hidrofóbica o con el medio acuoso según sea el caso. En otra realización, un complejo antígeno/adyuvante puede encapsularse por liposomas seguido de liofilización. En una realización más, el antígeno puede encapsularse en liposomas seguido de la adición de adyuvante y liofilización para formar un antígeno encapsulado en liposomas liofilizado con adyuvante externo. En otro caso más, el antígeno puede encapsularse por liposomas seguido de liofilización antes de la adición del adyuvante. La liofilización puede estimular una mejor interacción entre el adyuvante y el antígeno.

5 La formulación del antígeno encapsulado en liposomas en una sustancia hidrofóbica también puede implicar el uso de un emulsionante para estimular una distribución más homogénea de los liposomas en la sustancia hidrofóbica. Los emulsionantes típicos son muy conocidos en la técnica e incluyen oleato de manida (Arlacel™ A), lecitina, Tween™ 80, y Spans™ 20, 80, 83 y 85. El emulsionante se usa en una cantidad eficaz para estimular una distribución homogénea de los liposomas. Típicamente, la proporción en volumen (v/v) de la sustancia hidrofóbica a emulsionante está en el intervalo de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1 siendo preferida una proporción de aproximadamente 10:1.

10 Alternativamente, el antígeno o complejo antígeno/adyuvante puede estar asociado con, en contacto con o separado de los liposomas y no encapsulado en liposomas. La eficacia de la encapsulación en liposomas de algunos antígenos hidrofílicos o complejos antígeno/adyuvante hidrofílicos puede ser baja de manera que después de ponerse en un entorno hidrofóbico o liofilizarse la mayor parte del antígeno se asocia con la superficie externa de los liposomas. Esto representa otra realización de la invención.

15 Un antígeno (péptido o polipéptido) que tiene un epítipo CTL y PADRE (fusionado con el antígeno o separado) pueden encapsularse conjuntamente en liposomas. En otra realización, más de un antígeno puede ponerse conjuntamente en los mismos liposomas. Pueden usarse otras sustancias en lugar de PADRE que tengan un epítipo de T auxiliar, por ejemplo, péptido(s) del toxoide del tétanos. En otra realización, un adyuvante, preferiblemente un ODN que contiene CpG, también puede encapsularse en los liposomas. Los liposomas se suspenden preferiblemente en PBS. Esta suspensión se emulsiona en un vehículo hidrofóbico, por ejemplo, ISA51 o aceite mineral. El resultado es que los liposomas que contienen el o los antígenos y el o los adyuvantes, preferiblemente PADRE y CpG se suspenden en PBS que a su vez se emulsiona en un vehículo hidrofóbico, por ejemplo, ISA51 o aceite mineral.

20 La recurrencia del cáncer es siempre una preocupación, así la inducción de una respuesta CTL duradera es importante para asegurar que los cánceres no recurran. En general, las respuestas CTL son cortas con una duración de sólo varias semanas, sin embargo, las composiciones como se describen en la presente memoria son capaces de inducir una respuesta CTL potente que dura al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 ó 130 días.

25 Los esplenocitos aislados de ratones tratados 130 días antes con una composición que comprende un CpG ODN y un epítipo de CTL de proteína E7 de HPV fusionado con PADRE encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite retuvieron la capacidad de lisar las células EL-4 de linfoma de ratón (Figra 3). Estos resultados indican que las composiciones como se describen en la presente memoria son capaces de inducir una respuesta CTL duradera, que es deseable en el tratamiento del cáncer.

30 El tratamiento con composiciones que comprenden adyuvante CpG ODN y péptidos TRP-2 y/o p53 como antígenos fueron capaces de incrementar el número de esplenocitos que producen interferón gamma (IFN- γ) específico de antígeno necesarios para combatir las células cancerosas (Figuras 6-8). Los antígenos se fusionaron con un epítipo de T auxiliar universal (PADRE) y se encapsularon en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite. Tanto el péptido como las células tumorales que expresan la proteína de la que se derivó el péptido fueron capaces de inducir la producción de IFN- γ , demostrando que el uso de la composición de la invención para administrar antígenos peptídicos resultaba en una respuesta inmune relevante para la diana pretendida.

35 El tratamiento de tumores establecidos con un único tratamiento con composiciones como se describen en la presente memoria fue eficaz para reducir significativamente el tamaño tumoral y el porcentaje de ratones con tumores posteriores al tratamiento (Figuras 9-13 y 15).

40 El tratamiento con composiciones como se describen en la presente memoria puede estar seguido de una aplicación dérmica en el sitio de la administración de una composición adecuada que comprende imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina) o análogos de éste que son miembros de una clase de imidazoquinolinaminas no nucleósido (amina heterocíclica) que activan el sistema inmune a través de la inducción localizada de citoquinas. El imiquimod es un ligando para TLR7 y activa un ámbito de citoquinas semejante a Th1 que incluye IFN- α , TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8. En una realización más, el tratamiento con composiciones como se describen en la presente memoria puede estar seguido de una aplicación dérmica en el sitio de la administración de pomada Aldara™ (imiquimod 5%) (3M, St. Paul, MN, EEUU) en el sitio de la administración del tratamiento.

45 El tamaño tumoral y el porcentaje de ratones que portan tumor, se redujo en los ratones tratados con una única administración de una composición que comprende CpG ODN y un péptido de fusión encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite, seguido de una aplicación dérmica de pomada Aldara en el sitio de la administración del tratamiento (Figura 18 y 19).

50 Las composiciones como se describen en la presente memoria pueden formularse en una forma que es adecuada para administración oral, nasal, rectal o parenteral. La administración parenteral incluye modos de administración intravenoso,

intraperitoneal, intradérmico, subcutáneo, intramuscular, transepitelial, intrapulmonar, intratecal y tópico. Las rutas preferidas son intramuscular, subcutánea e intradérmica para conseguir un efecto de liberación lenta.

Las composiciones como se describen en la presente memoria pueden ser eficaces cuando se administran en una única aplicación.

- 5 Las composiciones como se describen en la presente memoria pueden usarse en combinación, antes o después, de otras terapias de cáncer tales como radioterapia y quimioterapia. Se ha mostrado previamente que la recurrencia del melanoma se previno cuando los pacientes diagnosticados con melanoma de estadio II o III se trataban quirúrgicamente y después se les proporcionaba una composición de vacuna que comprende una composición para inducir una respuesta CTL frente a antígenos específicos de melanoma. (Antonia, S.J. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 12: 878-887, 2006; Allegra, C.J. y R.W. Childs., *J. National Cancer Inst.* 97: 1396-1397, 2005; Cassarino, D.S. *et al.*, *J. Cutaneous Path.* 33: 335-342, 2006; Correale, P. *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 97: 1437-1445, 2005; Gulley, J.L. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 11: 3353-3362, 2005; y Chakraborty, M. *et al.*, *Cancer Res.* 64: 4328-4337, 2004).

La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos siguientes.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Respuesta celular

(a) Activación

20 Para examinar la especificidad y rapidez de la respuesta CTL, se trataron ratones una vez con una composición que comprende adyuvante CpG ODN, un epítipo de CTL del virus del papiloma humano (HPV) 16, concretamente péptido R9F (E7 (H2-Db) RAHYNIVTF, aminoácidos 49-57; SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (AKXVAAWTLKAAA-OH (SEQ ID NO: 10); 50 µg/dosis), que es un epítipo de T auxiliar universal y encapsulado en liposomas (0,2 g lecitina y 0,02 g colesterol/dosis) suspendidos en una emulsión PBS/FIA (disolución salina tamponada con fosfato/adyuvante incompleto de Freund) (100 µl/dosis). Catorce días después del tratamiento, los esplenocitos (células efectoras) se co-cultivaron durante 6 horas con R9F o un péptido irrelevante (KIMCNSSCM; SEQ ID NO: 13). Una tinción intracelular ex vivo de IFN- γ de esplenocitos demostró que la proporción de células T CD8⁺ (CTL) positivas para IFN- γ era 13 veces mayor (1,6% de esplenocitos) cuando los esplenocitos se expusieron a péptido R9F que cuando los esplenocitos se expusieron al péptido irrelevante (0,12% de esplenocitos o no péptido; Figura 1). Como se demuestra en la Figura 1, el tratamiento de ratones con la composición descrita anteriormente que comprende péptido R9F causó una expansión significativa de CTL que presentan una respuesta específica a la estimulación por el epítipo HPV, comparado con ratones tratados con una composición que comprende péptido irrelevante.

30 La tinción de linfoquina intracelular demostró la presencia de CTL positivos para IFN- γ . Para demostrar la función protectora de los CTL que producen IFN- γ , los ratones se trataron con una composición que comprende CpG ODN y péptido R9F fusionado con PADRE y encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite. Treinta días después del tratamiento, células E4 (células diana; línea celular de linfoma de ratón) cargadas con el péptido R9F (RAHYNIVTF; SEQ ID NO: 1) y células E4 cargadas con un péptido irrelevante (KIMCNSSCM; SEQ ID NO: 13) se estimularon *in vitro* durante 6 días con esplenocitos de ratones tratados. Se midió la citotoxicidad por el ensayo JAM (Figura 2). Después de una estimulación *in vitro* de 6 días, aproximadamente el 50% de las células EL-4 cargadas con el péptido R9F (proporción Efectora a Diana 10) se lisaron por los esplenocitos de ratones tratados con la composición que comprende el péptido R9F (cuadrados). Por el contrario, sólo aproximadamente el 5% de las células EL-4 cargadas con el péptido irrelevante se lisaron por los mismos esplenocitos (diamantes; $p < 0,009$).

(b) Duración

45 La duración de la respuesta de memoria inducida por un único tratamiento con una realización particular de la invención se demostró (Figura 3) por la lisis de células EL-4 por esplenocitos obtenidos de ratones 130 días después del tratamiento con las composiciones siguientes: (i) péptido fusionado (péptido R9F fusionado con PADRE) y CpG ODN encapsulado en liposomas contenidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA (diamantes); (ii) péptido fusionado y CpG ODN no encapsulado en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA (triángulos y cruces); o (iii) péptido fusionado encapsulado en liposomas en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA sin un adyuvante CpG ODN (círculos cerrados). Los esplenocitos tratados con péptido fusionado encapsulado en liposomas, CpG ODN encapsulado en liposomas, péptido fusionado y CpG ODN no encapsulado y péptido fusionado no encapsulado solo sirvieron como esplenocitos control.

50

El ensayo JAM usó una estimulación *in vitro* de seis días seguida del co-cultivo de esplenocitos (células efectoras) con células EL-4 (células diana) cargadas con R9F o péptido irrelevante que se habían precargado con timidina marcada con ³H. Los esplenocitos de ratones inmunizados con péptido fusionado y CpG ODN encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite lisaron el 30% de las células diana cargadas con el péptido R9F cuando la proporción efector a diana era 25:1 y 5:1 y 15% de las células diana cuando la proporción era 1:1 (Figura 3). Los esplenocitos de ratones a los que se proporcionó el tratamiento control demostraron citotoxicidad a niveles basales. La duración de una respuesta CTL durante >130 días después de un único tratamiento es notable respecto a la duración de las respuestas CTL reportadas en la bibliografía.

Ejemplo 2

10 Erradicación de cáncer cervical

A pesar del desarrollo de vacunas preventivas para el cáncer cervical y vulvar inducido por el papilomavirus humano (HPV), por ejemplo, Gardasil™ y Cervarix™, permanece una prioridad alta de un tratamiento terapéutico para el cáncer cervical y vulvar. En este ejemplo, se usó una composición de tratamiento que comprende un epítipo de CTL de virus del papiloma humano (HPV) 16, concretamente R9F (péptido E7 (H2-Db) RAHYNIVTF, aminoácidos 49-57; SEQ ID NO: 1) para inducir CTL. Estos CTL necesitan células T CD4⁺ para su diferenciación y expansión, así como su maduración en CTL de memoria funcionales. Para conseguir una respuesta CTL potente a través de la ayuda de células T CD4⁺, el péptido R9F se fusionó con el epítipo de T auxiliar universal PADRE (SEQ ID NO: 10), dando lugar a un péptido de fusión. El péptido fusionado se encapsuló en liposomas junto con oligodesoxinucleótidos sintéticos que contienen restos CpG ODN o lipopéptido (Pam3Cys-SK KKK). La composición terapéutica usó una emulsión de agua en aceite PBS/FIA para administrar la formulación terapéutica en un único tratamiento. La eficacia del tratamiento terapéutico se demostró usando células tumorales C3 que expresan HPV 16 para pulsar ratones C57BL/6 (10 ratones/grupo) y tratando los ratones en el día 14 posterior al pulso con la composición de tratamiento descrita anteriormente o una composición control. Hacia el día treinta (es decir, 16 días después del tratamiento), se demostró la erradicación completa de tumores palpables en todos los 10 ratones en el grupo que se pulsaron con el tumor C3 y se les administró tratamiento (Figura 4; cuadrados abiertos). Por el contrario, los tumores en todos los 10 ratones control tratados con una composición que comprende todos los componentes del tratamiento terapéutico descrito anteriormente excepto el péptido fusionado, continuaron incrementando en tamaño (cuadrados cerrados).

Ejemplo 3

Profilaxis

30 Para demostrar adicionalmente la capacidad de una composición de la invención para proteger frente a un pulso *in vivo* con células tumorales C3, se inyectó subcutáneamente a ratones hembra C57BL/6 en la base de la cola una composición que comprende el péptido R9F (RAHYNIVTF; SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10) (referido como péptido fusionado) y encapsulado con CpG ODN en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite. Para determinar si la composición sería tan protectora como una composición que comprende un adyuvante de reemplazo a CpG ODN, se administró a los ratones una composición como se ha descrito anteriormente en la que CpG ODN se reemplazó por un adyuvante CpG alternativo, concretamente, Pam3c (Pam3Cys-sK KKK). A los grupos control se inyectó PBS, CpG ODN en PBS, péptido fusionado en PBS, péptido fusionado suspendido en PBS con CpG ODN o péptido fusionado encapsulado en liposomas sin adyuvante.

40 Quince días después de un único tratamiento, $0,5 \times 10^6$ células C3 se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de ratones tratados como un pulso primario (Figura 5). Todos los ratones a los que se inyectó PBS o CpG ODN en PBS desarrollaron tumores en 2 semanas y tuvieron que ser eliminados del estudio hacia el día 30 tomando como base el tamaño tumoral según se requiere por los protocolos de cuidado animal. El tratamiento con péptido fusionado en PBS protegió sólo al 20% de los ratones (grupo de tratamiento 3). El péptido fusionado encapsulado en liposomas en una emulsión de PBS previno que el 50% de los ratones desarrollaran tumores (grupo de tratamiento 4), lo que sugiere que el péptido fusionado encapsulado en liposomas ofrece alguna protección frente al pulso de C3. El tratamiento con péptido fusionado y CpG ODN en una emulsión de PBS previno que el 60% de los ratones desarrollaran tumores (grupo de tratamiento 5). En comparación, el 100% de los ratones tratados con péptido fusionado encapsulado en liposomas con CpG ODN permaneció sin tumor durante el periodo de monitorización de 61 días posterior al pulso (grupo de tratamiento 6). Para determinar la duración y magnitud de la respuesta de memoria dirigida frente a los tumores, a los ratones en el grupo de tratamiento 6 se les proporcionó un pulso secundario de 6×10^6 células tumorales C3. Todos los ratones permanecieron sin tumor durante 73 días adicionales, lo que demuestra que un único tratamiento de una composición de la invención proporciona una respuesta inmune celular robusta y duradera. De manera similar, el reemplazo de CpG con Pam3c resultó en que todos los ratones permanecieron sin tumor durante 61 días (grupo de tratamiento 7). Estos ratones no se sometieron a otro pulso con células C3.

Terapia

Para evaluar el tratamiento de tumores establecidos C3 palpables, se implantó a los ratones $0,5 \times 10^6$ células C3 subcutáneamente en el flanco izquierdo. Bien en el día 4, 5, 6 ó 9 después del implante del tumor, los ratones (n= 10) se trataron con una composición que comprende CpG ODN y péptido R9F (RAHYNIVTF; SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10) (péptido fusionado) y encapsulado en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA un placebo (péptido fusionado y CpG ODN en una emulsión de PBS). Una única inmunización erradicó los tumores hacia el día 40 en todos los 10 ratones en los grupos de tratamiento que fueron inmunizados 4, 5 ó 6 días después del implante del tumor y todos los 30 ratones en el grupo que fue inmunizado 9 días después del implante del tumor. Sólo un ratón mantuvo un tumor hasta el día 40 en el grupo tratado en el día 5 después del implante del tumor (Tabla 1). Por el contrario, 9/10 ratones desarrollaron tumores en los grupos tratados con la composición placebo en el día 4 ó 6 días después del implante del tumor. En el grupo de ratones a los que se administró placebo 5 días después del pulso, 10/10 ratones desarrollaron tumores y 27/30 ratones desarrollaron tumores en el grupo tratado con la vacuna placebo en el día 9 después del implante del tumor.

Para evaluar si el reemplazo de CpG ODN con Pam3c alteraría la capacidad de una composición para erradicar los tumores C3, diez ratones se trataron con una composición que comprende péptido fusionado encapsulado con Pam3c en liposomas y suspendido en una emulsión de agua en aceite PBS/FIA o se usó un tratamiento placebo que comprende la misma composición, pero sin liposomas para tratar a un segundo grupo de 10 ratones. Los ratones en los dos grupos de tratamiento se pulsaron posteriormente con 1×10^6 células C3 en el flanco izquierdo. El tratamiento terapéutico de tumores C3 establecidos usando péptido fusionado encapsulado con un Pam3c en liposomas se repitió dos veces con resultados similares como se indica en la Tabla 1.

Tratamiento (Número de días después del implante del tumor)	Número de ratones con tumores (día 40 después del pulso)	
	Placebo	Tratados
4	9/10	0/10
5	10/10	1/10
6	9/10	0/10
9	27/30	0/30
9* (con Pam3c)	9/10	0/10

Tabla 2. Erradicación de tumores en ratones tratados con una composición que comprende péptido R9F (SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10) (péptido fusionado) y en liposomas y suspendidos en una emulsión de agua en aceite que contiene CpG ODN o Pam3c (*) como adyuvantes o una vacuna placebo que comprende todos los componentes anteriores excepto liposomas.

Ejemplo 4

Un tratamiento terapéutico de melanoma

La tirosinasa es una proteína sobreexpresada en melanoma. Los péptidos de la proteína tirosinasa son generalmente antígenos pobres para el tratamiento del melanoma. Como se describe en la presente memoria, se usó V8L, un péptido de la proteína relacionada con tirosinasa (TRP-2) (aminoácidos 181-188; VYDFFVWL; SEQ ID NO: 6) que se une a MHC murino, H2K² y HLA-A2.1 humano en un tratamiento terapéutico para estimular la producción de células que producen IFN- γ . La estimulación del número de células que producen IFN- γ específicas de TRP-2 indica que puede anticiparse un efecto terapéutico dirigido específicamente frente a melanoma.

Los ratones C57BL se trataron una vez con una composición de la invención que comprende CpG ODN y péptido TRP-2 fusionado con PADRE encapsulado en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite. Los tratamientos control se llevaron a cabo con una composición que comprende péptido TRP-2 encapsulado con PADRE en liposomas en ausencia de CpG ODN y una composición que comprende CpG ODN y un péptido irrelevante (KIMCNSSCM; SEQ ID NO: 13) con PADRE encapsulado en liposomas. En ambos tratamientos control, los liposomas se suspendieron en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51. La detección *ex vivo* de esplenocitos que producen IFN- γ por ELISPOT indicó que la composición de tratamiento produjo el mayor número de células que producen IFN- γ específico de TRP-2 (Figura 6, grupo A). El tratamiento control (Figura 6, grupo B) produjo aproximadamente la mitad de células que producen IFN- γ específico de TRP-2 y el reemplazo de TRP-2 por un péptido irrelevante produjo niveles basales de células que producen IFN- γ específico de TRP-2 (Figura 6; grupo C), lo que muestra que la composición de tratamiento de la

invención produce el mayor número de células que producen IFN- γ específico de TRP-2 que son requeridas para combatir el cáncer melanoma.

Ejemplo 5

Un tratamiento terapéutico de cáncer de mama

- 5 El producto génico p53 es una diana ideal y ampliamente expresada para la terapia de malignidades, en particular, cáncer de mama. Una gran parte de los cánceres humanos presentan mutaciones en p53 como un evento temprano en la tumorigénesis. La sobreexpresión de p53 es un pronosticador independiente de cáncer más agresivo, metástasis en los ganglios linfáticos, fracaso de los regímenes terapéuticos estándar y finalmente de mortalidad relacionada con el cáncer.
- 10 Los ratones tratados con un único tratamiento con una composición de la invención que comprende un epítipo de CTL p53 modificado, mK9M, (KYICNSSCM; SEQ ID NO: 8) con CpG ODN y PADRE (SEQ ID NO: 10) encapsulado en liposomas en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51 produjo aproximadamente 10 a 40 veces más células que producen IFN- γ específico del péptido p53 (Figura 7; grupo A) que los ratones tratados con una composición que comprende el péptido fusionado con PADRE y CpG ODN en ausencia de liposomas (Figura 7; grupo B); una
- 15 composición que comprende el péptido fusionado encapsulado en liposomas sin CpG ODN; o una composición en la que el péptido fusionado se reemplazó por un péptido irrelevante (Figura 7; grupo D). La producción incrementada de células que producen IFN- γ específico de tumor se correlaciona con una reducción/erradicación de tumores de cáncer cervical (véanse los Ejemplos 2 y 3), por lo tanto, un experto en la técnica predeciría un resultado similar para tumores que portan p53.

20 Ejemplo 6

Tratamiento terapéutico de cáncer frente a más de una diana

- Algunos cánceres expresan más de una proteína asociada a tumor simultáneamente. Dichos cánceres ofrecen más de una diana para tratamiento terapéutico. Por ejemplo, las células de melanoma sobreexpresan tanto p53 como TRP planteando la posibilidad de que los tratamientos dirigidos tanto a p53 como TRP simultáneamente podrían ser más
- 25 eficaces y específicos ya que las células que expresan las dos dianas p53 y TRP serían más vulnerables al tratamiento.

- Los ratones tratados con una única administración de una composición que comprende una mezcla de los péptidos p53 (mK9M; KYICNSSCM; SEQ ID NO: 8) y TRP-2 (V8L; VYDFFVWL; SEQ ID NO: 6) con CpG ODN y PADRE (AKXVAAWTLKAAA, en la que X= ciclohexilalanil; SEQ ID NO: 10) y encapsulado en liposomas suspendidos en una
- 30 emulsión de agua en aceite produjo aproximadamente los mismos números de células que producen IFN- γ específicas de p53 y TRP (Figura 8; grupo A). Por el contrario, los ratones control tratados con una mezcla de péptidos CTL p53 fusionado con PADRE y TRP-2 con PADRE junto con CpG ODN sin liposomas produjo más células que producen IFN- γ específicas de TRP-2 que de p53 (Figura 8; grupo C), incluso en ausencia de CpG ODN (Figura 8; grupo B). La producción de células que producen IFN- γ específicas de p53 estuvo en los niveles obtenidos con los tratamientos control (es decir, composición de tratamiento sin CpG ODN (grupo B) o sin CpG ODN y liposomas (grupo D)). Estos
- 35 resultados indican que los ratones a los que se administró la composición de tratamiento montaron un ataque dual frente a los tumores que portan las proteínas asociadas a tumor TRP-2 y p53. Sin la encapsulación de los péptidos fusionados con CpG ODN en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite, los ratones tratados sólo atacan una diana, la proteína asociada a tumor TRP-2, a pesar de ser tratados con los dos péptidos TRP-2 y p53.

Ejemplo 7

- 40 Se usaron ratones transgénicos HLA A2, que tienen un gen del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) HLA A2, y por lo tanto expresan MHC humano, que es el que mejor mimetiza el cáncer cervical humano. Para ser compatible con HLA A2 MHC, se utilizaron epítopos de CTL diferentes de los usados en los ejemplos anteriores. Los ratones HLA A2 se trataron con una de las composiciones siguientes:

- (1) una mezcla de cuatro péptidos (MP) derivados del virus del papiloma humano (HPV) E6/7, siendo la secuencia de
- 45 cada péptido como sigue:

Y10T (E7: aminoácidos 11-20; YMLDLQPETT; SEQ ID NO: 2);

L9V (E7: aminoácidos 82-90; LLMGTLGIV; SEQ ID NO: 3);

T81 (E7: aminoácidos 86-93; TLGIVCPI; SEQ ID NO: 4); y

T10V (E6: aminoácidos 29-38; TIHDIILECV; SEQ ID NO: 5);

2) Los 4 péptidos anteriores unidos entre sí con conectores "aay" en un péptido largo (AB2; SEQ ID NO: 14), la secuencia del cual es como sigue:

TIHDIILECVaayYMLDLQPETTAayLLMGTLGIVaayTLGIVCPI;

5 o

3) Un único péptido seleccionado de los cuatro péptidos listados anteriormente, concretamente L9V (E7: aminoácidos 82-90; LLMGTLGIV; SEQ ID NO: 3).

10 Todas las composiciones de tratamiento comprendieron PADRE (25 µg/dosis) y CpG ODN (50 µg/dosis) como adyuvantes y se administraron en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51. La mezcla de 4 péptidos contenía 25 µg de cada péptido/tratamiento. El péptido largo (AB2) se administró a 100 µg/tratamiento. La composición que comprende L9V solo contenía 25 µg/tratamiento. A los ratones control se les inyectó PBS (100 µL/tratamiento).

15 Los ratones se pulsaron con células tumorales TC1/A2 (1 X 10⁵ células/ratón) implantadas subcutáneamente en el flanco izquierdo y el tamaño tumoral se midió cada 5 días. Diecinueve días después del pulso, los ratones (5 ratones/grupo) se trataron con una de las composiciones anteriores o se les inyectó PBS (controles).

20 En la Figura 9 se muestra que un único tratamiento de la composición que comprende la mezcla de los cuatro péptidos descritos anteriormente HPV E6/7 (cuadrados) o el péptido largo AB2 (diamantes) erradicó los tumores TC1/A2 21 días después del tratamiento. El tratamiento con la composición que comprende el péptido E7 L9V redujo significativamente el tamaño tumoral (triángulos). El tratamiento con PBS solo (cruces) no previno el crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral fue similar en todos los cinco ratones en el grupo control que recibieron PBS (Figura 10). Todos los cinco ratones se eliminaron del estudio en el día 35 como obliga el tamaño tumoral excesivo. El tamaño tumoral se indica como el tamaño tumoral medio en cinco ratones.

25 Las reducciones en el tamaño tumoral en los ratones tratados con la composición que comprende la mezcla de péptidos fue variable (Figura 11). Por ejemplo, el tamaño tumoral en el ratón 2 se erradicó hacia el día 6 después del tratamiento. Los tumores en el resto de los ratones no se erradicaron hasta al menos el día 11 después del tratamiento. Las reducciones en el tamaño tumoral en ratones tratados con la composición que comprende el péptido largo (AB2) también fueron variables (Figura 12). Sin embargo, los tumores se erradicaron completamente hacia el día 21 después del tratamiento en todos los 5 ratones.

30 Las reducciones en el tamaño tumoral en los ratones tratados con la composición que comprende un único péptido HPV E7 (L9V; SEQ ID NO: 3) fue similar en 4/5 ratones (Figura 13). El tratamiento del ratón 3 no resultó en una reducción en el tamaño tumoral, lo que sugiere que el tratamiento con una composición que comprende un péptido HPV bien como una mezcla de péptidos individuales o péptidos fusionados protegerá a más individuos en una población que la inmunización frente a un único péptido.

Ejemplo 8

35 En el ejemplo 7, cuatro péptidos HPV 16 E6/E7 se unieron entre sí para formar un péptido largo usando el conector "aay" (-alanina-alanina-tirosina-). Este conector tiene naturaleza hidrofóbica y se añade a la hidrofobicidad del péptido largo fusionado haciendo que la fabricación del péptido sea difícil y requiera el uso de dimetil sulfóxido para solubilizar el péptido largo.

40 En este ejemplo, se usó un conector "kcp" (-lisina-lisina-prolina-) en lugar del conector "aay" para formar 2 dipéptidos. Un dipéptido fue Y10T-kcp-L9V (TIHDIILECVkcpLLMGTLGIV; SEQ ID NO: 15) y el otro dipéptido fue T81-kcp-T10V (TLGIVCPIkcpYMLDLQPETT; SEQ ID NO: 16). El uso del conector "kcp" resultó en péptidos fusionados hidrofílicos que facilitan la fabricación de vacunas. Usando "kcp" para conectar péptidos produjo aproximadamente el mismo número de esplenocitos que producen IFN-γ que los obtenidos cuando se usaron los mismos cuatro péptidos individualmente (es decir, no conectados (Figura 14). Estos resultados demuestran que el uso del conector kcp facilita la fabricación del antígeno de vacuna sin alterar el procesamiento del antígeno y la inducción de esplenocitos que producen IFN-γ específicos de péptido. La producción de estas células es un buen indicador de la erradicación eficaz de las células cancerosas.

Ejemplo 9

Un tratamiento terapéutico frente al melanoma

Los ejemplos 4, 5 y 6 demuestran la capacidad de la composición de la invención para incrementar la producción de esplenocitos que producen IFN- γ específicos de TRP-2 y p53, de esta manera, estableciendo la estimulación de respuestas inmunes celulares frente a proteínas asociadas a melanoma. Se implantaron células B16-F10 (10×10^3 células /ratón) subcutáneamente en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 sin patógenos. Los ratones tenían una edad de 6-8 semanas en el momento del implante y se estabularon en condiciones de filtro superior con agua y alimento ad libitum. Cinco días después del implante de células de melanoma, los ratones recibieron un único tratamiento por inyección subcutánea de una composición que comprende uno de dos péptidos (V8L o S9L (SEQ ID NO: 6 ó 7); 25 μg /ratón) derivados de TRP-2, un péptido modificado (mK9M (SEQ ID NO: 8); 25 μg /ratón) derivado de p53 o mezclas de estos péptidos (25 μg de cada péptido/ratón). Todas las composiciones también comprendían tanto PADRE (25 μg /ratón) como CpG ODN (50 μg /ratón) y se administraron en liposomas suspendidos en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51. Los ratones control recibieron una única administración de PBS solo. Todas las inyecciones se administraron en la base de la cola. El tamaño tumoral se determinó cada 4-5 días usando la fórmula siguiente: medida más larga x (medida más corta) (Pilon-Thomas *et al.*, *J. of Immunother.*, 29(4), 2006).

La Figura 15 demuestra que los ratones tratados con una composición que contiene bien el péptido V8L (SEQ ID NO: 6) (diamantes) o mK9M (SEQ ID NO: 8) (triángulos) inhibió el crecimiento de células de melanoma inicialmente, pero las células de melanoma superaron la inhibición inicial del crecimiento para producir tumores que incrementaron en tamaño hasta 1.200 mm^3 . El tratamiento con las composiciones que comprenden el péptido S9L (SEQ ID NO: 7) (cuadrados) o mezclas de péptidos V8L y mK9M (KYICNSSCM) (cruces) o S9L y mK9M (estrellas) inhibió el crecimiento del melanoma durante el periodo completo de monitorización. El PBS solo (círculos) no tuvo efecto en el crecimiento tumoral.

La consideración del porcentaje de ratones que tienen tumores al final del estudio indicó que la vacuna de la invención que contenía bien el péptido mK9M (SEQ ID NO: 8) (triángulos), V8L (SEQ ID NO: 6) (diamantes) o S9L (SEQ ID NO: 7) (cuadrados) curó sólo al 0, 40 y 40%, respectivamente, de los ratones de sus tumores (Figura 16). Por el contrario, el tratamiento con una composición que comprende una mezcla de S9L y mK9M (estrellas) curó al 80% de los ratones de sus tumores y o una mezcla de V8L y mK9M (cruces) curó al 100% de los ratones de sus tumores.

Ejemplo 10

Modelo tumoral de melanoma B16

En los ejemplos previos, la eficacia de composiciones de la invención se demostró en tumores establecidos en dos modelos independientes de cáncer cervical HPV (C3 y TC1/A2). Los tumores que portan HPV se erradicaron tomando como diana epítomos de CTL de HPV presentados en la superficie de células tumorales. Esta estrategia es particularmente eficaz cuando se tratan cánceres inducidos viralmente. Los tumores que presentan "auto" antígenos sobreexpresados, sin embargo, son más difíciles de tratar ya que son invisibles para el sistema inmune. Los auto antígenos están protegidos de cerca por el mecanismo de tolerancia. Un tratamiento terapéutico de cáncer eficaz debe tener la capacidad de inducir respuestas inmunes frente a auto antígenos asociados a tumores sobreexpresados. Se cree que el melanoma (incluyendo el modelo tumoral B16) regula a la baja la expresión de MHC clase I y la presentación de auto antígenos. Una composición terapéutica para el tratamiento de melanoma debe activar clonotipos de células T de baja afinidad que son capaces de tomar como diana auto epítomos en la superficie del tumor.

Se requiere una respuesta CTL robusta y específica para el tratamiento exitoso del melanoma por vacunación. En estudios pre-clínicos, se ha mostrado que una actividad CTL específica de B16 no era suficiente para proteger frente al crecimiento tumoral de B16 *in vivo* (Bellone *et al.*, *J. of Immunol.*, 165(5): 2651-2656, 2000). La inmunoterapia con células dendríticas maduras CpG pulsadas con el auto epítipo asociado a melanoma de TRP-2 no tuvo éxito en conseguir la regresión tumoral (Pilon-Thomas *et al.*, *J. of Immunother.*, 29(4), 2006). En otros dos estudios, el tratamiento de tumores B16 establecidos de 5 días resultó en la erradicación del tumor en menos del 50% de los ratones tratados y los tumores reaparecieron en todos los animales tratados (Pilon-Thomas *et al.*, *J. of Immunother.*, 29(4), 2006; y Bronte *et al.*, *Cancer Res.*, 60: 253-258, 2000).

Se ensayó la capacidad de las composiciones de la invención para incitar respuestas CTL eficaces frente a múltiples antígenos peptídicos simultáneamente. Se implantaron a los ratones (5 ratones/grupo) 10^4 células B16 y se trataron una vez 6 días después del implante con una composición que comprende (0,1 ml/dosis) 25 μg de un epítipo de CTL TRP-2 (S9L; SVYDFVWL SEQ ID NO: 7), 25 μg de un epítipo de CTL p53 (mK9M; KYICNSSCM SEQ ID NO: 8), 25 μg de PADRE y 50 μg de CpG ODN por tratamiento. Para comparación, un segundo grupo de ratones (5 ratones/grupo) se trató con una composición que comprende bien 25 μg del mismo epítipo de CTL TRP-2 ó 25 μg del epítipo de CTL p53 (K9M; KYMCNSSCM SEQ ID NO: 9), 25 μg de un epítipo de CTL p53 modificado, mK9M (SEQ ID NO: 8), 25 μg de PADRE (AKXVAAWTLKAAA, en el que X= ciclohexilalanil; SEQ ID NO: 10) y 50 μg de CpG ODN por tratamiento. Todos

los componentes de la composición se incorporaron en los liposomas antes de la emulsión en el vehículo hidrofóbico, ISA51. Los ratones control se trataron con PBS solo.

5 Un único tratamiento con la composición que contiene una mezcla del epítipo TRP-2 y p53 erradicó tumores en todos los ratones 21 días después del tratamiento (Figura 17; triángulos), mientras que el tratamiento con una composición que contiene TRP-2 (diamantes) o p53 solo (cuadrados) aclaró los tumores en sólo el 40% de los ratones. Todos los ratones control a los que se inyectó PBS desarrollaron tumores (cruces).

Ejemplo 11

10 Se pulsaron ratones (C57BL/6) con tumores C3 que se desarrollaron en tamaño palpable hacia 8 días después del pulso. En el día 8 después del pulso, los ratones se dividieron en dos grupos control (10 ratones/grupo) y un grupo de tratamiento que se trató con una única administración de una composición que comprende CpG ODN y un péptido de fusión (péptido R9F (SEQ ID NO: 1) fusionado con PADRE (SEQ ID NO: 10) encapsulado en liposomas suspendidos en emulsión de agua en aceite.

15 En las 15-20 horas después del tratamiento, los ratones recibieron una aplicación dérmica de pomada Aldara™ (25 mg (equivalente a 10-12 μ l de Aldara)) en el sitio de la administración del tratamiento. El ingrediente activo en Aldara es imiquimod a una concentración de 5%. Imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina) es un compuesto sintético nuevo que es un miembro de la familia imidazoquinolona de fármacos que se sabe que tienen las propiedades de modificadores y estimuladores tópicos de la respuesta inmune. Imiquimod es un ligando para TLR7 y activa un ámbito de citoquinas semejantes a Th1 que incluye IFN- α , TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8. Por el contrario, los dos grupos control recibieron bien PBS solo (100 μ L/ratón) o PBS seguido de una aplicación dérmica de pomada Aldara (25 mg). El tamaño tumoral se redujo en los ratones a los que se proporcionó la composición de tratamiento seguido de aplicación dérmica de Aldara (Figura 18; cruces) pero no se redujo en los controles a los que se proporcionó PBS solo (cruces) o PBS seguido de aplicación de Aldara (triángulos). La Figura 19 muestra que el porcentaje de ratones que portan tumores se redujo en los ratones a los que se proporcionó la composición de tratamiento seguido de aplicación dérmica de Aldara (diamantes) pero no se redujo en los controles a los que se proporcionó PBS solo (triángulos) o PBS seguido de aplicación de Aldara (cuadrados).

Ejemplo 12

Tratamiento de melanoma usando un péptido toxoide F21E de tétanos como epítipo de T auxiliar

30 Se encapsularon conjuntamente un antígeno relacionado con melanoma, TRP-2, en combinación con un epítipo de T auxiliar derivado del toxoide del tétanos en una composición que comprende CpG ODN en una emulsión de agua en aceite PBS/ISA51. El péptido del toxoide del tétanos reemplazó a PADRE, el epítipo de T auxiliar usado en ejemplos previos, para demostrar que puede usarse una variedad de epítopos de T auxiliar. La estimulación del número de células que producen IFN- γ específico del péptido TRP-2 indica que puede anticiparse un efecto terapéutico dirigido específicamente frente al melanoma.

35 Los ratones C57BL se inmunizaron con una composición que comprende un péptido TRP-2 (S9L; SEQ ID NO: 7) y el epítipo del toxoide del tétanos F21E (aminoácidos 947-967, FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE; SEQ ID NO: 11) encapsulados conjuntamente en liposomas con CpG ODN. Los ratones control se inmunizaron con la composición descrita anteriormente formulada sin el epítipo de T auxiliar del toxoide del tétanos. La detección *ex vivo* de IFN- γ se realizó por ELISPOT en esplenocitos aislados de bazo recogidos 8 días después de la inmunización. Los esplenocitos de los ratones control y tratados se plaquearon a 5×10^5 células por pocillo y se estimularon *in vitro* con el péptido TRP-2 (S9L), o con la línea celular de cáncer de melanoma B16-F10 (5×10^4 células por pocillo, proporción efector a diana 1:10). Los esplenocitos de los ratones inmunizados con la composición de tratamiento contenían el mayor número de células que producen IFN- γ específico de TRP-2. La respuesta inmune se observó cuando los esplenocitos se estimularon con el péptido TRP-2 o con las células B16-F10 (Figura 20). Los bazo de los ratones control demostraron niveles basales de células que producen IFN- γ específico de TRP-2. Así, puede detectarse una fuerte respuesta inmune de CTL anti-melanoma cuando los esplenocitos se estimulan usando el péptido TRP-2 en presencia de un epítipo del toxoide del tétanos, pero también usando los antígenos de melanoma presentes en la superficie de las células B16-F10.

Métodos

Líneas celulares

50 La línea celular C3 se mantuvo en Medio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM; Sigma, St Louis, MO) suplementado con 10% suero de ternera fetal inactivado con calor (Sigma, St Louis, MO), 2 mM L-glutamina (Gibco, Burlington, ON), 50 mM 2-mercaptoetanol (Gibco, Burlington, ON), 100 U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin (Gibco, Burlington, ON). Las células se incubaron a 37°C/5% CO₂.

5 La línea celular EL-4 es una línea celular de linfoma que se origina en ratones. La línea celular EL-4 se mantuvo en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma, St Louis, MO) con alto contenido en glucosa que contiene 2 mM L-glutamina y suplementado con 10% suero de ternera fetal inactivado con calor (Sigma, St Louis, MO), 50 mM 2-mercaptoetanol (Gibco, Burlington, ON), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Gibco, Burlington, ON). Las células se incubaron a 37°C/5% CO₂.

La línea celular de melanoma B16F1 (B16) se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA.

Péptidos

10 El péptido HPV 16 E7 (H-2D^b) RAHYNIVTF⁴⁹⁻⁵⁷ (R9F) que contiene un epítipo de CTL se fusionó con PADRE que contiene un epítipo de auxiliar CD4⁺ por Dalton Chemical Laboratories Inc. (Toronto, ON). Este péptido de fusión se usó a 50 µg/dosis. Cuando se indica, R9F se usó como un antígeno (25 µg/dosis) o en ensayos de citotoxicidad. El péptido KYMCNSSCM (SEQ ID NO: 13) (Dalton) se usó como un péptido control irrelevante.

15 Los péptidos de proteína relacionada con tirosinasa (TRP-2) S9L (aminoácidos 180-188; SVYDFFVWL; SEQ ID NO: 7) y V8L (aminoácidos 181-188; VYDFFVWL; SEQ ID NO: 6), así como los péptidos p53 (p53 de tipo salvaje (K9M), aminoácidos 232-240; KYMCNSSCM; SEQ ID NO: 9), péptido p53 modificado mK9M (aminoácidos 232-240; KYICNSSCM; SEQ ID NO: 8) y mK9M acoplado a PADRE (AKXVAAWTLKAAAKYICNSSCM; SEQ ID NO: 17) se adquirieron en Dalton Chemical Laboratories, Inc. (Toronto, ON, Canadá). Estos péptidos se presentan por la MHC murina clase I H-2K. S9L también se presenta por MHC HLA A2, mientras que V8L no se presenta por MHC HLA A2. Los péptidos TRP2 y p53 se almacenaron como una disolución madre de 1 mg/ml en DMSO. Las diluciones adicionales para la fabricación de vacunas se hicieron usando PBS.

20 Todas las formulaciones de las vacunas, excepto aquellas que contienen mK9M acoplado, contenían PADRE (25 µg/dosis) y CpG ODN 1826 (50 µg/dosis). mK9M acoplado contenía PADRE como parte de su estructura, por lo tanto, la adición de PADRE libre no fue necesaria.

La secuencia de aminoácidos del péptido irrelevante usado en las determinaciones ELISPOT fue KIMCNSSCM (Dalton Chemical Laboratories Inc.).

25 Adyuvantes

CpG ODN (ODN sintético 1826 con los restos CpG subrayados 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3', 50 µg/dosis) (SEQ ID NO: 12) se obtuvo de Coley Pharmaceutical (Wellesley, MA). El lipopéptido (Pam3Cys-SK4KKK, (100 µg/dosis) se obtuvo de EMC Microcollections, Alemania.

Tratamientos

30 Los liposomas se prepararon como sigue; se disolvieron lecitina y colesterol en una proporción de 10:1 (0,2 g lecitina y 0,02 g colesterol/dosis) en cloroformo/metanol (1:1; v/v) y la disolución se esterilizó por filtración usando un filtro PTFE de 0,2 µm. El cloroformo y el metanol se eliminaron bajo presión reducida usando un evaporador giratorio y las trazas de los disolventes se eliminaron adicionalmente de la capa lipídica delgada resultante en vacío. Para la encapsulación en liposomas, los péptidos de fusión con CpG se disolvieron en PBS estéril y la disolución resultante se añadió a la capa lipídica delgada con mezclado para formar liposomas. La suspensión de liposomas resultante se emulsionó en FIA (Sigma, St Louis, MO) mediante la adición de la suspensión liposoma/PBS a FIA para formar una emulsión de agua en aceite (PBS:FIA; 1:1, v/v; 100 µl/dosis). En algunos experimentos, se usó Montanida ISA51 (Seppic, Francia) en lugar de FIA como el vehículo graso.

40 Los ratones hembra C57BL/6 sin patógenos, de 6-8 semanas de edad, se obtuvieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) y se estabularon en condiciones de filtro superior con agua y alimento ad libitum. Se siguieron las directrices institucionales para el cuidado y uso de animales para todos los experimentos. Los ratones se trataron con composiciones de la invención por inyección subcutánea en la base de la cola. A no ser que se indique otra cosa, todos los tratamientos fueron administración única y todos los grupos de tratamiento contenían 10 ratones. A los ratones control se les inyectó subcutáneamente PBS o un péptido de fusión (un epítipo CTL seleccionado fusionado con PADRE), péptido R9F, CpG ODN (o Pam3c), péptido de fusión con CpG en PBS (100 µl) o péptido de fusión encapsulado en liposomas, R9F, CpG (o Pam3c) en una emulsión de agua en aceite (PBS/FIA; 1:1, v/v, 100 µl/dosis).

Implante de tumores

Las células C3 usadas en el implante de tumores se crecieron hasta el 95% de confluencia y se recogieron con 0,05% tripsina. Para establecer los tumores en los ratones, se inyectó a los ratones 0,5 x 10⁶ células C3 s.c. en el flanco

izquierdo. Los tamaños tumorales se determinaron cada 4-5 días usando la fórmula siguiente: medida más larga x (medida más corta)² dividido por 2.

5 Los ratones (HLA A2) se pulsaron con células tumorales TC1/A2 (1×10^5 células/ratón) implantadas subcutáneamente en el flanco izquierdo. El tamaño tumoral se midió cada 5 días y se indica como el tamaño tumoral en ratones individuales y como porcentaje de los ratones que portan tumor.

Las células B16-F10 (10×10^3 células/ratón) se implantaron subcutáneamente en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 sin patógenos que tenían 6-8 semanas de edad en el momento del pulso. El tamaño tumoral se midió cada 2-5 días y los resultados se indicaron como porcentaje de ratones que portan tumor.

Ensayos de citotoxicidad

10 Los ensayos CTL, ELISPOT y tinción intracelular para interferón (IFN)- γ mostraron que la respuesta terapéutica era específica para el péptido E7 seleccionado ya que un péptido irrelevante no incitó actividad CTL o producción de IFN- γ por encima del basal. Estos estudios indican que los incrementos en células T citotóxicas activadas específicas del tratamiento en esplenocitos de ratones a los que se proporciona el tratamiento terapéutico se correlacionan con la reducción en el tamaño tumoral. Los detalles de los procedimientos usados se describen a continuación.

15 Generación de linfoblastos y estimulación *in vitro* (IVS)

20 Para examinar la respuesta CTL aguda y de memoria, los esplenocitos de ratones tratados se analizaron 7, 14 ó 130 días después de la inmunización respectivamente, a no ser que se indique otra cosa. Cuando se indica, el ensayo de citotoxicidad se realizó después de una ronda de IVS. Brevemente, tres días antes de la estimulación *in vitro*, se sacrificaron ratones C57BL/6 sin tratar por asfixia con CO₂ y los bazos se recogieron y disociaron. Los esplenocitos se lavaron y contaron en RPMI-10 en el que RPMI está suplementado con 10% suero fetal de ternera inactivado con calor (Sigma, St Louis, MO), 50 mM 2-mercaptoetanol (Gibco), 100 U/ml penicilina y 100 μ g/ml estreptomycin (Gibco). Los esplenocitos (10^6 células/ml) se cultivaron con linfoblastos tratados con lipopolisacárido (25 μ g/ml) y sulfato de dextrano (7 μ g/ml).

25 Los linfoblastos singénicos se irradiaron (con 4.000 rad usando una fuente de ¹³⁷Sc durante 15 minutos) y se cargaron con el péptido R9F (100 μ M). Los linfoblastos cargados con el péptido, activados con LPS (3×10^6 células/ml) se usaron para estimular esplenocitos de ratones inmunizados en una proporción de 3:1 en el que las células efectoras se ajustaron a 3×10^6 células/ml y se añadió T-stim (BD Biosciences, Mississauga, ON) a los pocillos para obtener una concentración final de 20%. Las células se incubaron a 37°C/5% CO₂ durante 6 días.

Ensayo JAM

30 Las células EL-4 se marcaron con 5 μ Ci/ml [Metil-³H] timidina (Amersham Pharmacia, Erlangen, Alemania). Las células se incubaron a 37°C/5% CO₂ durante 24 horas y se cargaron con R9F o péptidos irrelevantes (10 μ g/ml) durante una hora. Las suspensiones de células diana marcadas se recogieron, se lavaron dos veces en RPMI-10 y se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en U a una densidad de 2×10^3 células/pocillo. Las células efectoras se añadieron por dilución seriada empezando a una concentración de 2×10^5 células efectoras/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C/5% CO₂. Las células se aspiraron en filtros de fibra de vidrio y se contó el tritio usando un contador de centelleo Packard TopCount. El porcentaje de fragmentación de ADN se calculó usando la fórmula siguiente: % de fragmentación de ADN = (S - E)/E x 100, en la que S es ADN retenido (cuentas) en ausencia de tratamiento (espontáneo) y E es ADN retenido (cuentas) en presencia de células efectoras.

Análisis *ex vivo* de células T específicas de antígeno por ELISPOT

40 Los CTL activados específicos de antígeno en esplenocitos recogidos de ratones C57BL/6 tratados se detectaron usando un BD ELISPOT (BD Bioscience, San Diego, CA). Brevemente, en el día 7 después del tratamiento se recubrió una placa de 96 pocillos de nitrocelulosa con el anticuerpo de captura, un anticuerpo anti-IFN- γ de ratón purificado, y se incubó toda la noche a 4°C. El anticuerpo se desechó y la placa se bloqueó durante 2 horas y la disolución de bloqueo se eliminó. Los esplenocitos se añadieron cada uno a sus pocillos respectivos a una concentración inicial de 1 millón de células/pocillo en un volumen final de 100 μ l seguido de diluciones seriadas en pocillos posteriores de una fila. Los estimuladores y controles siguientes se añadieron a 100 μ l de medio para obtener su concentración final deseada. Se añadió a los pocillos bien, células C3 (5×10^5 células/ml), el péptido R9F (10 μ g/ml), el péptido irrelevante (10 μ g/ml) o sin péptidos. PMA (5 ng/ml, Sigma), ionomicina (500 ng/ml, Sigma), sirvieron como controles positivos y el péptido irrelevante y medio solo sirvieron como controles negativos. La placa se incubó toda la noche a 37°C/5% CO₂ después de lo cual se añadió el anticuerpo de detección, un anticuerpo anti-IFN- γ de ratón biotinilado, durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación, el anticuerpo de detección se desechó y se añadió el

conjugado enzimático (Estreptavidina-HRP) durante 1 hora y finalmente la placa se tiñó con una disolución de sustrato AEC durante 20 minutos. La placa se lavó y se dejó secar al aire toda la noche para visualizar las manchas usando una lente de aumento.

Tinción de citoquina intracelular (ICS)

5 Los esplenocitos se obtuvieron de los bazos de ratones sin tumores como se ha descrito previamente, se lavaron dos veces con RPMI-10 (500 x g, 5 minutos) y se resuspendieron en RPMI-10 (10×10^6 células/ml). Los esplenocitos (1×10^6 células/pocillo) se añadieron a pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano y se incubó con R9F o un péptido irrelevante a una concentración final de $3 \mu\text{g/ml}$ en columnas duplicadas para cada péptido. En experimentos que usaron células EL-4 para demostrar la función protectora de CTL CD8⁺ que producen IFN- γ , las células EL-4 (1×10^5 células/pocillo) cargadas bien con R9F o el péptido irrelevante se incubaron durante 6 horas a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ antes de las medidas de citotoxicidad.

10 La tinción de citoquina intracelular se realizó como se describe en el manual de instrucciones del kit Cytifix™/Cytoperm™ (BD Biosciences, Mississauga, ON). En breve, después de la adición de estimulantes, se añadió GolgiStop a cada pocillo y las placas se incubaron ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$) durante 4 horas. Las células se lavaron con tampón de tinción y se incubaron (20 minutos a 4°C , en oscuridad) con suero anti-CD8, se lavaron de nuevo con tampón de tinción seguido de incubación con anti-IFN- γ (30 minutos a 4°C en la oscuridad). Esto fue seguido de lavados con tampón perm/wash después de lo cual las células se resuspendieron con tampón perm/wash y se transfirieron a tubos FACS (BD Falcon). La tinción se evaluó por FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) y los datos se analizaron usando software CellQuest.

20

REFERENCIAS

Allegra, C.J. y R.W. Childs, Cytotoxins and cancer immunotherapy: The dance of the macabre. *J. National Cancer Institute*, 97:1396-1397, 2005.

Antonia, S.J. et al., Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 12:878-887, 2006.

Bellone, M. et al., Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma, *Journal of Immunology*, 165(5):2651-6, 2000.

Bronte, V. et al., Genetic Vaccination with "Self" Tyrosinase-related Protein 2 Causes Melanoma Eradication but not Vitiligo, *Cancer Research*, 60:253-258, January 15, 2000.

Celis E. et al., Recognition of hepatitis B surface antigen by human T lymphocytes. Proliferative and cytotoxic responses to a major antigenic determinant defined by synthetic peptides, *Journal of Immunology*, 140:1808-1815, 1988.

Chakraborty, M. et al., External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Research*, 64:4328-4337, 2004.

Chong P. et al., Identification of T- and B-cell epitopes of the S2 and S3 subunits of pertussis toxin by use of synthetic peptides, *Infection and Immunity*, 60:4640-4647, 1992.

Correale, P. et al, Fluorouracil-based chemotherapy enhances the antitumor activity of a thymidylate synthase-directed

polyepitopic peptide vaccine. *Journal of the National Cancer Institute* 97:1437-1445, 2005.

DeLeo, A.B., p53-based immunotherapy of cancer, *Critical Reviews in Immunology*, 18:29, 1998.

Demotz S. et al., Delineation of several DR-restricted tetanus toxin T cell epitopes, *Journal of Immunology*, 142:394-402, 1989.

Diethelm-Okita, B.M. et al., Universal epitopes for human CD4⁺ cells on tetanus and diphtheria toxins. *Journal of Infectious Diseases*, 181:1001-1009, 2000.

Dudley, M.E. et al., Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma, *Journal of Immunotherapy*, 24(4): 363-73 2001.

Fernando, G.J. et al., Vaccine-induced Th1-type responses are dominant over Th2-type responses in the short term whereas pre-existing Th2 responses are dominant in the longer term. *Scandinavian Journal of Immunology*, 47(5): 459-65, 1998.

Frezard, F., Liposomes: From biophysics to the design of peptide vaccines. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, 32:181-189, 1999.

Gregoriadis, G., Immunological adjuvants: A role for liposomes, *Immunology Today*, 11:89-97, 1990.

Gulley, J.L. et al., Combining a recombinant cancer vaccine with standard definitiveradiotherapy in patients with localized prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 11: 3353-3362, 2005.

Knutson, K.L., et al., Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-lived peptide-specific immunity." *Clinical Cancer Research*, 8(5): 1014-8, 2002.

Pilon-Thomas, S. et al., Immunostimulatory Effects of CpG-ODN Upon Dendritic Cell-Based Immunotherapy in a Murine Melanoma Model, *Journal Immunotherapy*, 29(4), July/August 2006.

Vierboom, M.P.M. et al., p53: a target for T-cell mediated immunotherapy, *Peptide-Based Cancer Vaccines*, W. M. Kast, Ed. Landes Bioscience, Georgetown, p.40, 2000.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ImmunoVaccine Technologies Inc.

<120> Uso de liposomas en un vehículo que comprende una fase hidrofóbica continua como un vehículo para el tratamiento del cáncer

<130> 78961-49

<150> CA 2,523,032

<151> 2005-10-07

<150> CA 2,533,705

<151> 2006-01-13

<150> CA 2,542,212

<151> 2006-04-07

<160> 55

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano

<400> 1

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano

<400> 2

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano

<400> 3

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Papilomavirus humano

<400> 4

Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile

1 5

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano

 <400> 5
 Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 1 5 10

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Antígeno relacionado con melanoma

<400> 6
 Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Antígeno relacionado con melanoma

<400> 7
 Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Antígeno relacionado con melanoma

<400> 8
 Lys Tyr Ile Cys Asn Ser Ser Cys Met
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Antígeno relacionado con melanoma

<400> 9
 Lys Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met
 1 5

<210> 10
 <211> 13

<212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Epitopo T auxiliar universal (PADRE)

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa= ciclohexilalanil

<400> 10
 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Thr Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 11
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Epitopo T auxiliar (F21E)

<400> 11
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> adyuvante

<400> 12
 tccatcacgt tcctgacggt

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Péptido Irrelevante

<400> 13
 Lys Ile Met Cys Asn Ser Ser Cys Met
 1 5

<210> 14
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> péptido unido

ES 2 451 599 T3

<400> 14
 Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Ala Ala Tyr Tyr Met Leu
 1 5 10 15

Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Ala Ala Tyr Leu Leu Met Gly Thr Leu
 20 25 30

Gly Ile Val Ala Ala Tyr Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
 35 40 45

<210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Dipéptido

<400> 15
 Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Lys Lys Pro Leu Leu Met
 1 5 10 15

Gly Thr Leu Gly Ile Val
 20

<210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Dipéptido

<400> 16
 Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Lys Lys Pro Tyr Met Leu Asp Leu
 1 5 10 15

Gln Pro Glu Thr Thr
 20

<210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> PADRE acoplado al epitopo mk9M p53

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3) .. (3)
 <223> Xaa= ciclohexilalanil

<400> 17
 Ala Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ile
 1 5 10 15

Cys Asn Ser Ser Cys Met
 20

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Mart-1/Melan-A

<400> 18
 Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Mart-1/Melan-A

<400> 19
 Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5 10

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Mart-1/Melan-A

<400> 20
 Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
 1 5

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Mart-1/Melan-A

<400> 21
 Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu
 1 5 10

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Mart-1/Melan-A

<400> 22
 Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr
 1 5 10

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> MCIR

<400> 23
 Thr Ile Leu Leu Gly Ile Phe Phe Leu
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> MCIR

<400> 24
 Phe Leu Ala Leu Ile Ile Cys Asn Ala
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 25
 Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
 1 5

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 26
 Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
 1 5 10

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 27
 Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val
 1 5

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 28
 Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val
 1 5 10

<210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 29
 Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 30
 Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
 1 5 10

<210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 31
 Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
 1 5

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 32
 Val Leu Tyr Arg Tyr Gly Ser Phe Ser Val
 1 5 10

<210> 33
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 33
 Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 34
 Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 35
 Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys
 1 5

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 36
 Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys
 1 5 10

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 37
 Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 38
 Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys
 1 5

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 39
 Val Tyr Phe Phe Leu Pro Asp His Leu
 1 5

<210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Gp100

<400> 40
 Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile
 1 5

<210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> PSA

<400> 41
 Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr
 1 5 10

<210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> PSA

<400> 42
 Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val
 1 5 10

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> PSA

<400> 43
 Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val
 1 5 10

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> PSM

<400> 44
 His Ser Thr Asn Gly Val Thr Arg Ile Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 45
 Lys Cys Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr
 1 5

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 46
 Ser Ser Asp Tyr Val Ile Pro Ile Gly Thr Tyr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 47
 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
 1 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 48
 Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu
 1 5

<210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 49
 Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 50
 Ser Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Tirosinasa

<400> 51
 Met Ser Leu Gln Arg Gln Phe Leu Arg
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> TRP1

<400> 52
 Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> TRP2

<400> 53
Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> TRP2

<400> 54
Leu Leu Gly Pro Gly Arg Pro Tyr Arg
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> p53

<400> 55
Ala Asn Asp Pro Ile Phe Val Val Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrofóbica;
 - liposomas; y
- 5 - al menos un antígeno capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL);
 - preferiblemente que comprende además al menos un epítipo de T auxiliar.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el epítipo de T auxiliar es una molécula separada del al menos un antígeno o, en la que el antígeno comprende el epítipo de T auxiliar.
3. La composición de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que el antígeno es un polipéptido.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno comprende un epítipo de CTL, o una combinación de epítopos de CTL, en la que preferiblemente el epítipo de CTL deriva de un virus.
5. La composición de la reivindicación 4, que comprende una pluralidad de epítopos de CTL unidos para formar un único polipéptido y/o en la que el epítipo de CTL deriva de una proteína asociada a tumor.
- 15 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el epítipo de T auxiliar es un epítipo de T auxiliar universal.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el epítipo de T auxiliar está fusionado con el al menos un antígeno.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición es capaz de incrementar las células que producen IFN- γ .
- 20 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un adyuvante, preferiblemente un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN) y/o un lipopéptido.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para el tratamiento de cáncer en un sujeto, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano; y/o preferiblemente un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cervical, vulvar, melanoma, mama, pulmón, ovario, mieloma múltiple, linfoma de células B, hepatoma, sarcoma, vejiga, cáncer de próstata, tiroides, tumores H/N, colon, rectal, renal, pancreático, gástrico, adenocarcinoma, leucemia de células T, linfosarcoma, uterino, esofágico, linfomas no de Hodgkin, endometrial y tumores RCC.
- 25 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el liposoma, preferiblemente obtenido de lípidos naturales; lípidos sintéticos que incluyen preferiblemente constituyentes de ácidos grasos seleccionados de lauroil, miristoil, palmitoil, estearoil, araquidoil, oleoil, linoleoil y eurocoil, o combinaciones de éstos; esfingolípidos; lípidos éter; esteroides; cardiolipina; lípidos catiónicos; y lípidos modificados con poli (etilen glicol) y otros polímeros; comprende un fosfolípido y/o un colesterol no esterificado.
- 30 12. Una composición producida por un método que comprende combinar en una primera etapa liposomas y un antígeno capaz de inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) y en una segunda etapa añadir un vehículo que comprende una fase continua de una sustancia hidrofóbica, en la que preferiblemente dicho antígeno está encapsulado en dichos liposomas.
- 35 13. La composición según la reivindicación 12, en la que dicho método comprende además combinar un epítipo de T auxiliar con dichos liposomas y dicho antígeno, antes de añadir dicho vehículo, en la que preferiblemente dicho epítipo de T auxiliar está encapsulado en dichos liposomas, y/o en la que preferiblemente dicho epítipo de T auxiliar es una molécula separada de dicho antígeno o dicho antígeno comprende dicho epítipo de T auxiliar.
- 40 14. La composición según la reivindicación 12 ó 13, en la que dicho método comprende además combinar un adyuvante con dichos liposomas, dicho antígeno y dicho vehículo, en la que preferiblemente dicho adyuvante está encapsulado en dichos liposomas.
15. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que dichos liposomas se liofilizan antes de combinarlos con dicho vehículo.

16. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que al menos parte de dicho antígeno no está encapsulada en dichos liposomas, estando dicho antígeno asociado con la superficie externa de dichos liposomas y/o separado de dichos liposomas en dicho vehículo.

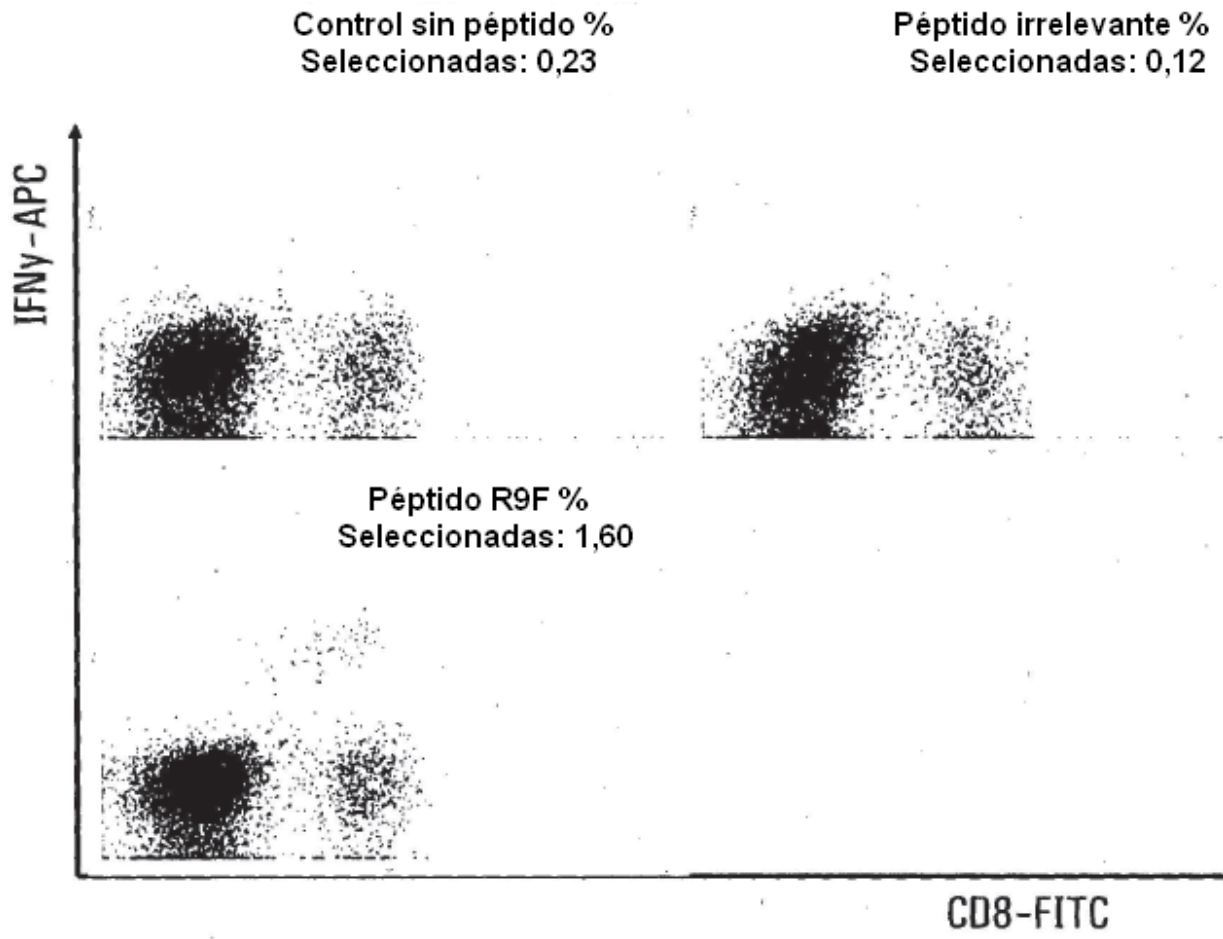


FIG. 1

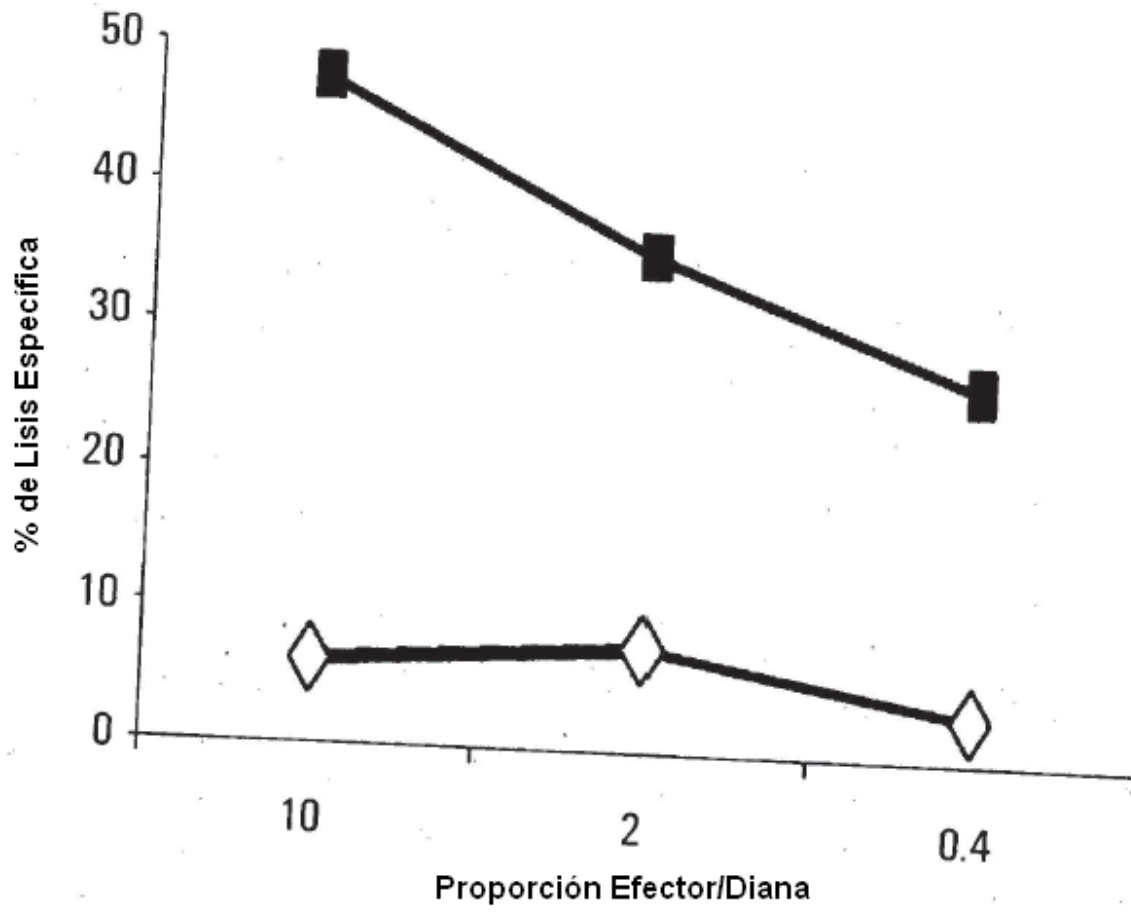


FIG. 2

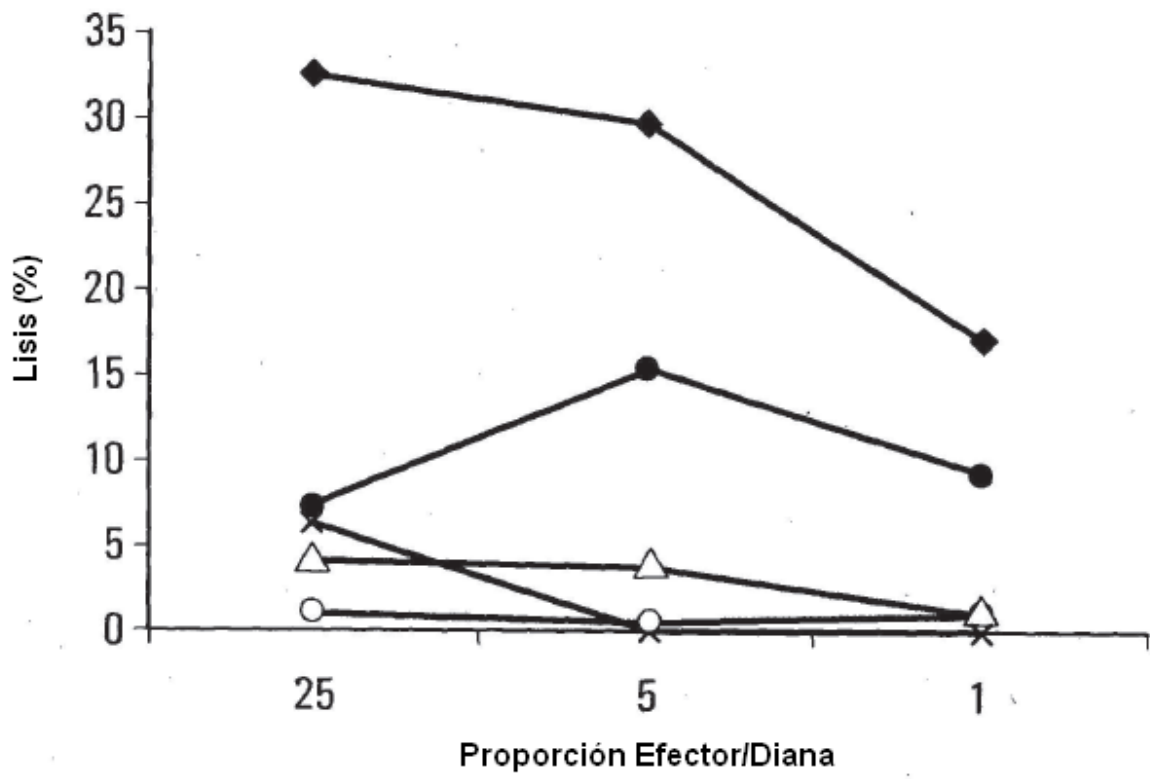


FIG. 3

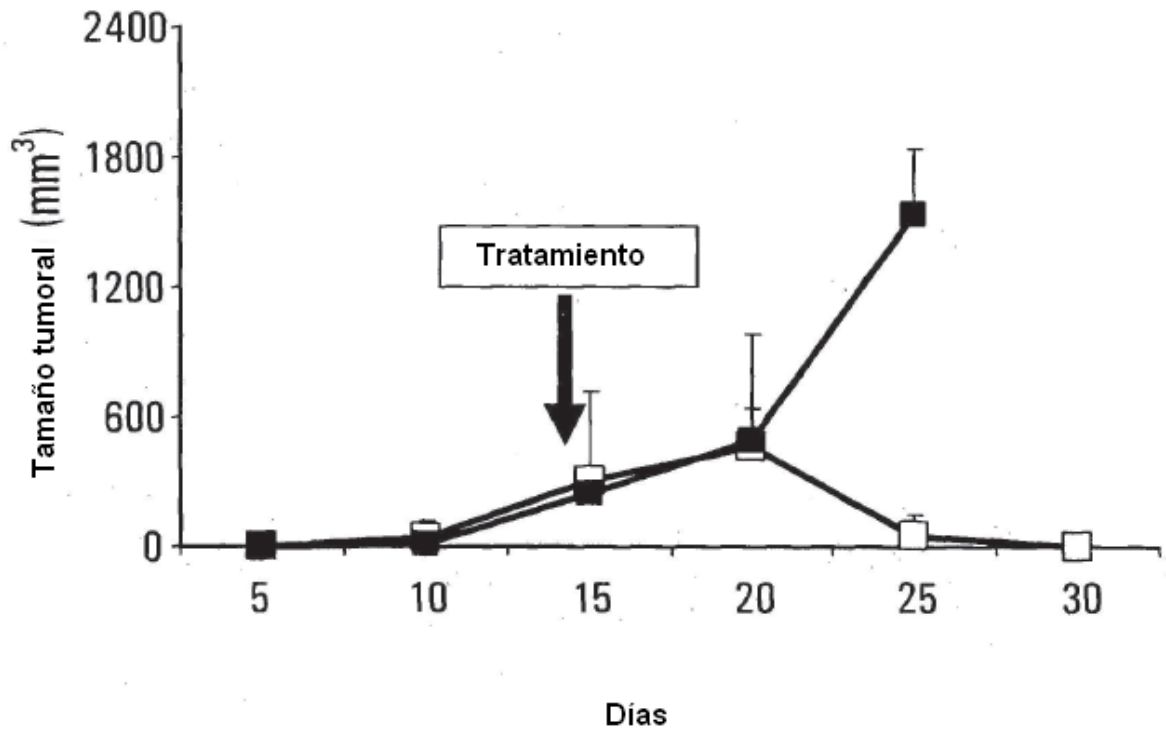


FIG. 4

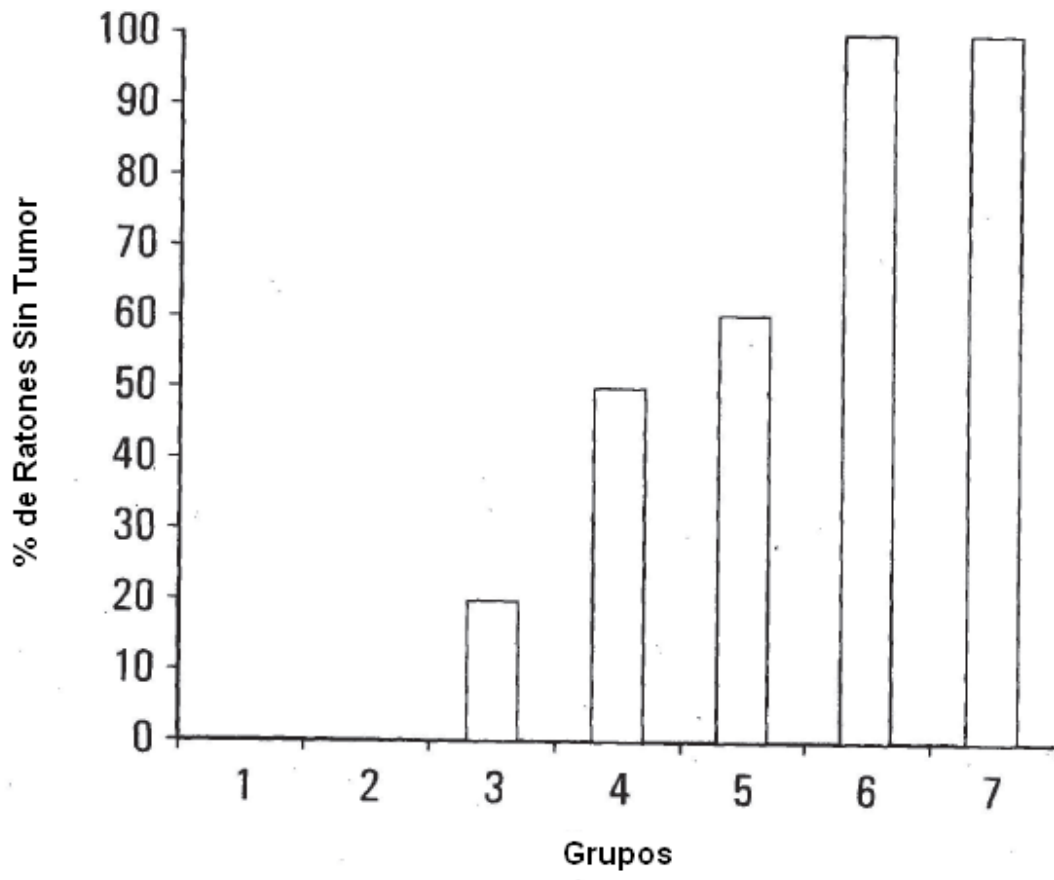


FIG. 5

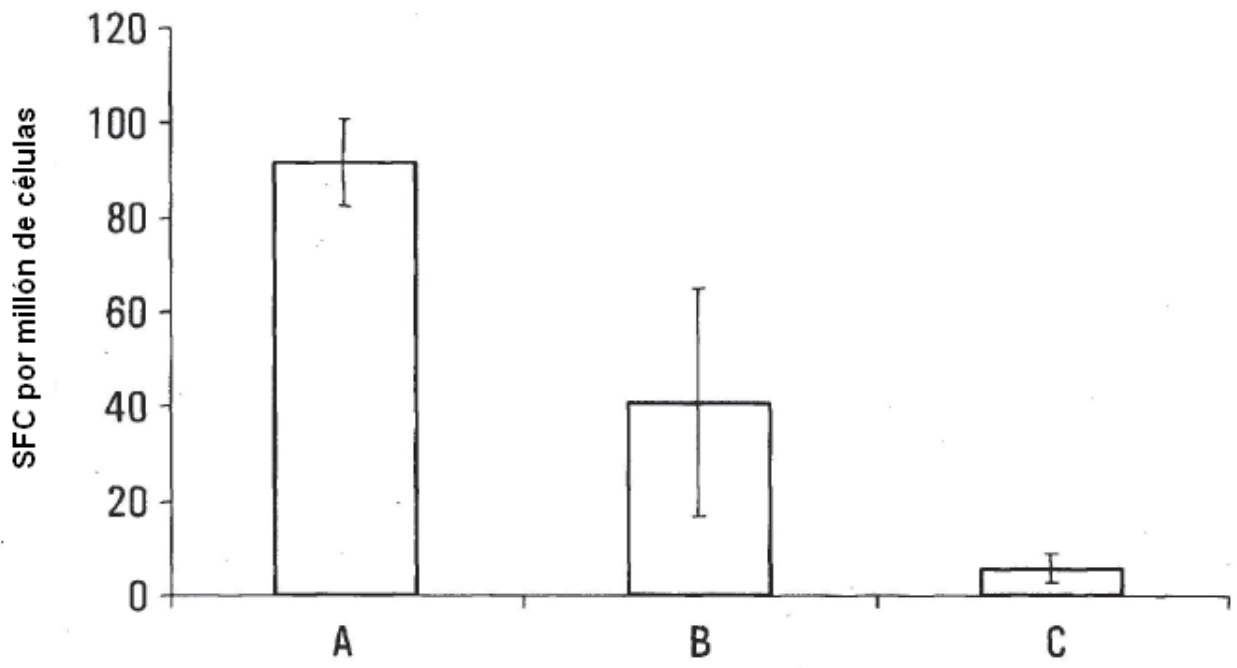


FIG. 6

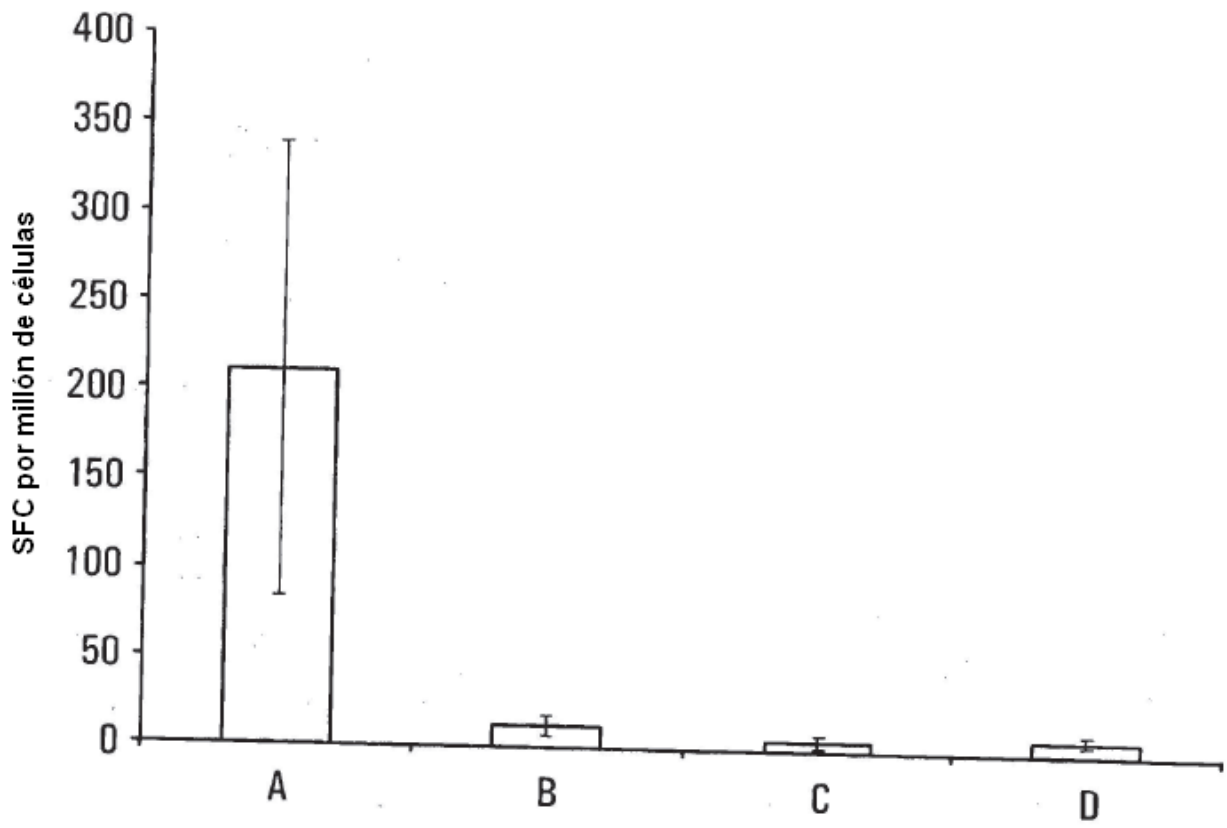


FIG. 7

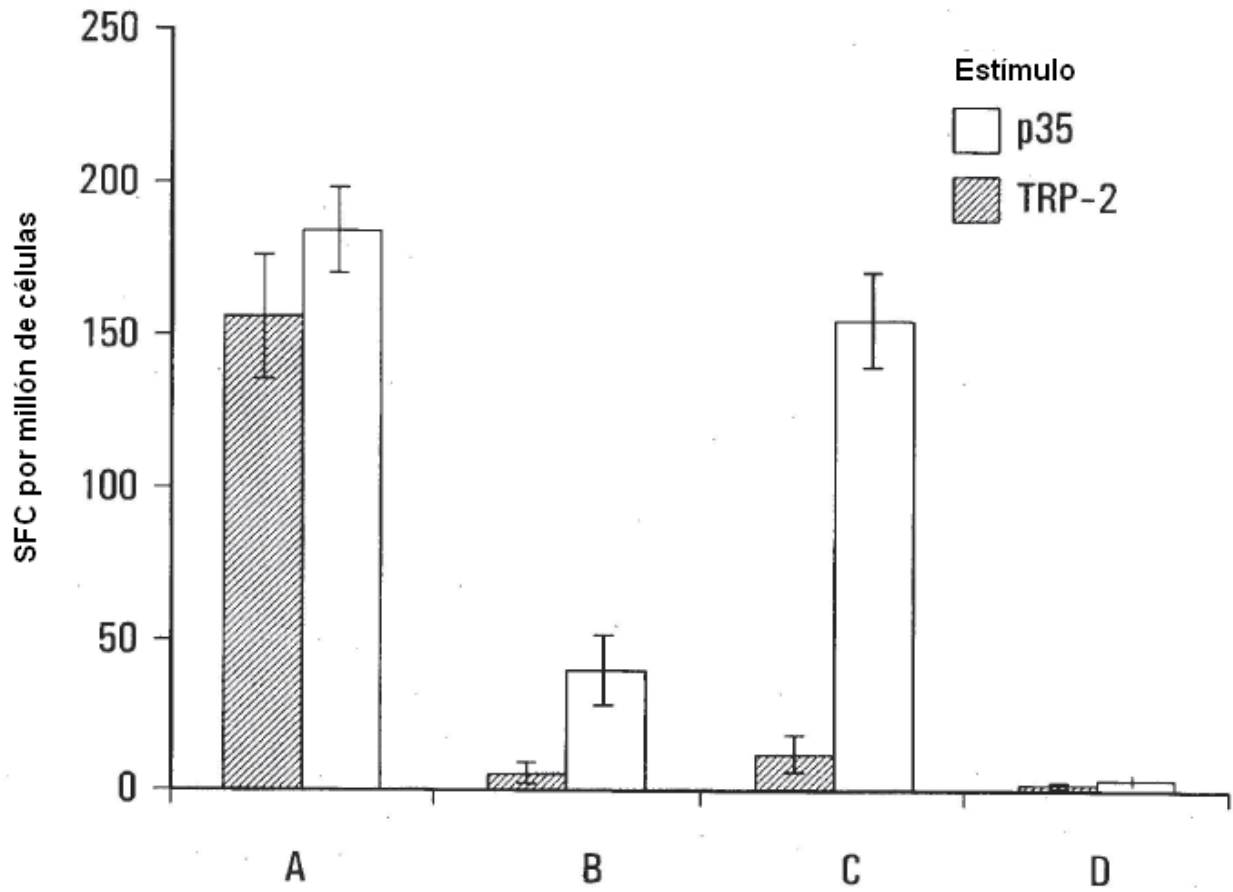


FIG. 8

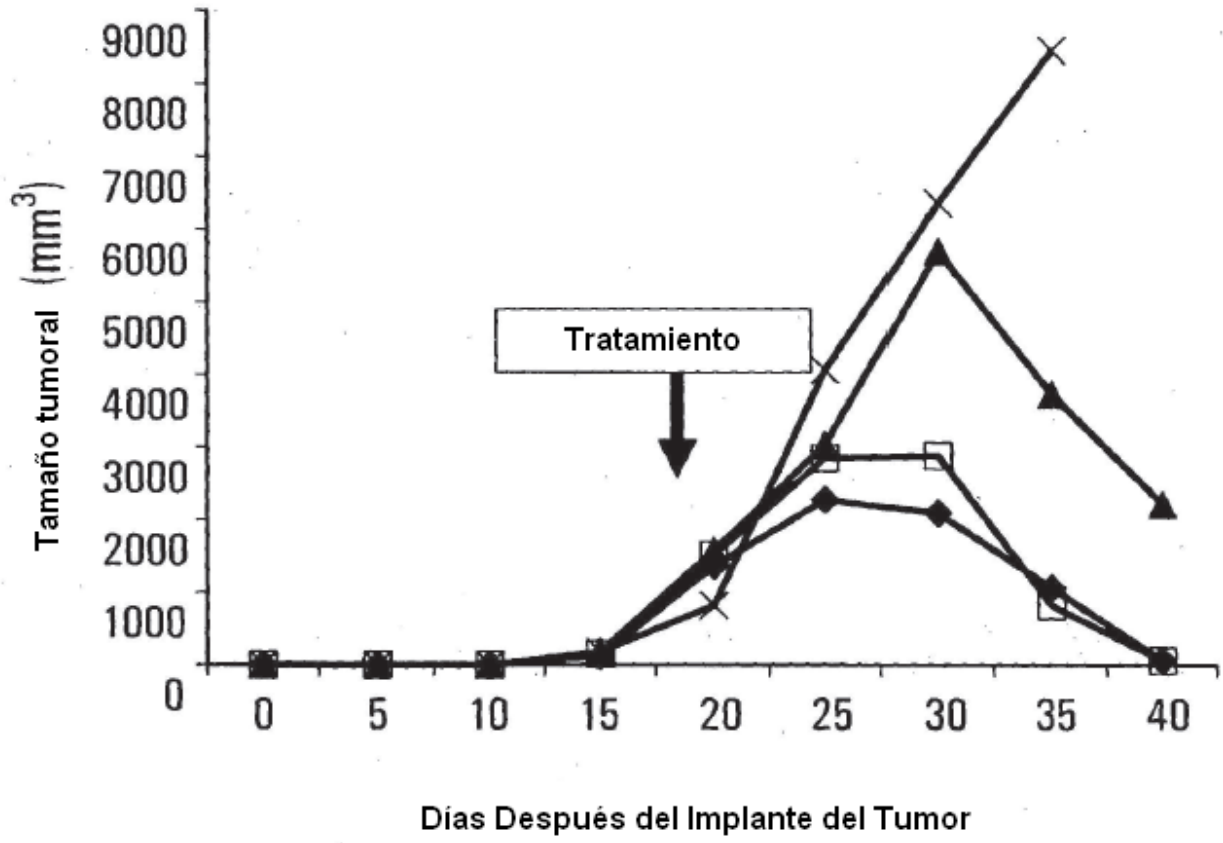


FIG. 9

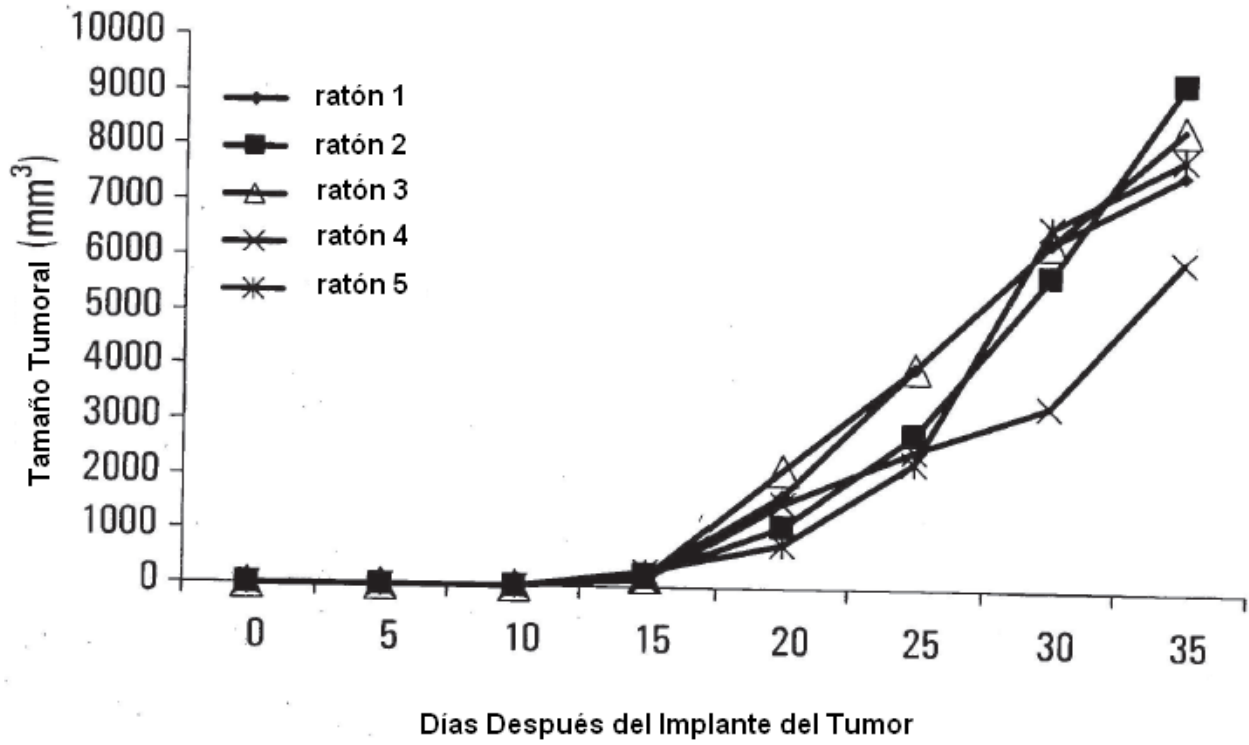


FIG. 10

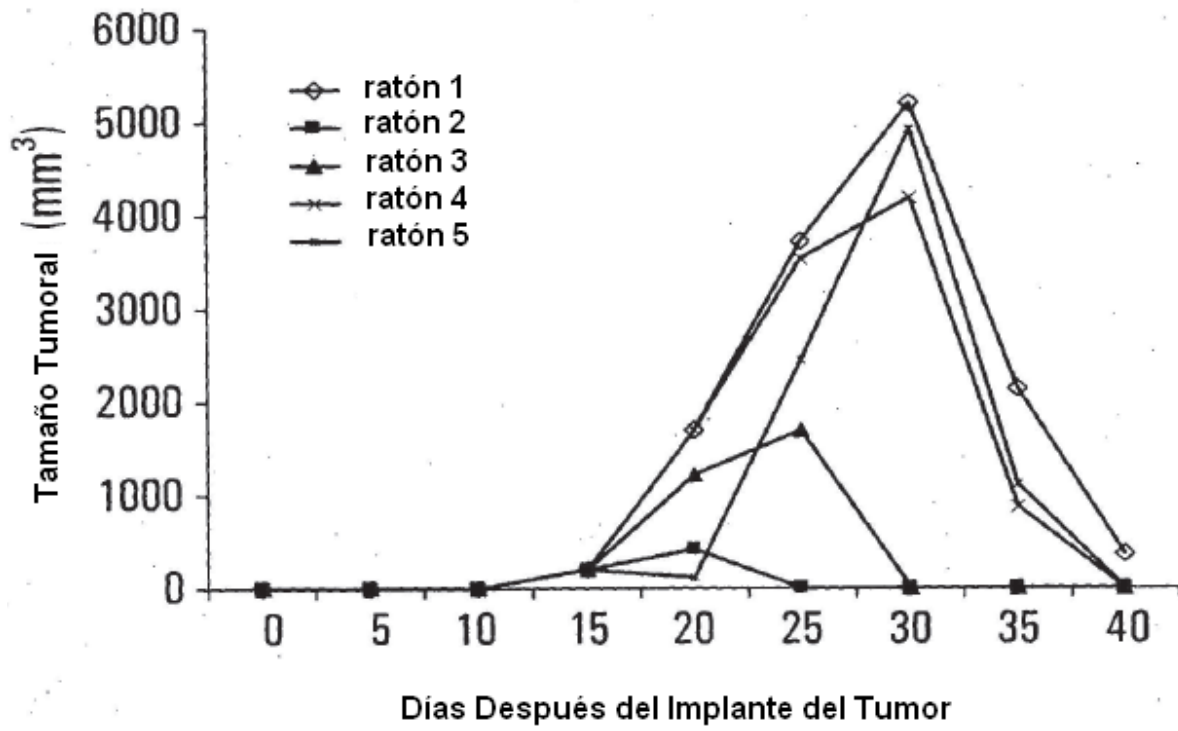


FIG. 11

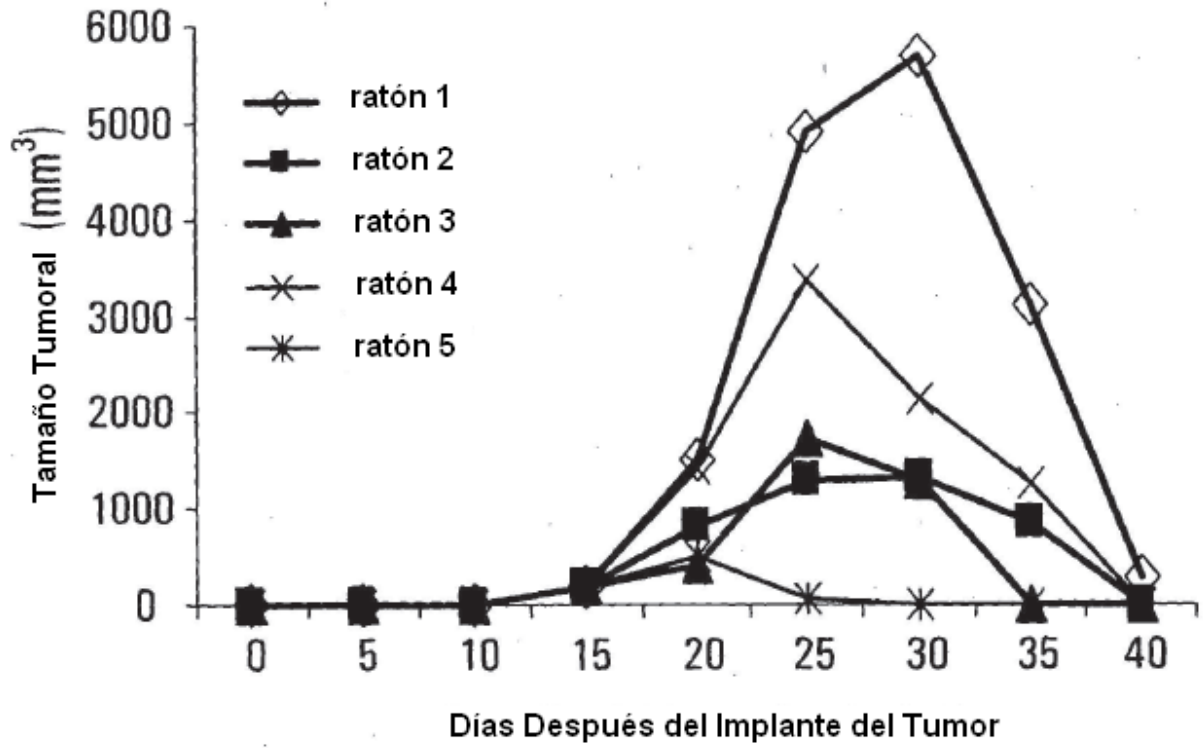


FIG. 12

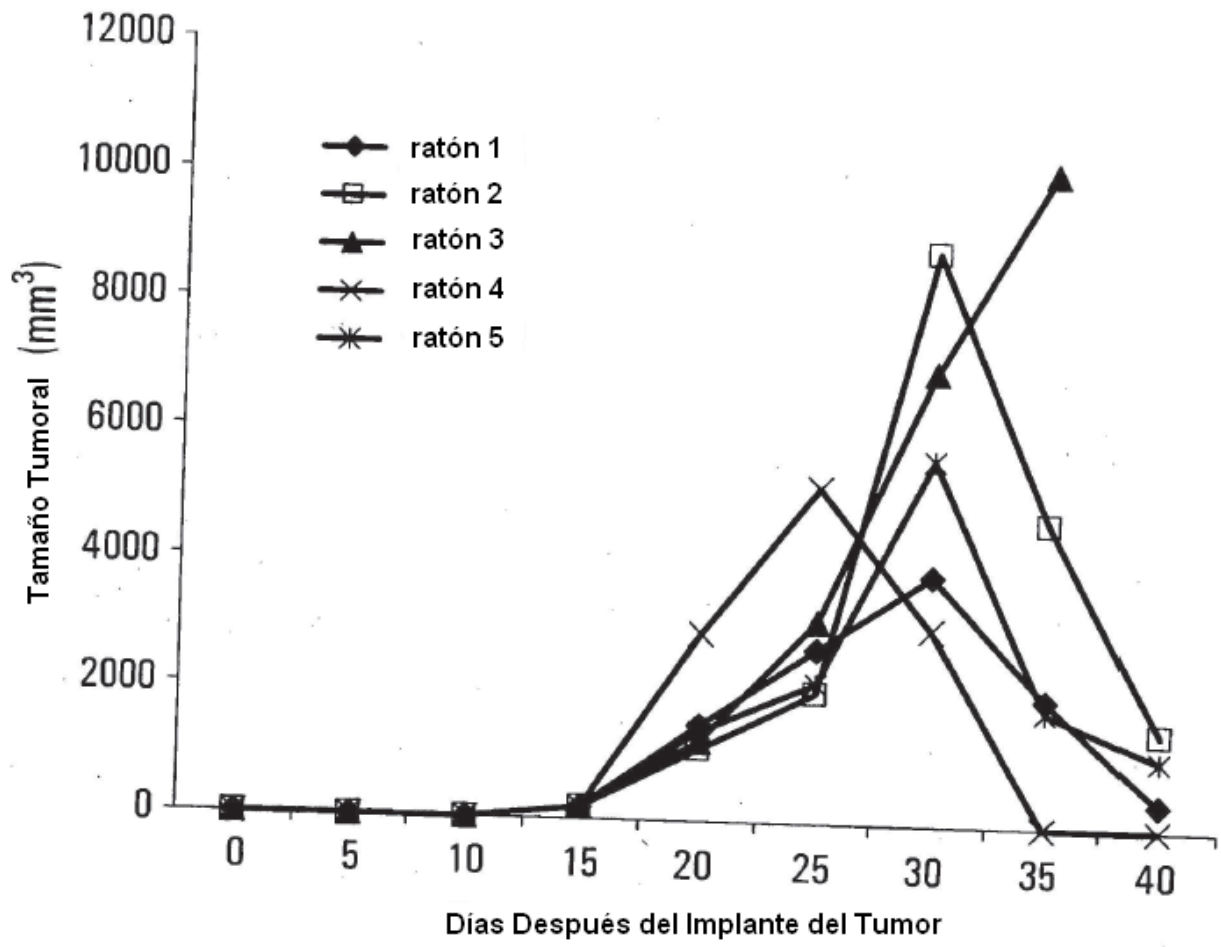
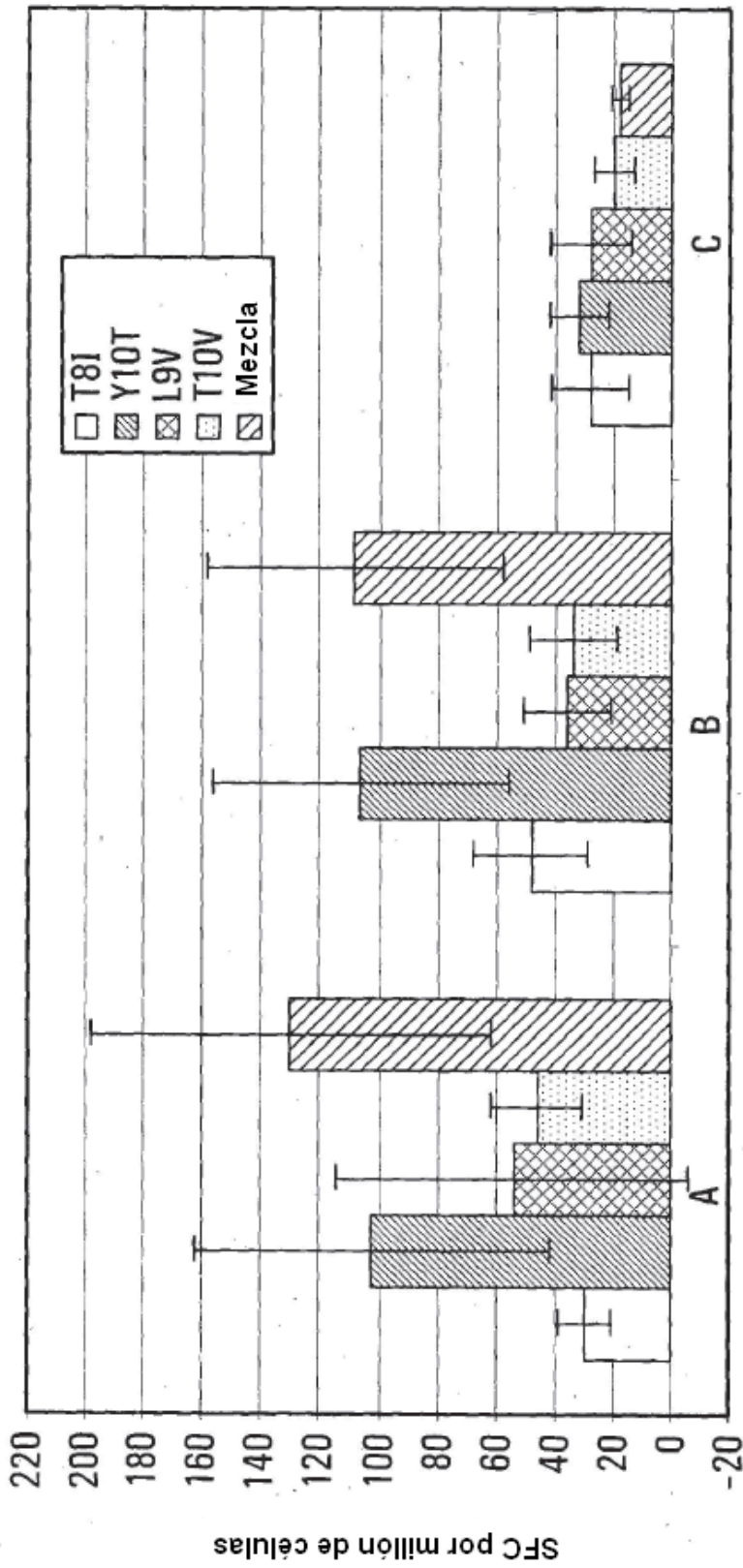


FIG. 13



Grupo de Tratamiento

FIG. 14

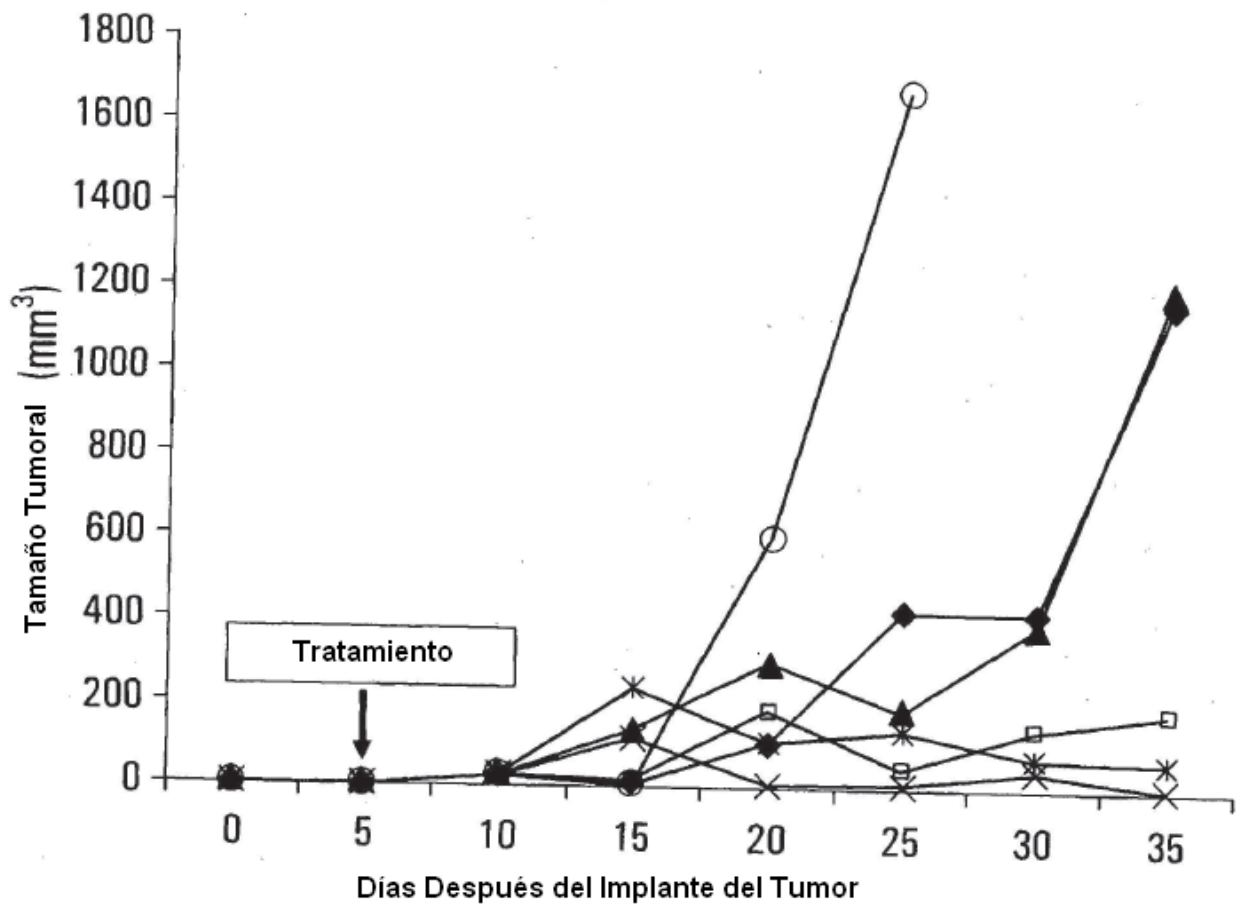


FIG. 15

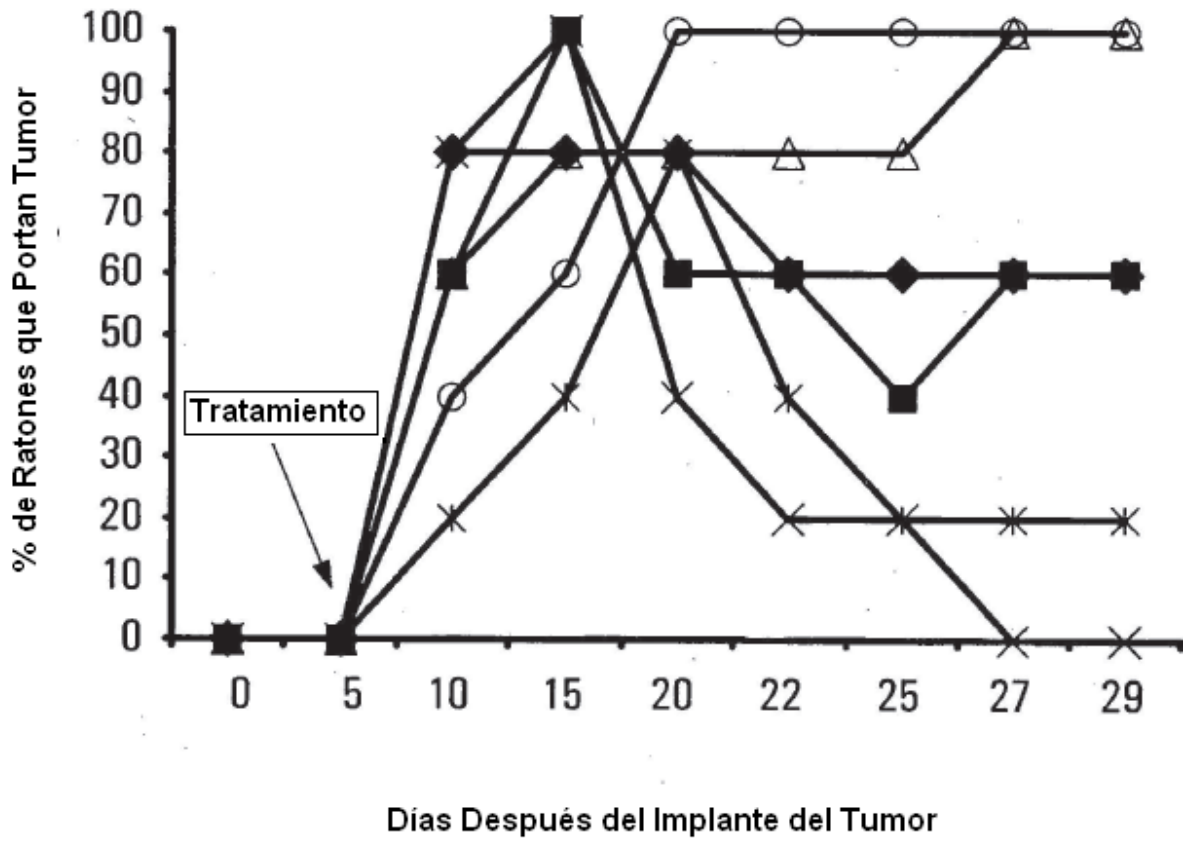


FIG. 16

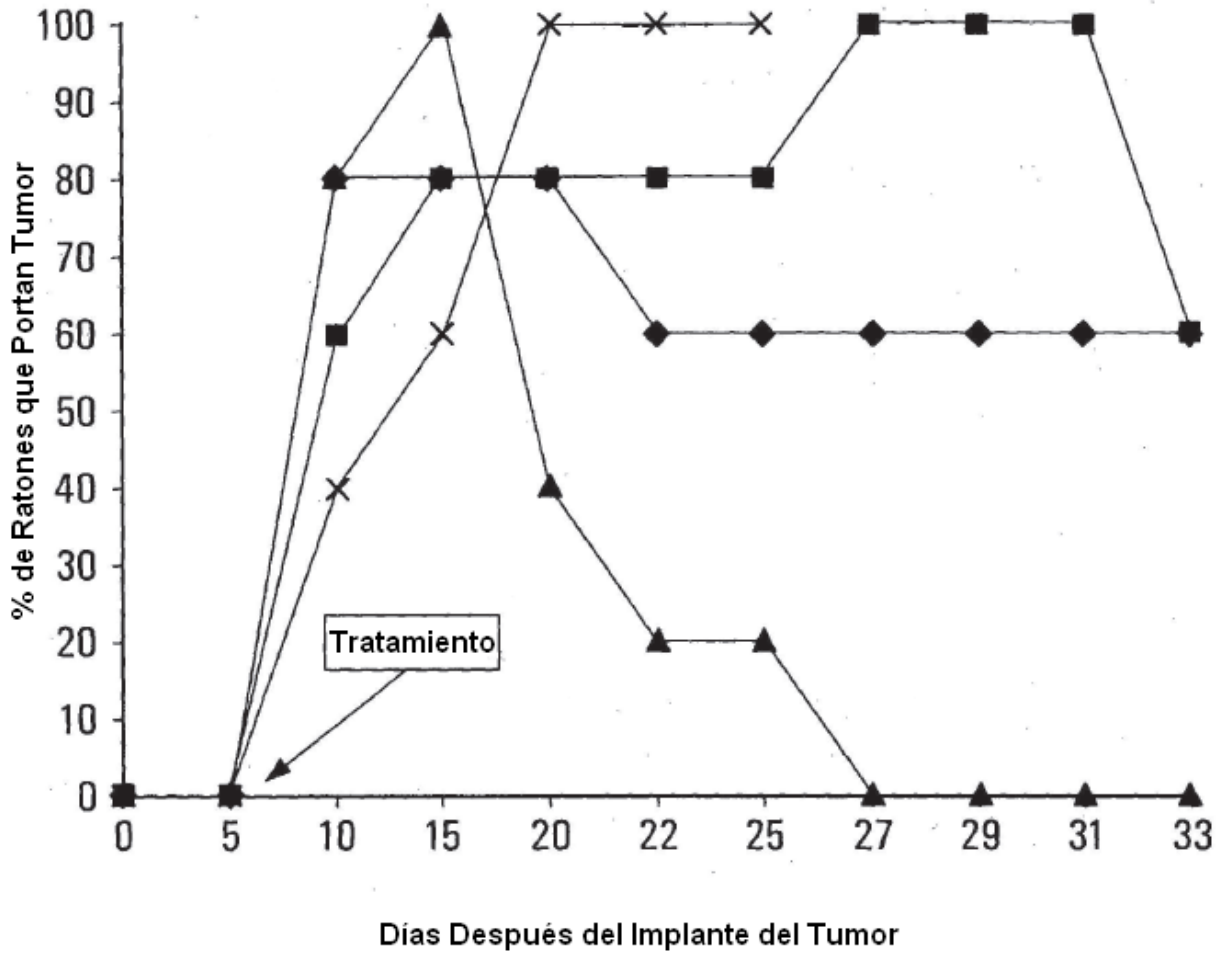


FIG. 17

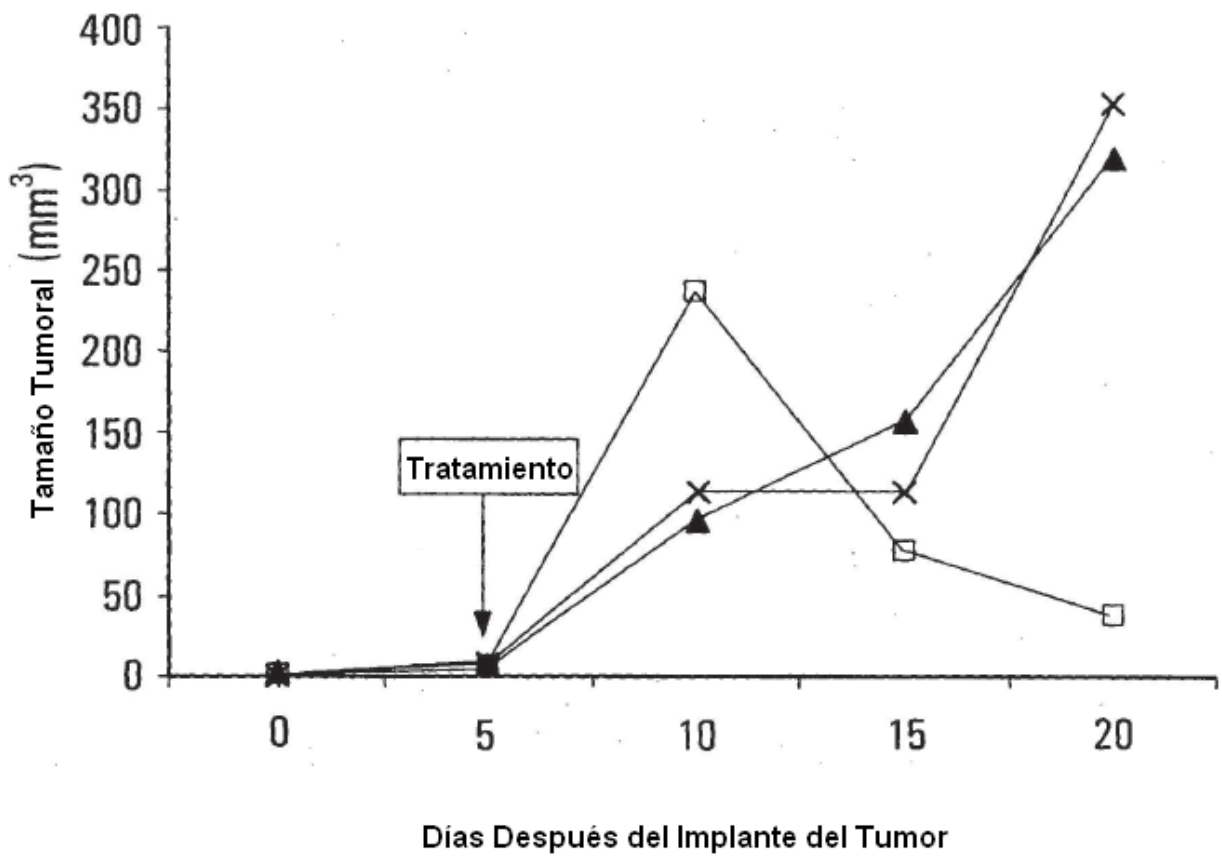


FIG. 18

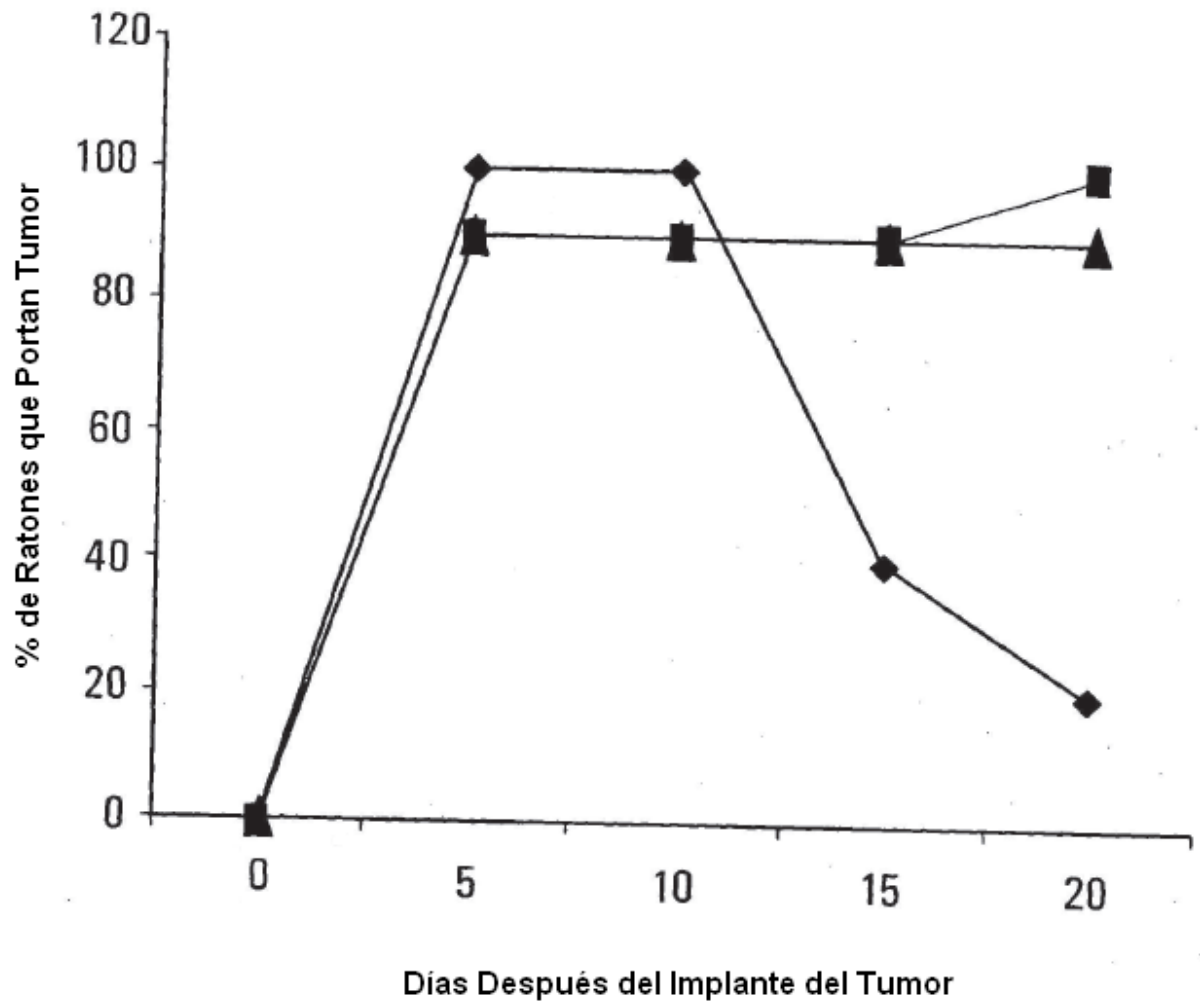


FIG. 19

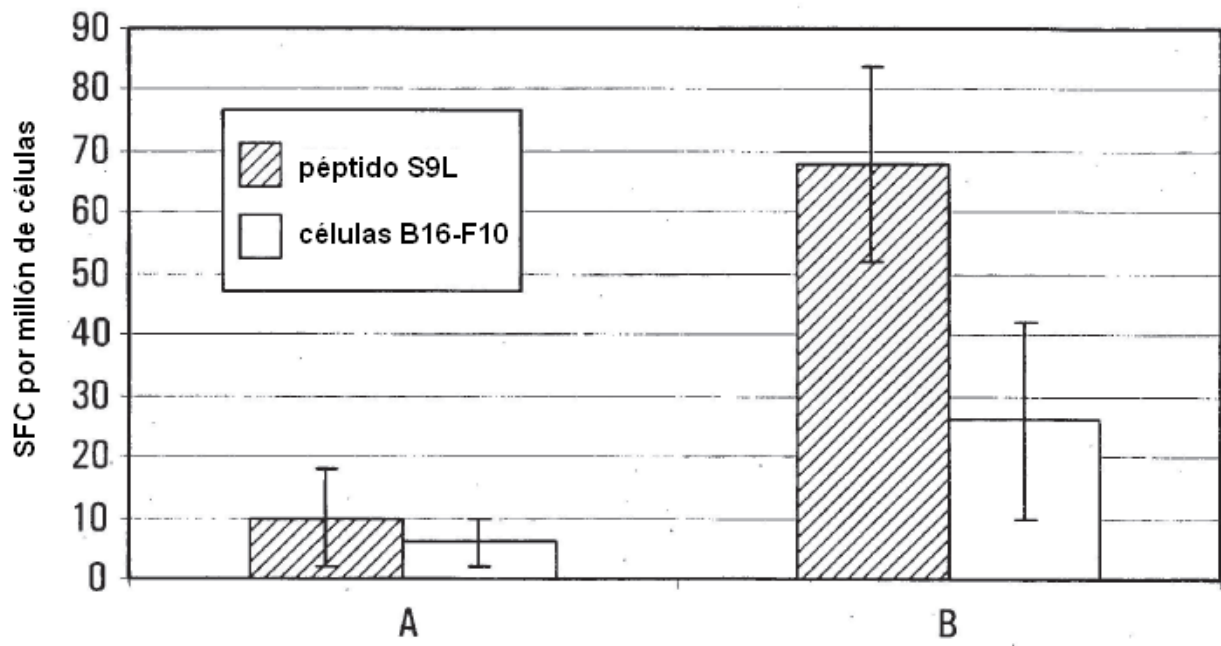


FIG. 20