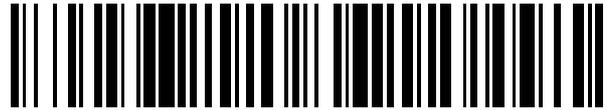


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 666**

51 Int. Cl.:

C07K 5/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2004 E 04759962 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 1620456**

54 Título: **Péptidos antígenos HLA-A2 asociados a un tumor y composiciones**

30 Prioridad:

18.04.2003 US 463724 P

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

23.04.2014

73 Titular/es:

**BIOTECH SYNERGY, INC. (100.0%)
5916 Via Zurita
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**FIKES, JOHN D.;
ISHIOKA, GLENN;
SETTE, ALESSANDRO y
CHESNUT, ROBERT W.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 456 666 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos antígenos HLA-A2 asociados a un tumor y composiciones

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de la biología. En un aspecto concreto, se refiere a péptidos, polinucleótidos y composiciones útiles para controlar o inducir una respuesta inmunológica contra antígenos asociados a tumores seleccionados.

Técnica relacionada

10 El campo de la inmunoterapia está produciendo nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer, que incluyen el desarrollo de vacunas del cáncer mejoradas (Krul, K.G., *Decision Resources*, 10.1-10.25 (1998)). Aunque las vacunas proporcionan un mecanismo para dirigir las respuestas inmunológicas hacia las células tumorales, existe una serie de mecanismos mediante los cuales las células tumorales evitan los procesos inmunológicos (Pardoll, D.M., *Nature Medicine* (suplemento de vacunas), 4:525-531 (1998)). Avances recientes han indicado que puede aumentarse la eficacia de las vacunas de péptidos cuando se combinan con estrategias que potencian la estimulación de las respuestas inmunológicas, tales como el uso de interleuquina-2 o células dendríticas (DC) autólogas (Abbas *et al.*, eds., *Cellular and Molecular Immunology*, 3ª edición, W.B. Saunders Company, pub. (1997)).

15 En un estudio de fase I, Murphy *et al.* demostraron que los péptidos de unión al antígeno de leucocitos humanos (HLA)-A2 que se corresponden con las secuencias presentes en el antígeno específico de próstata (PSA) estimulan respuestas de linfocitos de células T citotóxicas (CTL) específicas en pacientes con cáncer de próstata (Murphy *et al.*, *The Prostate*, 29:371-380 (1996)). Rosenberg *et al.* evaluaron la seguridad el mecanismo de acción de un péptido de unión a HLA-A2 sintético derivado del antígeno asociado a melanoma gp100, como una vacuna del cáncer para tratar pacientes con melanoma metastásico (Rosenberg *et al.*, *Nature Med.*, 4:321-327 (1998)). Basándose en ensayos inmunológicos, 91% de los pacientes fueron inmunizados con éxito por el péptido sintético. Además, 42% (13/31) de los pacientes que recibieron la vacuna de péptidos en combinación con un tratamiento con IL-2 mostraron respuestas de cáncer objetivas. Además, Nestle *et al.* han indicado la vacunación de 16 pacientes con melanoma con DC pulsadas con lisados tumorales o con péptidos (Nestle *et al.*, *Nature Med.*, 4:328-332 (1998)). Las DC pulsadas con péptidos indujeron respuestas inmunológicas en 11/12 pacientes inmunizados con una vacuna formada por 1-2 péptidos. Fueron evidentes respuestas objetivas en 5/16 pacientes (3 pulsados con péptidos, 2 pulsados con lisados tumorales) evaluados en este estudio. Estos estudios de seguridad de fase I proporcionaron pruebas de que los péptidos de unión a HLA-A2 de antígenos asociados a tumores conocidos muestran el mecanismo de acción esperado. Estas vacunas en general son seguras y bien toleradas. Se han descrito moléculas de vacunas relacionadas con al menos cuatro antígenos del cáncer, CEA, HER2/neu, MAGE2, y MAGE3 (Kawashima *et al.*, *Human Immunology*, 59:1-14 (1998)).

20 Estudios preclínicos han demostrado que las DC pulsadas con vacunas median en los efectos antitumorales a través de la estimulación de CTL específicos de antígeno (Mandelboim *et al.*, *Nature Med.*, 1: 1179-1183 (1995); Celluzzi *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183:283-287 (1996); Zitvogel *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183:87-97 (1996); Mayordomo *et al.*, *Nature Med.*, 1:1297-1302 (1995)). Los CTL lisan directamente las células tumorales y también segregan una serie de citoquinas, tales como el interferón-gamma (IFN γ), el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), que amplifican aún más la reactividad inmunológica contra las células tumorales. Los CTL reconocen antígenos asociados a tumores (TAA) en forma de un complejo compuesto por epitopos de péptidos de 8-11 restos aminoácidos, unido a moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) (Schwartz, B.D., *The human major histocompatibility complex HLA in basic & clinical immunology*, Stites *et al.*, eds., Lange Medical Publication, Los Altos, pp. 52-64, 4ª ed.). Los epitopos de péptidos se generan a través del procesamiento intracelular de proteínas. Lo péptidos procesados se unen a moléculas de MHC recién sintetizadas, y los complejos de MHC-epitopo son expresados sobre la superficie celular. Estos complejos de MHC-epitopo son reconocidos por el receptor de células T de los CTL. Este acontecimiento de reconocimiento es necesario para la activación de los CTL, así como para la inducción de las funciones efectoras, tales como la lisis de la célula tumoral diana.

25 Las moléculas de MHC son proteínas muy polimórficas que regulan las respuestas de células T (Schwartz, B.D., *The human major histocompatibility complex HLA in basic & clinical immunology*, Stites *et al.*, eds., Lange Medical Publication, Los Altos, pp. 52-64, 4ª ed.). Los homólogos de MHC específicos de especie que muestran epitopos de CTL en seres humanos se denominan antígenos de leucocitos humanos ("HLA"). Las moléculas de HLA de clase I pueden dividirse en varias familias o "superfamilias" basándose en su capacidad para unirse a repertorios de péptidos similares. Las vacunas que se unen a múltiples supertipos de HLA tales como, por ejemplo, A2, A3 y B7, proporcionarán una amplia cobertura a poblaciones étnicamente no sesgada. Tal como puede observarse en la tabla 1, la cobertura a poblaciones es de aproximadamente 84-90% para diversas etnias, con una cobertura media de las etnias de muestra de aproximadamente 87%.

30 Uno de los principales factores que contribuyen a la interacción dinámica entre el hospedante y la enfermedad es la respuesta inmunológica montada contra el patógeno, la célula infectada o la célula maligna. En muchos trastornos,

estas respuestas inmunológicas controlan la enfermedad. Varios sistemas de modelos animales y estudios prospectivos de infecciones naturales en seres humanos sugieren que las respuestas inmunológicas contra un patógeno pueden controlar al patógeno, evitar el avance hacia la enfermedad grave y/o eliminar el patógeno. Un tema común es la necesidad de una respuesta de células T multiespecífica, y que las respuestas con un rango más estrecho parecen ser menos eficaces.

En el escenario del cáncer, se han producido varios descubrimientos que indican que las respuestas inmunológicas pueden afectar al crecimiento neoplásico:

- En primer lugar, la demostración en muchos modelos animales diferentes de que las células T antitumorales, restringidas por MCH de clase I, pueden evitar o tratar tumores.

- En segundo lugar, se han obtenido resultados alentadores procedentes de ensayos de inmunoterapia.

- En tercer lugar, las observaciones realizadas en el transcurso de la enfermedad natural correlacionan el tipo y la composición del infiltrado de células T dentro de los tumores con resultados clínicos positivos (Coulie P.G., *et al.*, Antitumor immunity at work in a melanoma patient, en *Advances in Cancer Research*, 213-242, 1999).

Además, los tumores habitualmente tienen la capacidad de mutar, cambiando con ello su reconocimiento inmunológico. Por ejemplo, la presencia de CTL mono-específicos también se correlaciona con el control del crecimiento tumoral, hasta que surge la pérdida del antígeno (Riker A. *et al.*, Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma, *Surgery*, agosto, 126(2):112-120, 1999; Marchand M. *et al.*, Tumor regressions were observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide derived from the MAGE-3 gene and presented by HLA-A1, *Int. J. Cancer*, 80(2):219-230, 18 de enero, 1999). De forma similar, se detectó la pérdida de microglobulina beta-2 en 5/13 líneas establecidas a partir de pacientes con melanoma después de recibir inmunoterapia en the National Cancer Institute (Restifo N.P. *et al.*, Loss of functional Beta2 - microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 88 (2), 100-108, enero de 1996). Desde hace tiempo, se ha reconocido que el HLA de clase I con frecuencia está alterado en diversos tipos de tumores. Esta observación ha conducido a la hipótesis de que este fenómeno puede reflejar la presión inmunológica ejercida sobre el tumor por medio de CTL restringidos de clase I. El alcance y el grado de alteración en la expresión de HLA de clase I parece reflejar pasadas presiones inmunológicas, y también puede tener un valor de pronóstico (van Duinen S.G. *et al.*, Level of HLA antigens in locoregional metastases and clinical course of the disease in patients with melanoma, *Cancer Research*, 48, 1019-1025, febrero de 1988; Möller P. *et al.*, Influence of major histocompatibility complex class I and II antigens on survival in colorectal carcinoma, *Cancer Research*, 51, 729-736, enero de 1991). Tomadas conjuntamente, estas observaciones proporcionan un fundamento para la inmunoterapia del cáncer y enfermedades infecciosas, y sugieren estrategias eficaces que sean eficaces para contrarrestar la compleja serie de cambios patológicos asociados con la enfermedad.

La frecuencia de alteraciones en la expresión de clase I es el objeto de numerosos estudios (Algarra I. *et al.*, The HLA crossroad in tumor immunology, *Human Immunology*, 61, 65-73, 2000). Rees y Mian calculan que la pérdida alélica se produce, en conjunto, en 3-20% de los tumores, y la delección alélica aparece en 15-50% de los tumores. Debe advertirse que cada célula porta dos conjuntos separados de genes de clase I, portando cada gen un locus HLA-A y un locus HLA-B. Así, los individuos totalmente heterocigóticos portan dos moléculas de HLA-A diferentes y dos moléculas de HLA-B diferentes. Por consiguiente, la frecuencia real de las pérdidas para cada alelo específico puede ser tan pequeña como un cuarto de la frecuencia global. También advierten que, en general, existe un gradiente de expresión entre células normales, tumores primarios y tumores metastásicos. En un estudio de Natali *et al.* (Natali P.G. *et al.*, Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors, *PNAS USA*, 86:6719-6723, septiembre de 1989), se investigaron tumores sólidos para la expresión de HLA total, utilizando el anticuerpo W6/32, y para la expresión específica de alelo del antígeno A2, según se evalúa mediante el uso del anticuerpo BB7.2. Las muestras tumorales proceden de tumores primarios o metastásicos, de 13 tipos de tumores diferentes, y se puntúan como "negativo" si son menores que 20% "reducido" si están en el intervalo de 30-80%, y "normal" por encima del 80%. Todos los tumores, tanto primarios como metastásicos, fueron positivos a HLA con W6/32. En términos de la expresión de A2, se advirtió una reducción en 16,1% de los casos, y A2 puntuó como indelectable en 39,4% de los casos. Garrido *et al.* (Garrido F. *et al.*, Natural history of HLA expression during tumour development, *Immunol. Today*, 14(10):491-499, 1993) enfatizan que parecen producirse cambios en HLA en un estadio concreto en el avance desde benigno a lo más agresivo, Jimenez *et al.* (Jimenez P. *et al.*, Microsatellite instability analysis in tumors with different mechanisms for total loss of HLA expression, *Cancer Immunol. Immunother.*, 48:684-90, 2000) han analizado 118 tumores diferentes (68 colorrectales, 34 laríngeos y 16 melanomas). Las frecuencias indicadas para la pérdida total de la expresión de HLA fueron 11% para el colon, 18% para el melanoma y 13% para la laringe. Así, la expresión de HLA de clase I aparece alterada en una gran proporción de los tipos de tumores, quizás como un reflejo de la presión inmunológica, o simplemente un reflejo de la acumulación de cambios patológicos y alteraciones en las células enfermas.

Una mayoría de tumores expresan HLA de clase I, con una tendencia general para las alteraciones más graves en el estadio tardío y los tumores menos diferenciados. Este patrón es alentador en el contexto de la inmunoterapia, en especial considerando que: 1) la sensibilidad relativamente baja de las técnicas inmunohistoquímicas puede subestimar la expresión de HLA en tumores; 2) la expresión de clase I puede ser inducida en células tumorales

como resultado de la inflamación local y la liberación de linfoquinas; y 3) las células negativas a clase I son sensibles a la lisis por células NK.

5 El documento WO 01/41741 describe péptidos de antígenos asociados a tumores de HLA de clase I A2 derivados de CEA, HER2/new, MAGE2, MAGE 32 o p53, estando entre ellos los presentes péptidos de SEQ ID NO:2-7, y el péptido PADRE™. También describe los péptidos de tipo salvaje que se corresponden con los presentes péptidos heteroclíticos de SEQ ID NO:8-10. En el ejemplo 18 y 19 se describen vacunas que comprenden varios de dichos péptidos.

10 En la actualidad existe una serie de necesidades no cubiertas en el área del tratamiento del cáncer. Esto se manifiesta por los efectos secundarios asociados con las terapias existentes empleadas para el tratamiento del cáncer y por el hecho de que menos del 50% de los pacientes se curan con las terapias actuales. Por tanto, existe una oportunidad para un producto con la capacidad para aumentar las velocidades de respuesta, la duración de la respuesta, la supervivencia global, la supervivencia sin enfermedad y/o la calidad de vida.

Sumario de la invención

15 El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones, y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solo como información.

En una realización, la invención se dirige a una composición que comprende nueve epitopos de péptidos y/o análogos. Los péptidos y/o análogos en esta realización pueden comprender también restos aminoácidos adicionales que incluyen, pero no se limitan a otros epitopos de CTL, epitopos de HTL, epitopos de HTL universales, conectores, espaciadores, vehículos, etc.

20 En otras realizaciones, la invención se dirige a una composición que comprende los anteriores péptidos y uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales incluyen diluyentes, excipientes, epitopos de CTL, epitopos de HTL, vehículos, liposomas, cadenas pesadas de HLA, β 2-microglobulina, estreptavidina, células presentadoras de antígenos, adyuvantes, etc. En otras realizaciones, la descripción se dirige a métodos profilácticos, terapéuticos, de diagnóstico y de pronóstico que emplean los péptidos y las composiciones de la invención.

25 Breve descripción de los dibujos/figuras

La figura 1 demuestra que DC esplénicas procedentes de ratones tratados con ProGP inducen respuestas de CTL *in vivo*. En la figura 1, DC esplénicas procedentes de ratones transgénicos HLA-A2.2 tratados con ProGP (33 μ g/ratón, QD, SC durante 7 días) fueron pulsadas *in vitro* con el péptido Pol 455 de HBV (10^6 células por ml de péptido a 10 μ g/ml) en medio Opti-MEM 1 (Gibco Life Sciences) que contiene β 2-microglobulina 3 μ g/ml (Scripps Laboratories). Después del pulsado con el péptido durante 3 hr a temperatura ambiente, las DC se lavaron dos veces y se inyectaron 10^6 células IV a grupos de tres ratones transgénicos. También se ensayaron DC expandidas con GM-CSF/IL-4 pulsadas con epitopos y DC derivadas con ProGP con "pulsado simulado" para su comparación. Siete días después de recibir la inmunización primaria con DC, los animales recibieron un refuerzo con las mismas poblaciones de DC. Catorce días después de la inmunización primaria, se reestimularon células esplénicas de los animales inmunizados dos veces *in vitro* en presencia del péptido Pol 455. Se mide la actividad CTL después de las reestimulaciones utilizando un ensayo de liberación de ^{51}Cr convencional en el que se mide la lisis de células diana Jurkat transfectadas con HLA-A2.1 marcadas con ^{51}Cr en presencia (círculos) o en ausencia de péptido (cuadrados). Los puntos de los datos que aparecen en los paneles A-C representan una combinación de actividad lítica de un conjunto de cultivos por triplicado. Panel A, DC esplénicas de animales tratados con ProGP (SD-9427) pulsadas con el péptido Pol 455 de HBV. Panel B, DC expandidas con GM-CSF/IL-4 pulsadas con el péptido Pol 455 de HBV. Panel C, DC con pulsado simulado procedentes de animales tratados con ProGP. Los estudios se realizaron en Epimmune Inc., San Diego, CA.

La figura 2 presenta un esquema de un procedimiento de pulsado y ensayo de células dendríticas.

La figura 3A muestra un diagrama de flujo de la preparación del producto de fármaco.

45 La figura 3B muestra la inducción de CTL de múltiples epitopos en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b inmunizados con la vacuna EP-2101. Los ratones se inmunizaron con 50 μ g de EP-2101 (dosis de emulsión de 10 mg/ml) o se coinmunizaron con 50 μ g de cada epitopo de CTL de modo individual con una dosis igual del epitopo PADRE® en adyuvante Montanide® ISA 51 (estas últimas respuestas se denominan "individuales"). De 11 a 14 días después, los esplenocitos de los animales cebados se estimularon con cada péptido de CTL *in vitro*, y seis días después se midió la actividad CTL de cultivos por triplicado con un ELISA de IFN- γ *in situ*. Como control, esplenocitos de ratones no expuestos o de ratones inyectados con una emulsión de Montanide® ISA 51 preparada sin péptido también se estimularon con el péptido *in vitro* y se midió la actividad CTL bajo condiciones idénticas (las respuestas se denominan "control no expuesto"). Los datos mostrados para cada epitopo son la media geométrica de la respuesta de CTL de 6-10 experimentos independientes. Las respuestas de CTL se expresan en unidades secretoras (SU), definiéndose 1 SU como la liberación de 100 pg/pocillo de IFN- γ por 10^6 células efectoras.

Descripción detallada de la invención

Esta descripción proporciona péptidos que pueden utilizarse para controlar una respuesta inmunológica a un antígeno asociado a un tumor o para crear una vacuna del cáncer que estimule el brazo celular del sistema inmunológico, en especial cuando se combinan uno o más péptidos. En realizaciones concretas, las composiciones median en las respuestas inmunológicas contra tumores en individuos que portan al menos un alelo de HLA-A2 y/o supertipo HLA-A2. Estas composiciones se denominan en general composiciones de A2 (o sus combinaciones).

Una composición de A2, por ejemplo, puede actuar como una vacuna para estimular al sistema inmunológico para que reconozca y mate a las células tumorales, conduciendo a una mayor calidad de vida y/o unas tasas sin enfermedad o de supervivencia global para pacientes tratados de cáncer. En una realización preferida, una composición de la invención, tal como una vacuna, se administrará a individuos positivos al HLA-A2 o al supertipo HLA-A2 que tienen un cáncer que expresa al menos uno de los TAA a partir de los cuales se seleccionan los epitopos o análogos (por ejemplo, CEA, p53, HER2/neu, MAGE2/3), siendo ejemplos de dichos cánceres el cáncer de mama, de colon, de pulmón, ovárico y gástrico, y para MAGE2/3, algunos melanomas. Por tanto, una composición de A2, por ejemplo, una vacuna, mejora el nivel de cuidados para pacientes que se están tratando por un cáncer de mama, de colon, de pulmón, ovárico o gástrico, o de un melanoma.

Las composiciones de A2, por ejemplo, vacunas, de la descripción comprenden péptidos que portan motivos A2 o supermotivos A2 (epitopos A2 y/o análogos A2), según se describe en la presente. Estas composiciones también pueden comprender un epitopo PADRE®.

Los péptidos y las composiciones de la presente invención son útiles para estimular una respuesta inmunológica contra TAA estimulando la producción de CTL y, opcionalmente, respuestas de HTL, por ejemplo, profilaxis terapéutica, y también son útiles para controlar una respuesta inmunológica, por ejemplo, diagnóstico y pronóstico. Los péptidos, que contienen epitopos A2 derivados directa o indirectamente (por ejemplo, mediante analogía) de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de TAA nativas, son capaces de unirse a moléculas de HLA y estimular una respuesta inmunológica contra TAA. La secuencia completa de las proteínas de TAA analizadas descritas como SEQ ID NO:11-15 en la presente pueden obtenerse en GenBank. Véase la tabla 11.

Los epitopos de la descripción se han identificado mediante una serie de formas, tal como se analizará a continuación. También se analiza con más detalle un aspecto de la descripción en el que se han obtenido análogos en los que la actividad de unión a moléculas de HLA o moléculas de receptor de células T se ha modulado mediante la modificación de restos aminoácidos específicos para crear análogos que muestran una inmunogenicidad alterada (por ejemplo, mejorada).

Definiciones

La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a las siguientes definiciones.

A lo largo de esta descripción, los resultados de los "datos de unión" a menudo se expresan en términos de "CI₅₀". La CI₅₀ es la concentración de péptido en un ensayo de unión en la que se observa 50% de inhibición de la unión de un péptido de referencia. Dadas las condiciones en que se realizan los ensayos (es decir, concentraciones de péptido marcado y proteínas de HLA limitantes), estos valores se aproximan a los valores de K_D. Los ensayos para determinar la unión se describen en detalle, por ejemplo, en las publicaciones PCT WO 94/20127 y WO 94/03205, y en otras publicaciones, tales como Sidney, *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 18.3.1 (1998); Sidney, *et al.*, *J. Immunol.*, 154:247 (1995); y Sette, *et al.*, *Mol. Immunol.*, 31:813 (1994). Debe advertirse que los valores de CI₅₀ pueden cambiar, a menudo drásticamente, si se varían las condiciones del ensayo, y dependen de los reactivos concretos que se utilicen (por ejemplo, preparación de HLA, etc.). Por ejemplo, unas concentraciones excesivas de moléculas de HLA aumentarán la CI₅₀ medida aparente de un ligando concreto.

Como alternativa, la unión se expresa con relación a un péptido de referencia. Aunque a medida que un ensayo concreto se hace más o menos sensible, las CI₅ de los péptidos ensayados pueden cambiar algo, la unión con relación al péptido de referencia no cambiará significativamente. Por ejemplo, en un ensayo realizado bajo condiciones en las que la CI₅₀ del péptido de referencia aumenta en 10 veces, los valores de CI₅ de los péptidos de ensayo también se desplazarán aproximadamente en 10 veces. Por tanto, para evitar ambigüedades, la evaluación de que un péptido sea un ligante bueno (es decir, alto), intermedio, débil o negativo se basa, en general, en su CI₅₀, con relación a la CI₅₀ de un péptido patrón. Las tablas incluidas en esta solicitud presentan datos de unión en una forma biológicamente pertinente preferida de CI₅₀ nM.

La unión también puede determinarse utilizando otros sistemas de ensayo, que incluyen los que utilizan: células vivas (por ejemplo, Ceppellini *et al.*, *Nature*, 339:392 (1989); Christnick *et al.*, *Nature*, 352:67 (1991); Busch *et al.*, *Int. Immunol.*, 2:443 (1990); Hill *et al.*, *J. Immunol.*, 147:189 (1991); del Guercio *et al.*, *J. Immunol.*, 154:685 (1995)), sistemas sin células que emplean lisados de detergentes (por ejemplo, Cerundolo *et al.*, *J. Immunol.*, 21:2069 (1991)), MHC purificado inmovilizado (por ejemplo, Hill *et al.*, *J. Immunol.*, 152, 2890 (1994); Marshall *et al.*, *J. Immunol.*, 152:4946 (1994)), sistemas ELISA (por ejemplo, Reay *et al.*, *EMBO J.*, 11:2829 (1992)), resonancia de plasmón de superficie (por ejemplo, Khilko *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:15425 (1993)), ensayos de fase soluble de alto flujo (Hammer *et al.*, *J. Exp. Med.*, 180:2353 (1994)), y la medición del ensamblaje o la estabilización de MHC de

clase I (por ejemplo, Ljunggren *et al.*, *Nature*, 346:476 (1990); Schumacher *et al.*, *Cell*, 62:563 (1990); Townsend *et al.*, *Cell*, 62:285 (1990); Parker *et al.*, *J. Immunol.*, 149:1896 (1992)).

Tal como se emplea en la presente, una "alta afinidad" con respecto a las moléculas de HLA de clase I se define como la unión con un valor de CI_{50} o K_D de 50 nM o menor, una "afinidad intermedia" es la unión con un valor de CI_{50} o K_D de entre 50 y aproximadamente 500 nM, y una "afinidad débil" es la unión con un valor de CI_{50} o K_D de entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5000 nM. Una "alta afinidad" con respecto a la unión a las moléculas de HLA de clase II se define como la unión con un valor de CI_{50} o K_D de 100 nM o menor; una "afinidad intermedia" es la unión con un valor de CI_{50} o K_D de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 nM.

Una "unión de reactividad cruzada" indica que un péptido es unido por más de una molécula de HLA; un sinónimo es la unión degenerada.

El término "derivado", cuando se emplea para analizar un epitopo, es un sinónimo de "preparado". Un epitopo derivado puede aislarse a partir de una fuente natural, o puede ser sintetizado según protocolos convencionales de la técnica. Los epitopos sintéticos pueden comprender restos aminoácidos artificiales, "miméticos de aminoácidos", tales como los D-isómeros de los restos L-aminoácidos naturales o restos aminoácidos no naturales, tales como ciclohexilalanina. Un epitopo derivado o preparado puede ser un análogo de un epitopo nativo. Un "diluyente" incluye líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un diluyente preferido para las composiciones farmacéuticas. También pueden emplearse disoluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como diluyentes, en particular para disoluciones inyectables.

Un "epitopo dominante" es un epitopo que induce una respuesta inmunológica tras la inmunización con un antígeno nativo completo (véase, por ejemplo, Sercarz, *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 11:729-766, 1993). Esta respuesta presenta reacción cruzada *in vitro* con un epitopo de péptido aislado.

Un "epitopo" consiste en las características colectivas de una molécula, tales como la estructura peptídica primaria, secundaria y terciaria, y la carga, que juntas forman un sitio reconocido por una inmunoglobulina, un receptor de células T o una molécula de HLA. Como alternativa, un epitopo puede definirse como un conjunto de restos aminoácidos que están implicados en el reconocimiento por una inmunoglobulina concreta, o en el contexto de las células T, los restos necesarios para el reconocimiento por proteínas del receptor de células T y/o receptores del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Los epitopos están presentes en la naturaleza y pueden aislarse, purificarse o ser preparados o derivados de otro modo por seres humanos. Por ejemplo, los epitopos pueden prepararse mediante aislamiento a partir de una fuente natural, o pueden ser sintetizados según protocolos convencionales de la técnica. Los epitopos sintéticos pueden comprender restos aminoácidos artificiales, "miméticos de aminoácidos", tales como los D-isómeros de los restos L-aminoácidos naturales o restos aminoácidos no naturales, tales como ciclohexilalanina. A lo largo de esta descripción, los epitopos pueden denominarse en algunos casos péptidos o epitopos de péptidos. Los epitopos y análogos de la invención se indican en la tabla 1.

En ciertos aspectos, el péptido comprende un fragmento de un antígeno. Un "fragmento de un antígeno" o "fragmento antigénico" o simplemente "fragmento" es una porción de un antígeno que tienen 100% de identidad con un antígeno de tipo salvaje o uno de sus variantes naturales. En aspectos preferidos, un péptido tiene una longitud de 9, 10 u 11 aminoácidos.

El "antígeno de leucocitos humano" o "HLA" es una proteína del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I o clase II humana (véase, por ejemplo, Stites, *et al.*, *IMMUNOLOGY*, 8ª ed., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994).

Un "supertipo de HLA o familia de HLA", tal como se emplea en la presente, describe conjuntos de moléculas de HLA agrupadas sobre la base de especificidades de unión a péptidos compartidas. Las moléculas de HLA de clase I que comparten una afinidad de unión similar por péptidos que portan ciertos motivos de aminoácidos se agrupan en dichos supertipos de HLA. Las expresiones superfamilia de HLA, familia de supertipos de HLA, familia de HLA, y moléculas similares a HLA xx (en donde "xx" indica un tipo de HLA concreto) son sinónimos. Véase, por ejemplo, el motivo y supermotivo HLA-A2 que se indican en las tablas 4A, 4B, 4C y 4D.

Tal como se emplea en la presente, una "alta afinidad" con respecto a las moléculas de HLA de clase I se define como la unión con un valor de CI_{50} o K_D de 50 nM o menor; una "afinidad intermedia" es la unión con un valor de CI_{50} o K_D de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 500 nM; y una "afinidad débil" es la unión con un valor de CI_{50} o K_D de entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5000 nM. Una "alta afinidad" con respecto a la unión a las moléculas de HLA de clase II se define como la unión con un valor de CI_{50} o K_D de 100 nM o menor; una "afinidad intermedia" es la unión con un valor de CI_{50} o K_D de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 nM. Véase "Datos de unión".

Una " CI_{50} " es la concentración de péptido en un ensayo de unión en la que se observa 50% de inhibición de la unión de un péptido de referencia. Dadas las condiciones en que se realizan los ensayos (es decir, concentraciones de péptido marcado y proteínas de HLA limitantes), estos valores se aproximan a los valores de K_D . Véase "Datos de unión".

- 5 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias peptídicas o fragmentos de antígenos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia a través de una ventana de comparación, según se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual.
- 10 Un péptido "inmunogénico" o un epitopo "inmunogénico" o un "epitopo de péptido" es un péptido que comprende un motivo o supermotivo específico de alelo, de modo que el péptido se unirá a una molécula de HLA e inducirá una respuesta de CTL y/o HTL. Así, los péptidos inmunogénicos de la invención son capaces de unirse a una molécula de HLA apropiada y después inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL), o una respuesta de linfocitos T auxiliares (HTL), contra el péptido.
- 15 El término "aislado" o la expresión "biológicamente puro" se refieren al material que esta sustancial o fundamentalmente exento de componentes que normalmente acompañan al material tal como se encuentra en su estado nativo. Así, los péptidos aislados según la descripción preferiblemente no contienen materiales normalmente asociados con los péptidos en su entorno *in situ*. Un epitopo "aislado" se refiere a un epitopo que no incluye la secuencia completa del antígeno a partir del cual se ha derivado el epitopo. Generalmente, el epitopo "aislado" no tiene unidos restos aminoácidos adicionales que produzcan una secuencia que tenga 100% de identidad a lo largo de la longitud completa de la secuencia nativa. La secuencia nativa puede ser una secuencia, tal como un antígeno asociado a un tumor, a partir de la cual se deriva el epitopo. Así, el término "aislado" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si aparece en la naturaleza). Por ejemplo, un péptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo péptido, separado de todos o algunos de los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado.
- 20 El "complejo de histocompatibilidad mayor" o "MHC" es un agrupamiento de genes que desempeña un papel en el control de las interacciones celulares responsables de las respuestas inmunológicas fisiológicas. En seres humanos, el complejo de MHC también se denomina complejo del antígeno de leucocitos humano (HLA). Para una descripción detallada de los complejos de MHC y HLA, véase Paul, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3ª ed., Raven Press, Nueva York (1993).
- 25 Una secuencia "nativa" o "de tipo salvaje" se refiere a una secuencia que se encuentra en la naturaleza. Esta secuencia puede comprender una secuencia más larga en la naturaleza.
- 30 Un "resto de unión negativa" o "resto perjudicial" es un resto aminoácido que, si está presente en ciertas posiciones (generalmente no son posiciones de anclaje primario) en un epitopo de péptido, produce una disminución en la afinidad de unión del péptido por su correspondiente molécula de HLA.
- 35 El término "péptido" y la expresión "epitopo de péptido" se utilizan de modo intercambiable con "oligopéptido" en la presente descripción para denominar una serie de restos, generalmente restos L-aminoácidos, conectados entre sí, generalmente mediante enlaces peptídicos entre los grupos α -amino y carboxilo de restos aminoácidos adyacentes.
- 40 Un "péptido sintético" se refiere a un péptido que se obtiene a partir de una fuente no natural, por ejemplo, está fabricado por el ser humano. Estos péptidos pueden ser producidos utilizando métodos tales como la síntesis química o la tecnología del ADN recombinante. Los "péptidos sintéticos" incluyen las "proteínas de fusión".
- 45 Un "péptido de unión a PanDR", un "epitopo de unión a PanDR", o un péptido "PADRE®" (Epimmune, San Diego, CA) es un miembro de una familia de moléculas que se unen a más de una molécula DR de HLA de clase II. El patrón que define la familia de moléculas PADRE® pueden denominarse supermotivo de HLA de clase II. Una molécula PADRE® se une a moléculas de HLA-DR y estimula respuestas de linfocitos T auxiliares humanos *in vitro* e *in vivo*. Para una mayor definición de la familia PADRE®, veáanse las solicitudes de patente de EEUU en tramitación junto con la presente n.º 09/709.774, presentada el 11 de noviembre, 2000; y 09/707.738, presentada el 6 de noviembre, 2000; las publicaciones PCT n.ºs WO 95/07707, y WO 97/26784; las patentes de EEUU n.ºs 5.736.142, expedida el 7 de abril, 1998; 5.679.640, expedida el 21 de octubre, 1997; y 6.413.935, expedida el 2 de julio, 2002.
- "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición o un componente de una composición en general no tóxico, inerte y/o fisiológicamente compatible.
- 50 Un "excipiente farmacéutico" o "excipiente" comprende un material, tal como un adyuvante, un vehículo, agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares. Un "excipiente farmacéutico" es un excipiente que es farmacéuticamente aceptable.
- 55 El término "motivo" se refiere a un patrón de restos en una secuencia de aminoácidos de una longitud definida, preferiblemente un péptido con una longitud de menos de aproximadamente 15 aminoácidos, o con una longitud de menos de aproximadamente 13 aminoácidos, normalmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 13 restos aminoácidos (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12 o 13) para un motivo de HLA de clase I, y de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 restos aminoácidos (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25) para un motivo de HLA de clase II, que es reconocido por una molécula de HLA concreta. Los motivos

son generalmente diferentes para cada proteína de HLA codificada por un alelo de HLA humano concreto. Estos motivos a menudo difieren en su patrón de restos de anclaje primario y secundario. En aspectos preferidos, un motivo de MHC de clase I identifica un péptido con una longitud de 9, 10 u 11 aminoácidos.

5 Un "supermotivo" es una especificidad de unión a péptido compartida por moléculas de HLA codificadas por dos o más alelos de HLA. Preferiblemente, un péptido que porta un supermotivo es reconocido con afinidad alta o intermedia (según se define en la presente) por dos o más antígenos de HLA.

10 Un "resto de anclaje primario" es un aminoácido en una posición específica a lo largo de la secuencia de un péptido que se entiende que proporciona un punto de contacto primario entre el péptido inmunogénico y la molécula de HLA. Uno, dos o tres restos de anclaje primario dentro de un péptido de una longitud definida define mínimamente un "motivo" para un péptido inmunogénico. Se entiende que estos restos se ajustan, en un contacto estrecho, con los surcos de unión a péptidos de una molécula de HLA, con sus cadenas laterales enterradas en bolsillos específicos de los propios surcos de unión. En un aspecto de un motivo de HLA de clase I, los restos de anclaje primario están localizados en la posición 2 (desde la posición del amino-terminal) y en la posición del carboxilo-terminal de un epitopo de péptido según la descripción. Las posiciones de anclaje primario para el motivo y supermotivo A2 de HLA de clase I se indican en las tablas 4A, 4B, 4C y 4D. Por ejemplo, pueden crearse péptidos análogos alterando la presencia o la ausencia de restos concretos en estas posiciones de anclaje. Estos análogos pueden utilizarse para modular la afinidad de unión de un epitopo que comprende un motivo o supermotivo concreto.

20 Un "resto de anclaje secundario" es un aminoácido en una posición distinta de la posición de anclaje primario en un péptido que puede influir en la unión del péptido. Un resto de anclaje secundario aparece con una frecuencia significativamente mayor entre los péptidos unidos a HLA que lo que se esperaría por la distribución aleatoria de restos aminoácidos en una posición concreta. Un resto de anclaje secundario puede identificarse como un resto que está presente con mayor frecuencia entre péptidos de unión de afinidad alta o intermedia, o un resto que esté asociado de otra forma con una unión de afinidad alta o intermedia. Se dice que los restos de anclaje secundario aparecen en "posiciones de anclaje secundario". Por ejemplo, pueden crearse péptidos análogos alterando la presencia o la ausencia de restos concretos en estas posiciones de anclaje secundario. Estos análogos pueden utilizarse para modular con precisión la afinidad de unión de un epitopo que comprende un motivo o supermotivo concreto. La expresión "péptido fijado" se emplea en general para indicar un péptido análogo que presenta cambios en la posición de anclaje primario, no secundario. Un "epitopo críptico" induce una respuesta mediante la inmunización con un péptido aislado, pero la respuesta no presenta reactividad cruzada *in vitro* cuando se emplea la proteína completa intacta, que comprende el epitopo, como antígeno.

El "reconocimiento promiscuo" por un TCR se produce cuando un péptido diferenciado es reconocido por diversos clones de células T en el contexto de diversas moléculas de HLA. La unión promiscua por una molécula de HLA es sinónimo de unión de reactividad cruzada.

35 Una "respuesta inmunológica protectora" o "respuesta inmunológica terapéutica" se refiere a una respuesta de CTL y/o HTL contra un antígeno derivado de un antígeno patogénico (por ejemplo, un antígeno procedente de un agente infeccioso o un antígeno tumoral), que de alguna forma previene o detiene al menos parcialmente los síntomas, los efectos secundarios o el avance de la enfermedad. La respuesta inmunológica también puede incluir una respuesta de anticuerpos que ha sido facilitada por la estimulación de células T auxiliares.

40 El término "resto" se refiere a un resto aminoácido o un resto aminoácido mimético incorporado en un péptido o una proteína mediante un enlace amida o un mimético de enlace amida.

45 Un "epitopo subdominante" es un epitopo que evoca poca o ninguna respuesta tras la inmunización con un antígeno completo o un fragmento del antígeno completo que comprende un epitopo subdominante y un epitopo dominante, que comprende el epitopo, pero para el cual puede obtenerse una respuesta mediante la inmunización con un péptido aislado, y esta respuesta (a diferencia del caso de los epitopos crípticos) es detectada cuando se emplea el antígeno completo o un fragmento del antígeno que comprende un epitopo subdominante y un epitopo dominante, para convocar la respuesta *in vitro* o *in vivo*.

50 Tal como se emplea en la presente, una "vacuna" es una composición utilizada para la vacunación, por ejemplo, para la profilaxis o la terapia, que comprende uno o más péptidos de la descripción. Existen numerosos aspectos de las vacunas según la descripción, tales como un cóctel de uno o más péptidos, uno o más péptidos de la descripción formados por un péptido poliepitópico. Dichos "uno o más péptidos" pueden incluir cualquier unidad de un número entero de 1-150, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 o más péptidos de la descripción. Los péptidos o polipéptidos pueden estar opcionalmente modificados, tal como mediante lipídación, adición de secuencias diana u otras secuencias. Los péptidos de unión a HLA de clase I de la descripción pueden estar unidos o combinados de otra forma con péptidos de unión a HLA de clase II, por ejemplo, el péptido de unión a HTL universal PADRE®, para facilitar la activación de los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T auxiliares. Las vacunas pueden comprender células presentadoras de antígenos pulsadas con péptidos, por ejemplo, células dendríticas.

- La nomenclatura utilizada para describir péptidos o proteínas sigue la práctica convencional en la que el grupo amino se presenta a la izquierda (el amino- o N-terminal) y el grupo carboxilo a la derecha (el carboxi- o C-terminal) de cada resto aminoácido. Cuando se indican las posiciones de restos aminoácidos en un epitopo de péptido, se numeran en la dirección amino a carboxilo, siendo la posición uno el resto localizado en el extremo amino terminal del epitopo, o el péptido o la proteína del que puede formar parte.
- En las fórmulas que representan aspectos específicos seleccionados de la presente descripción, los grupos amino- y carboxilo-terminales, aunque no se muestran específicamente, están en la forma que asumirían a valores de pH fisiológico, a menos que se indique lo contrario. En las fórmulas de estructuras de aminoácidos, cada resto se representa en general mediante las denominaciones convencionales de tres letras o de una letra. La forma L de un resto aminoácido se representa con una única letra mayúscula o con la primera letra mayúscula de un símbolo de tres letras, y la forma D para los restos aminoácidos que tienen formas D se representa mediante una única letra minúscula o un símbolo de tres letras en minúscula. Sin embargo, cuando se emplean símbolos de tres letras o nombres completos sin mayúsculas, estos pueden indicar restos L-aminoácidos. La glicina no tiene átomos de carbono asimétricos y se denomina simplemente "Gly" o "G". Las secuencias de aminoácidos de los péptidos indicados en la presente generalmente se denominan utilizando el símbolo de una sola letra convencional (A, Alanina; C, Cisteína; D, Ácido aspártico; E, Ácido glutámico; F, Fenilalanina; G, Glicina; H, Histidina; I, Isoleucina; K, Lisina; L, Leucina; M, Metionina; N, Asparagina; P, Prolina; Q, Glutamina; R, Arginina; S, Serina; T, Treonina; V, Valina; W, Triptófano; e Y, Tirosina). Además de estos símbolos, "B" en las abreviaturas de una sola letra utilizadas en la presente indica ácido α -aminobutírico. En algunos aspectos, el ácido α -aminobutírico puede intercambiarse por cisteína.
- En la presente se emplean los siguientes acrónimos:
- APC: célula presentadora de antígenos
- CD3: marcador de células pan-T
- CD4: marcador de linfocitos T auxiliares
- CD8: marcador de linfocitos T citotóxicos
- CEA: antígeno carcinoembrionario (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:363)
- CTL: linfocitos T citotóxicos
- DC: células dendríticas. Las DC actúan como células presentadoras de antígenos potentes mediante la estimulación de la liberación de citoquinas desde líneas de CTL que son específicas para un péptido modelo derivado del virus de la hepatitis B. Los experimentos *in vivo* que emplean DC pulsadas *ex vivo* con un epitopo de un péptido de HBV han estimulado respuestas inmunológicas de CTL *in vivo* después de la administración a ratones no expuestos
- DLT: toxicidad limitante de la dosis, un acontecimiento adverso relacionado con la terapia
- DMSO: dimetilsulfóxido
- ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
- E:T: proporción de efector:diana
- G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos
- GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (monocitos)
- HBV: virus de la hepatitis B
- HER2/neu: un antígeno asociado a un tumor; un sinónimo es c-erbB-2 (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:364)
- HLA: antígeno de leucocitos humano
- HLA-DR: antígeno de leucocitos humano de clase II
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- HTC: células T auxiliares
- HTL: linfocitos T auxiliares, un sinónimo de HTC
- ID: identidad
- IFN γ : gamma-interferón

IL-4: interleuquina-4

IV: intravenoso

LU_{30%}: actividad citotóxica para 10⁶ células efectoras necesaria para lograr 30% de lisis de una población de células diana, a una proporción 100:1 (E:T)

5 MAb: anticuerpo monoclonal

MAGE: antígeno de melanoma (véase, por ejemplo, SEQ ID NO:365 y 366 para MAGE2 y MAGE3, respectivamente)

MLR: reacción de linfocitos mixtos

MNC: células mononucleares

10 PB: sangre periférica

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

ProGP™: producto Progenipoietin™ (Searle, St. Louis, MO), un agonista del receptor fti3/G-CSF quimérico

SC: subcutáneo

S.E.M.: error estándar de la media

15 QD: dosificación una vez diaria

TAA: antígeno asociado a un tumor

TNF: factor de necrosis tumoral

WBC: leucocitos ("white blood cells")

20 A continuación se describen los péptidos, las correspondientes moléculas de ácidos nucleicos, las composiciones y los métodos de la descripción con más detalle.

Péptidos A2 y polinucleótidos de antígenos asociados a tumores

Epitopos A2 y análogos

25 Los epitopos aislados y análogos de la descripción son todos péptidos de unión a clase I, es decir, péptido de CTL. En particular, los epitopos y análogos de la descripción comprenden un motivo o supermotivo A2. Los epitopos y análogos de la invención son los indicados en la tabla 1 (SEQ ID NO:1-10). Los epitopos A2 y análogos de la invención pueden denominarse en la presente "epitopos" y "análogos" o se denominan según la tabla o se denominan según la SEQ ID NO:. Otros epitopos y análogos se denominan en la presente epitopos de CTL o péptidos de CTL y epitopos de HTL o péptidos de HTL.

Péptidos

30 En algunos aspectos, la descripción describe un péptido aislado que comprende o consiste en un epitopo y/o análogo, en el que el epitopo o análogo consiste en una secuencia seleccionada de las que aparecen en la tabla 1 (SEQ ID NO:1-10). Preferiblemente, el péptido comprende o consiste en un epitopo o análogo que consiste en una secuencia de la tabla 1.

35 Los péptidos de la descripción pueden ser proteínas de fusión de un epitopo o epitopos y/o análogo o análogos con un epitopo o epitopos de CTL y/o un epitopo o epitopos de HTL y/o un conector o conectores y/o un espaciador o espaciadores y/o un vehículo o vehículos y/o un resto o más restos aminoácidos adicionales y/o pueden comprender o consistir en homopolímeros de un epitopo o análogo o heteropolímeros de epitopos y/o análogos, según se describe en detalle a continuación.

40 Los péptidos que comprenden un epitopo y/o un análogo de la descripción pueden comprender o consistir en un fragmento de un antígeno ("fragmento" o "fragmento antigénico"), en el que el fragmento comprende un epitopo y/o análogo. El fragmento puede ser una porción de CEA, HER2/neu, MAGE2, MAGE3 y/o p53 (SEQ ID NO:11, 12, 13, 14 y 15, respectivamente).

45 El fragmento puede comprender o consistir en una región de un antígeno nativo que contiene una alta concentración de epitopos de clase I y/o clase II, y preferiblemente contiene el mayor número de epitopos por longitud de aminoácido. Estos epitopos pueden estar presentes de una manera de marco desplazado, por ejemplo, un péptido con una longitud de 10 aminoácidos puede contener dos epitopos con una longitud de 9 restos aminoácidos y un

epitopo con una longitud de 10 restos aminoácidos.

En aspectos preferidos, los fragmentos tienen una longitud de 9, 10 u 11 aminoácidos.

5 Los péptidos que comprenden un epitopo y/o análogo de la descripción pueden ser una proteína de fusión que comprende uno o más restos aminoácidos además del epitopo, análogo, o fragmento. Las proteínas de fusión incluyen homopolímeros y heteropolímeros, según se describe a continuación.

En algunos aspectos, el péptido comprende o consiste en múltiples epitopos y/o análogos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 epitopos y/o análogos de la descripción. En algunos aspectos, el péptido comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 epitopos y/o análogos de la descripción.

10 El péptido también puede ser un homopolímero de un epitopo o análogo, o el péptido puede ser un heteropolímero que contiene al menos dos epitopos y/o análogos diferentes. Los polímeros tienen la ventaja de una mayor probabilidad para una reacción inmunológica y, cuando se emplean diferentes epitopos y/o análogos para producir el polímero, de la capacidad para inducir anticuerpos y/o células T que reaccionan con diferentes determinantes antigénicos del antígeno o antígenos deseados para una respuesta inmunológica.

15 Un homopolímero puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 copias del mismo epitopo o análogo.

20 Un heteropolímero puede comprender una o más copias de un epitopo o análogo individual y una o más copias de uno o más epitopos y/o análogos diferentes de la descripción. Los epitopos y/o análogos que forman un heteropolímero pueden proceder todos del mismo antígeno, por ejemplo, pueden proceder de CEA, p53, MAGE2/3, HER2/neu u otros antígenos de la presente o conocidos en la técnica, o pueden proceder de antígenos diferentes, preferiblemente TAA. Las combinaciones de epitopos y/o análogos que pueden formar un heteropolímero incluyen las combinaciones descritas anteriormente. Los heteropolímeros pueden contener múltiples copias de uno o más epitopos y/o análogos.

25 Así, los péptidos de la descripción, tales como heteropolímeros, pueden comprender un primer epitopo y/o análogo y al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 epitopos y/o análogos distintos (diferentes).

Los péptidos de la invención también pueden comprender restos aminoácidos adicionales.

30 En algunos aspectos, los péptidos también pueden comprender una serie de epitopos de CTL y/o HTL, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 epitopos de CTL y/o HTL.

35 El epitopo de CTL y/o HTL y el epitopo/análogo de la descripción pueden proceder del mismo TAA o de diferentes TAA. Así, por ejemplo, si el epitopo y/o análogo procede de CEA, el péptido de CTL y/o el péptido de HTL peptide también puede proceder de CEA. Como alternativa, el péptido de CTL y/o el péptido de HTL puede proceder de otro antígeno, preferiblemente un antígeno TAA, tal como p53, MAGE2/3 o HER2/neu. Como otro ejemplo, si el epitopo y/o análogo procede de p53, el péptido de CTL y/o el péptido de HTL puede proceder de p53 o, como alternativa, puede proceder de MAGE2/3, HER2/neu, o CEA.

40 El péptido de CTL y/o el péptido de HTL puede proceder de antígenos asociados a tumores tales como, pero sin limitarse a los antígenos de melanoma MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-11, MAGE-A10, así como BAGE, GAGE, RAGE, MAGE-C1, LAGE-1, CAG-3, DAM, MUC1, MUC2, MUC18, NY-ESO-1, MUM-1, CDK4, BRCA2, NY-LU-1, NY-LU-7, NY-LU-12, CASP8, RAS, KIAA-2-5, SCCs, p53, p73, CEA, HER2/neu, Melan-A, gp4100, tirosinasa, TRP2, gp75/TRP1, calicreína, antígeno de membrana específico de próstata (PSM), ácido prostático fosfatasa (PAP), antígeno específico de próstata (PSA), PTI-1, β -catenina, PRAME, telomerasa, FAK, proteína ciclina D1, NOEY2, EGF-R, SART-1, CAPB, HPVE7, p15, receptor de folato CDC27, PAGE-1, y PAGE-4 (véase, por ejemplo, la tabla 16).

45 Los ejemplos no limitantes de péptidos CTL y péptidos HTL se describen en los documentos WO 01/42270, publicado el 14 de junio, 2001; WO 01/41788, publicado el 14 de junio, 2001; WO 01/42270, publicado el 14 de junio, 2001; WO 01/45728, publicado el 28 de junio, 2001; y WO 01/41787, publicado el 14 de junio, 2001.

50 El péptido HTL puede comprender un péptido sintético, tal como un epitopo de unión a Pan-DR (por ejemplo, un péptido PADRE®, Epimmune Inc., San Diego, CA, descrito, por ejemplo, en la patente de EEUU n.º 5.736.142), por ejemplo, que tenga la fórmula aKXVAAZTLKAAa, en la que "X" es ciclohexilalanina, fenilalanina, o tirosina; "Z" es triptófano, tirosina, histidina o asparagina; y "a" es D-alanina o L-alanina (SEQ ID NO:746). Ciertos epitopos de unión a pan-DR comprende solo restos "L" aminoácidos naturales; estas moléculas pueden proporcionarse como péptidos o en forma de los ácidos nucleicos que codifican el péptido. Véanse también las patentes de EEUU n.º 5.679.640 y 6.413.935.

55

- 5 El péptido puede comprender restos aminoácidos adicionales. Estos restos aminoácidos adicionales pueden ser Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gin, Gly, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Trp, Val, miméticos de aminoácidos y otros restos aminoácidos no naturales, tales como los descritos a continuación. Los restos aminoácidos adicionales pueden proporcionar una mayor facilidad para unir los péptidos entre sí, para unir epitopos y/o análogos entre sí, para unir epitopos y/o análogos a epitopos de CTL y/o HTL, para acoplarse a un soporte vehículo o un péptido mayor, para modificar las propiedades físicas o químicas del péptido u oligopéptido, o similares. Los restos aminoácidos, tales como Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gin, Gly, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Trp, o Val o similares, pueden introducirse en el C- y/o N-terminal del péptido y/o pueden introducirse internamente.
- 10 El péptido puede comprender un espaciador de aminoácidos, que puede estar unido a los epitopos, análogos, epitopos de CTL, epitopos de HTL, vehículos, etc. dentro de un péptido, o puede estar unido al péptido en el N- y/o C-terminal. Así, los espaciadores pueden estar en el N-terminal o el C-terminal del péptido, o pueden ser internos de modo que unan o junten epitopos, análogos, epitopos de CTL, epitopos de HTL, vehículos, restos aminoácidos adicionales y/o fragmentos antigénicos, entre sí.
- 15 El espaciador está formado generalmente por una o más moléculas neutras relativamente pequeñas, tales como restos aminoácidos o miméticos de aminoácidos, que no tienen sustancialmente carga bajo condiciones fisiológicas. Los espaciadores generalmente se seleccionan, por ejemplo, de Ala, Gly u otros espaciadores neutros de restos aminoácidos no polares o restos aminoácidos polares neutros. Se entenderá que el espaciador opcionalmente presente puede estar compuesto por restos iguales o puede estar compuesto por uno o más restos diferentes y así puede ser un homo- o hetero-oligómero de restos espaciadores. Así, el espaciador puede contener más de un resto Ala (polialanina) o más de un resto Gly (poliglicina), o puede contener restos Ala y Gly, por ejemplo, Gly-, Gly-Gly-, Ser-, Ser-Ser-, Gly-Ser-, Ser-Gly-, etc. Cuando está presente, el espaciador normalmente tendrá al menos uno o dos restos, más normalmente de tres a seis restos, y a veces 10 o más restos, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o incluso más restos (Livingston, B.D. *et al.*, *Vaccine*, 19:4652-4660 (2000)).
- 20 Los péptidos pueden comprender vehículos, tales como los que se conocen en la técnica, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas, tales como albúmina de suero humana, toxoide del tétanos, restos poliaminoácidos, tales como poli-L-lisina, poli-L-ácido glutámico, proteínas del virus de la gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, y similares.
- 25 Además, el péptido puede modificarse mediante una acilación NH₂-terminal, por ejemplo, mediante una acetilación de alcanolo (C₁-C₂₀) o tioglicolilo, una amidación carboxilo-terminal, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos casos, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para la unión a un soporte u otra molécula.
- 30 Los péptidos según la descripción pueden contener modificaciones tales como, pero sin limitarse a una glicosilación, oxidación de cadenas laterales, biotilación, fosforilación, adición de un material tensioactivo, por ejemplo, un lípido, o pueden estar químicamente modificados, por ejemplo, acetilación, etc. Además, los enlaces en el péptido pueden ser distintos de los enlaces peptídicos, por ejemplo, enlaces covalentes, enlaces éster o éter, enlaces disulfuro, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, etc.
- 35 Los péptidos de la presente descripción pueden contener sustituciones para modificar una propiedad física (por ejemplo, la estabilidad o la solubilidad) del péptido resultante. Por ejemplo, los péptidos pueden ser modificados mediante la sustitución de una cisteína (C) por un ácido α -aminobutírico ("B"). Debido a su naturaleza química, la cisteína tiene propensión a formar puentes disulfuro y alterar suficientemente el péptido desde el punto de vista estructural como para que se reduzca la capacidad de unión. La sustitución de C por el ácido α -aminobutírico no solo mitiga este problema, sino que realmente mejora la capacidad de unión y de unión cruzada en ciertos casos. La sustitución de una cisteína por ácido α -aminobutírico puede producirse en cualquier resto de un péptido, por ejemplo, en las posiciones de anclaje o de no anclaje de un epitopo o análogo dentro de un péptido, o en otras posiciones de un péptido.
- 40 Los péptidos pueden comprender miméticos de aminoácidos o restos aminoácidos no naturales, por ejemplo, D- o L-nafilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tienilalanina; D- o L-1-, 2-, 3-, o 4-pirenilalanina; D- o L-3-tienilalanina; D- o L-(2-piridinil)alanina; D- o L-(3-piridinil)alanina; D- o L-(2-pirazinil)alanina; D- o L-(4-isopropil)fenilglicina; D-(trifluorometil)fenilglicina; D-(trifluorometil)fenilalanina; D-p-fluorofenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; D- o L-p-metoxibifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquilo)alaninas; y D- o L-alquilalaninas, en las que el grupo alquilo puede un metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, isopentilo sustituidos o no sustituidos, o un resto aminoácido no ácido. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, benzimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo, y piridilo. Los péptidos modificados que tienen diversos miméticos de aminoácidos o restos aminoácidos no naturales son particularmente útiles, porque tienden a manifestar una mayor estabilidad *in vivo*. Estos péptidos también pueden poseer mayor caducidad o propiedades de fabricación.
- 45 La estabilidad del péptido puede ensayarse de una serie de formas. Por ejemplo, se han utilizado peptidasas y diversos medios biológicos, tales como suero y plasma humano, para ensayar la estabilidad. Véase, por ejemplo, Verhoef, *et al.*, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics*, 11:291 (1986). La semivida de los péptidos de la presente descripción se determina de modo conveniente utilizando un ensayo de suero humano al 25% (en v/v). El protocolo

5 generalmente es el siguiente: Suero humano reunido (tipo AB, no termoinactivado) se deslipida mediante centrifugación antes del uso. El suero después se diluye hasta 25% con RPMI-1640 u otro medio de cultivo de tejidos adecuado. A intervalos de tiempo predeterminados, se retira una pequeña cantidad de disolución de reacción y se añade a ácido tricloroacético acuoso (TCA) al 6% o etanol. La muestra de reacción turbia se enfría (4 °C) durante 15 minutos y después se centrifuga para sedimentar las proteínas del suero precipitadas. Entonces se determina la presencia de los péptidos mediante HPLC en fase inversa utilizando condiciones de cromatografía específicas de estabilidad.

10 Los péptidos según la descripción pueden tener diferentes longitudes, y estar en sus formas neutras (sin carga) o en formas que sean sales. Los péptidos según la descripción pueden contener modificaciones, tales como glicosilación, oxidación de las cadenas laterales, o fosforilación, en general sujetas a la condición de que estas modificaciones no destruyan la actividad biológica de los péptidos.

Los péptidos de la descripción pueden estar liofilizados o pueden estar en forma cristalina.

15 En general, se prefiere que el epitopo sea lo más pequeño posible pero siga manteniendo sustancialmente toda la actividad inmunológica de la proteína nativa. Cuando sea posible, puede resultar deseable optimizar los epitopos de unión a HLA de clase I de la descripción hasta una longitud de aproximadamente 8 a aproximadamente 13 restos aminoácidos, por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12 o 13, preferiblemente 9 o 10. Debe apreciarse que uno o más epitopos en este intervalo de tamaño pueden estar formados por un péptido más largo (véase la sección de definiciones para el término "epitopo" para un análisis más detallado de la longitud de los péptidos). Los epitopos que se unen a HLA de clase II preferiblemente se optimizan hasta una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 30 restos aminoácidos, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, preferiblemente entre aproximadamente 13 y aproximadamente 20 restos, por ejemplo, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. Preferiblemente, los epitopos tienen un tamaño en proporción con péptidos derivados de patógenos procesados de modo endógeno o péptidos de células tumorales que se unen a las moléculas de HLA pertinentes. La identificación y la preparación de péptidos de diversas longitudes puede realizarse utilizando las técnicas descritas en la presente.

20 Los péptidos según la descripción pueden prepararse de modo sintético, mediante la tecnología del ADN recombinante o mediante síntesis química, o pueden aislarse a partir de fuentes naturales, tales como tumores nativos u organismos patógenos. Los epitopos pueden sintetizarse de modo individual o unirse directa o indirectamente en un péptido. Aunque el péptido preferiblemente estará sustancialmente exento de otras proteínas de la célula hospedante naturales y sus fragmentos, en algunos aspectos, los péptidos pueden conjugarse de modo sintético para ser unidos a partículas o fragmentos nativos.

25 Los péptidos de la descripción pueden prepararse mediante una amplia gama de formas. Para los tamaños relativamente cortos, los péptidos pueden sintetizarse en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales. En el mercado están disponibles diversos sintetizadores automáticos y pueden utilizarse según protocolos conocidos (véase, por ejemplo, Stewart y Young, SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, 2ª ed., Pierce Chemical Co., 1984). Además, pueden unirse péptidos individuales utilizando un acoplamiento químico para producir péptidos más grandes que aún se encuentren dentro de los límites de la descripción.

30 Como alternativa, puede emplearse la tecnología del ADN recombinante, en la que una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido se inserta en un vector de expresión, que es transformado o transfectado en una célula hospedante apropiada y se cultiva bajo condiciones adecuadas para la expresión. Estos procedimientos son conocidos en general en la técnica, tal como se describe en general en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Así, pueden utilizarse péptidos recombinantes, que comprenden o consisten en uno o más epitopos de la descripción, para presentar el epitopo de células T apropiado.

35 Los polinucleótidos que codifican cada uno de los anteriores péptidos también son parte de la descripción. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, diversos ácidos nucleicos codificarán el mismo péptido debido a la redundancia del código genético.

40 Los polinucleótidos que codifican péptidos contemplados en la presente pueden ser sintetizados mediante técnicas químicas, por ejemplo, el método de fosfotriéster de Matteucci, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185 (1981). Los polinucleótidos que codifican péptidos que comprenden o consisten en un análogo pueden prepararse simplemente sustituyendo la base o bases del ácido nucleico apropiadas y deseadas en lugar de las que codifican el epitopo nativo.

45 El polinucleótido, por ejemplo, un minigén (véase a continuación), puede producirse ensamblando oligonucleótidos que codifican las hebras más y menos del polinucleótido, por ejemplo, un minigén. Pueden sintetizarse oligonucleótidos solapantes (con una longitud de 15-100 bases), fosforilarse, purificarse y asociarse bajo condiciones apropiadas utilizando técnicas muy conocidas. Los extremos de los oligonucleótidos pueden unirse, por ejemplo, utilizando ADN ligasa de T4. Un polinucleótido, por ejemplo, un minigén, que codifica el péptido de la descripción, puede clonarse en un vector deseado, tal como un vector de expresión. Después pueden

proporcionarse a la secuencia codificadora los conectores apropiados y acoplarse en vectores de expresión que están habitualmente disponibles en la técnica, y los vectores pueden utilizarse para transformar hospedantes adecuados para producir el péptido deseado, tal como una proteína de fusión.

5 Los expertos en la técnica conocen un gran número de dichos vectores y sistemas de hospedantes adecuados, y están disponibles en el mercado. Se proporcionan los siguientes vectores como ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); pCR (Invitrogen). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia); p75.6 (Valentis); pCEP (Invitrogen); pCEI (Epimmune). Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro plásmido o vector con la
10 condición de que sea replicable y viable en el hospedante.

Como ejemplos representativos de hospedantes apropiados, pueden mencionarse células bacterianas, tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*; células fúngicas, tales como levaduras; células de insecto, tales como *Drosophila* y Sf9; células animales, tales como las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell*, 23:115 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK o el melanoma de Bowes; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un hospedante apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las indicaciones en la presente.

20 Así, la presente descripción describe vectores, preferiblemente vectores de expresión, útiles para la producción de los péptidos de la presente descripción, y células hospedantes que comprenden dichos vectores.

Las células hospedantes se modifican genéticamente (se transducen o se transforman o se transfectan) con los vectores de esta descripción que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula vírica, un fago, etc. Las células hospedantes modificadas pueden cultivarse en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los polinucleótidos. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son como las que se han utilizado previamente con la célula hospedante seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

30 Para la expresión de los péptidos, se proporcionarán a la secuencia codificadora codones de inicio y de fin unidos operablemente, regiones de promotores y terminadores y, habitualmente, un sistema de replicación para proporcionar un vector de expresión para la expresión en el hospedante celular deseado. Por ejemplo, se proporcionan secuencias de promotores compatibles con los hospedantes bacterianos en plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de la secuencia codificadora deseada. Los vectores de expresión resultantes se transforman en hospedantes bacterianos adecuados.

35 En general, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de la replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedante, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRPI de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. Estos promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas, tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), un factor A invertido, fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se monta en la fase apropiada con
40 secuencias de inicio y fin de la traducción y, preferiblemente, una secuencia conductora capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida hacia el espacio periplásmico o el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que imparte características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

45 También pueden utilizarse células hospedantes de levadura, insecto o mamífero, empleando los vectores y las secuencias de control adecuados. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritos por Gluzman, *Cell*, 23:115 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de la replicación, un promotor y un potenciador adecuado, y
50 también cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y emplame, secuencias de fin de la transcripción, y secuencias no transcritas 5' flanqueantes. Estos promotores también pueden derivarse de fuentes víricas tales como, por ejemplo, citomegalovirus humano (promotor CMV-IE) o virus del herpes simplex de tipo 1 (promotor HSV TK). Las secuencias de ácidos nucleicos derivadas del corte y empalme de SV40 y los sitios de poliadenilación pueden utilizarse para proporcionar los elementos genéticos
55 no transcritos requeridos.

Los polinucleótidos que codifican péptidos de la descripción también pueden comprender una secuencia señal de ubiquitinación y/o una secuencia de transporte dirigido, tal como una secuencia señal del retículo endoplásmico (ER) para facilitar el movimiento del péptido resultante hacia el retículo endoplásmico.

5 Los polinucleótidos de la descripción, por ejemplo, minigenes, pueden expresarse en células humanas. Puede utilizarse una tabla de utilización de codones humanos para guiar la elección de codones para cada aminoácido. Estos polinucleótidos preferiblemente comprenden restos aminoácidos espaciadores entre los epitopos y/o análogos, tales como los descritos anteriormente, o pueden comprender secuencias flanqueantes naturales adyacentes a los epitopos y/o análogos (y/o los epitopos de CTL y/o HTL).

Los péptidos de la descripción también pueden ser expresados por vectores víricos o bacterianos.

10 Se incluyen preferiblemente secuencias reguladoras convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica en el vector para asegurar la expresión en las células diana humanas. Resultan deseables varios elementos en el vector: un promotor con un sitio de clonación cadena abajo para la inserción del polinucleótido, por ejemplo, la inserción de un minigén; una señal de poliadenilación para el fin de la transcripción eficaz; un origen de la replicación de *E. coli*; y un marcador seleccionable de *E. coli* (por ejemplo, resistencia a ampicilina o kanamicina). Pueden utilizarse numerosos promotores para este fin, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus humanos (hCMV). Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.^{os} 5.580.859 y 5.589.466 para obtener otras secuencias de promotores adecuadas. Un promotor preferido es el promotor CMV-IE.

15 Los polinucleótidos, por ejemplo, minigenes, pueden comprender uno o más intrones sintéticos o naturales en la región transcrita. También puede considerarse la inclusión de secuencias de estabilización del ARNm y secuencias para la replicación en células de mamífero para aumentar la expresión del polinucleótido, por ejemplo, minigén.

20 Además, el polinucleótido, por ejemplo, un minigén, puede comprender secuencias inmunoestimulantes (ISS o CpG). Estas secuencias pueden incluirse en el vector fuera de la secuencia codificadora del polinucleótido (por ejemplo, un minigén) para potenciar la inmunogenicidad.

25 En algunos aspectos, puede utilizarse un vector de expresión bicistrónico que permite la producción de los péptidos codificados por el polinucleótido (por ejemplo, un minigén) de la descripción y una segunda proteína (por ejemplo, una proteína que module la inmunogenicidad). Los ejemplos de proteínas o polipéptidos que, si se coexpresan con péptidos de la descripción, pueden potenciar una respuesta inmunológica, incluyen citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), moléculas inductoras de citoquinas (por ejemplo, LelF), moléculas coestimuladoras, o proteínas de unión a pan-DR (moléculas PADRE®, Epimmune Inc., San Diego, CA). Los epitopos de células T auxiliares (HTL), tales como moléculas PADRE®, pueden unirse a las señales de transporte dirigido intracelular y expresarse por separado de los péptidos expresados de la descripción. Disminuir de modo específico la respuesta inmunológica mediante la coexpresión de moléculas inmunosupresoras (por ejemplo, TGF-β) puede ser beneficioso en ciertas enfermedades.

30 Tras haber seleccionado un vector de expresión, el polinucleótido, por ejemplo, un minigén, se clona en la región del policonector cadena abajo del promotor. Este plásmido se transforma en una cepa bacteriana apropiada, y se prepara ADN utilizando técnicas convencionales. La orientación y la secuencia de ADN del polinucleótido, por ejemplo, un minigén, así como todos los demás elementos incluidos en el vector, se confirman utilizando cartografiado de restricción, análisis de la secuencia del ADN y/o análisis de PCR. Las células bacterianas que portan el plásmido correcto pueden conservarse como bancos de células.

35 Así, la descripción incluye los péptidos descritos en la presente, los polinucleótidos que codifican cada uno de dichos péptidos, así como las composiciones que comprenden los péptidos y los polinucleótidos, e incluye métodos para producir y métodos para utilizar los péptidos, los polinucleótidos y las composiciones, tal como se describe más a fondo a continuación.

Composiciones

En otros aspectos, la invención se dirige a una composición que comprende los péptidos de la invención y opcionalmente otro componente o componentes.

45 En algunos aspectos, la composición comprende o consiste en múltiples péptidos, es decir, 10 péptidos de la invención.

La composición puede comprender al menos 10 péptidos seleccionados de los descritos anteriormente o a continuación. Al menos uno de dichos uno o más péptidos puede ser un heteropolímero o un homopolímero. Además, la composición puede comprender un epitopo de CTL y/o HTL, que puede derivarse de un antígeno asociado a un tumor. El epitopo adicional también puede ser una molécula de unión a PanDR (por ejemplo, un epitopo de células T auxiliares universal PADRE®).

50 Los componentes opcionales incluyen excipientes, diluyentes, proteínas, tales como péptidos que comprenden un epitopo de CTL y/o un epitopo de HTL, tal como un péptido de unión a pan-DR (por ejemplo, un epitopo de células T auxiliares universal PADRE®) y/o un vehículo, polinucleótidos que codifican dichas proteínas, lípidos, o liposomas, así como otros componentes descritos en la presente. Existen numerosos aspectos de las composiciones según la descripción, tales como un cóctel de péptidos; péptidos y/o análogos y uno o más epitopos de CTL y/o HTL.

- 5 Las composiciones comprenden péptidos de la invención, junto con uno o más componentes diferentes, según se describió anteriormente y en la presente. "Uno o más" se refiere a cualquier unidad de número entero de 1-150, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 péptidos, polinucleótidos u otros componentes.
- 10 Las composiciones de la descripción pueden ser, por ejemplo, polipéptidos de la invención combinados o complejados con formulaciones de lípidos catiónicos. También pueden utilizarse las tecnologías de transporte dirigido de toxinas, también denominadas transporte dirigido mediado por receptores, tales como las de Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts), o unirse a proteínas de estrés, por ejemplo, HSP 96 (Stressgen Biotechnologies Corp., Victoria, BC, Canadá).
- 15 En ciertos aspectos, los componentes que inducen respuestas de células T se combinan con componentes que inducen respuestas de anticuerpos contra el antígeno diana de interés. Un aspecto preferido de dicha composición comprende epitopos de clase I y de clase II según la descripción. Como alternativa, una composición comprende un epitopo de clase I y/o de clase II según la descripción, junto con una molécula PADRE® (Epimmune, San Diego, Calif.).
- 20 Las composiciones de la descripción pueden comprender células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas. Las células presentadoras de antígenos, por ejemplo, células dendríticas, pueden ser transfectadas, por ejemplo, con un polinucleótido, tal como una construcción de minigén según la descripción, para inducir respuestas inmunológicas. El péptido puede estar unido a una molécula de HLA sobre la célula presentadora de antígenos, con lo cual cuando está presente un linfocito T citotóxico restringido por HLA, un receptor del CTL se une a un complejo de la molécula de HLA y el péptido.
- 25 Las composiciones de la descripción también pueden comprender fármacos antivíricos, tales como interferón- α , o adyuvantes inmunológicos, tales como IL-12, GM-CSF, etc.
- 30 Las composiciones pueden comprender una cadena pesada de HLA, β_2 -microglobulina, estreptavidina y/o biotina. La estreptavidina puede estar marcada de modo fluorescente. Las composiciones pueden comprender tetrámeros (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.635.363; Science, 274:94-96 (1996)). Una composición de tetrámeros comprende una cadena pesada de HLA, β_2 -microglobulina, estreptavidina y biotina. La estreptavidina puede estar marcada de modo fluorescente. Las composiciones también pueden comprender dímeros. Una composición de dímeros comprende una molécula de MHC y una molécula de Ig (véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7568-7573 (1998)).
- 35 En algunos aspectos, puede resultar deseable incluir en las composiciones de la descripción al menos un componente que ceba a los linfocitos T citotóxicos. Los lípidos se han identificado como agentes capaces de cebar a los CTL *in vivo* contra antígenos víricos. Por ejemplo, pueden unirse restos ácido palmítico a los grupos ϵ - y α -amino de un resto lisina y después conectarse, por ejemplo, a través de uno o más restos conectores, tales como Gly-, Gly-Gly-, Ser-, Ser-Ser-, o similares, a un péptido inmunogénico. El péptido lipidado puede después administrarse directamente en una micela o partícula, incorporarse en un liposoma, o emulsionarse en un adyuvante, por ejemplo, adyuvante de Freund incompleto. Una composición preferida comprende ácido palmítico unido a los grupos ϵ - y α -amino de Lys, que se une a través de un enlace, por ejemplo, Ser-Ser, al extremo amino-terminal del péptido.
- 40 Otro ejemplo de cebado de lípidos de las respuestas de CTL, las lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P₃CSS), pueden utilizarse para cebar CTL específicos de virus cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres, *et al.*, Nature, 342:561, 1989). Los péptidos de la descripción pueden acoplarse a P₃CSS, por ejemplo, y el lipopéptido administrarse a un individuo para cebar específicamente una respuesta de CTL contra el antígeno diana. Además, debido a que la inducción de anticuerpos neutralizantes también puede ser cebada con epitopos conjugados con P₃CSS, dos de estas composiciones pueden combinarse para ser más eficaces para inducir respuestas humorales y mediadas por células.
- 45 Otro aspecto preferido es una composición que comprende péptidos de la invención emulsionados en IFA.
- Un aspecto muy preferido de la descripción comprende péptidos que comprenden SEQ ID NO:1-10 de la invención emulsionados en IFA.
- 50 Las composiciones de la descripción también pueden comprender péptidos de CTL y/o HTL. Estos péptidos de CTL y HTL pueden ser modificados mediante la adición de restos aminoácidos a los terminales de un péptido para proporcionar la facilidad de conectar un péptido a otro, para el acoplamiento a un soporte vehículo o un péptido más grande, para modificar las propiedades físicas o químicas del péptido u oligopéptido, o similares. Pueden introducirse restos aminoácidos, tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico, o restos aminoácidos naturales o no naturales, en el carboxilo- o amino-terminal del péptido u oligopéptido, en particular péptidos de clase I. Sin embargo, debe advertirse que una modificación en el extremo carboxi-terminal de un epitopo de CTL, en algunos casos, puede alterar las características de unión del péptido. Además, las secuencias del
- 55

5 péptido u oligopéptido pueden diferir de la secuencia natural por haber sido modificadas por acilación NH_2 -terminal, por ejemplo, mediante una acetilación de alcanóilo ($\text{C}_1\text{-C}_{20}$) o tioglicolilo, una amidación carboxilo-terminal, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos casos, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para la unión a un soporte u otra molécula. Los epitopos de CTL y HTL pueden comprender restos aminoácidos adicionales, tales como los descritos anteriormente que incluyen espaciadores.

10 Otro aspecto de una composición según la descripción es una célula presentadora de antígenos que comprende uno o más péptidos según la descripción. La célula presentadora de antígenos puede ser una célula presentadora de antígenos "profesional", tal como una célula dendrítica. La célula presentadora de antígenos puede comprender el péptido de la descripción conocido por cualquier medio o que vaya a ser determinado en la técnica. Estos medios incluyen la pulsación de células dendríticas con uno o más péptidos individuales, mediante la administración de ácidos nucleicos, tales como el transporte de ácidos nucleicos balístico o mediante otras técnicas de la técnica para la administración de ácidos nucleicos, que incluyen la administración basada en vectores, por ejemplo, vectores víricos, de ácidos nucleicos.

15 Las composiciones pueden comprender vehículos. Los vehículos que pueden utilizarse con las composiciones de la descripción son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas, tales como albúmina de suero humana, toxoide del tétanos, restos poliaminoácidos, tales como poli-L-lisina, poli-L-ácido glutámico, proteínas del virus de la gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, y similares.

20 Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable, tal como agua, o una disolución salina, preferiblemente disolución salina tamponada con fosfato. Además, tal como se describe en la presente, las respuestas de CTL pueden ser cebadas conjugando los péptidos de la descripción con lípidos, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P_3CSS).

25 Las composiciones de la invención pueden ser composiciones farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas preferiblemente contienen una cantidad inmunológicamente eficaz de los péptidos de la invención, y opcionalmente uno o más componentes adicionales que sean farmacéuticamente aceptables. Una composición preferida comprende péptidos de la invención e IFA. Una composición más preferida de la descripción comprende péptidos de la invención, uno o más péptidos, e IFA.

30 Después de la inmunización con un péptido y/o composición según la invención, mediante una inyección (por ejemplo, SC, ID, IM), aerosol, por vía oral, transdérmica, transmucósica, intrapleural, intratecal u otra vía adecuada, el sistema inmunológico del hospedante responde a la vacuna con una respuesta inmunológica que comprende la producción de anticuerpos, CTL y/o HTL específicos para el antígeno o antígenos deseados. Por consiguiente, el hospedante se hace al menos parcialmente inmune a la posterior exposición al TAA o a los TAA, o al menos parcialmente resistente al posterior desarrollo de células que portan TAA y, con ello, se deriva un beneficio profiláctico o terapéutico.

35 Además, los péptidos, los cebadores y los epitopos de la descripción pueden utilizarse en cualquier régimen de inmunización o de administración deseado; por ejemplo, como parte de vacunaciones periódicas, tales como vacunaciones anuales como en la técnica veterinaria, o como en vacunaciones periódicas como en la técnica médica humana, o como en un régimen de cebado de refuerzo en el que un vector o recombinante se administra antes o después de la administración del mismo epitopo de interés o de un epitopo de interés diferente, o un recombinante o vector que expresa dicho mismo epitopo de interés o un epitopo de interés diferente (que incluye un recombinante o vector que expresa dicho mismo epitopo de interés o un epitopo de interés diferente). Véanse, por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 5.997.878; 6.130.066; 6.180.398; 6.267.965; y 6.348.450.

Afinidad de unión de los epitopos y análogos por moléculas de HLA

45 Tal como se indica en la presente, el alto grado de polimorfismo de HLA es un factor importante que debe tomarse en cuenta en la estrategia basada en epitopos para desarrollar productos terapéuticos y de diagnóstico. Para abordar este factor, se utiliza preferiblemente una selección de epitopos que incluye la identificación de péptidos capaces de unirse con una afinidad alta o intermedia a múltiples moléculas de HLA, y lo más preferiblemente estos epitopos se unen con afinidad alta o intermedia a dos o más moléculas de HLA específicas de alelo. Sin embargo, en algunos aspectos, se prefiere que todos los epitopos en una composición dada se unan a los alelos de un único supertipo de HLA o una única molécula de HLA.

50 Los epitopos y análogos de la descripción preferiblemente incluyen los que tienen una CI_{50} o un valor de afinidad de unión por una molécula o moléculas de HLA de clase I de 500 nM o mejor (es decir, el valor es ≤ 500 nM). En ciertos aspectos de la descripción, los péptidos de interés tienen una CI_{50} o un valor de afinidad de unión por una molécula o moléculas de HLA de clase I de 200 nM o mejor. En ciertos aspectos de la descripción, los péptidos de interés tienen una CI_{50} o un valor de afinidad de unión por una molécula o moléculas de HLA de clase I de 100 nM o mejor.

55 Si se incluye epitopos de HTL, son preferiblemente epitopos de HTL que tienen una CI_{50} o un valor de afinidad de unión por una molécula o moléculas de HLA de clase II de 1000 nM o mejor (es decir, el valor es ≤ 1.000 nM). Por ejemplo, la unión del péptido se evalúa ensayando la capacidad de un péptido candidato por unirse a una molécula de HLA purificada *in vitro*. Entonces, los péptidos que muestran una afinidad alta o intermedia se consideran para su

posterior análisis. Los péptidos seleccionados generalmente se ensayan con otros miembros de la familia del supertipo. En aspectos preferidos, los péptidos que muestran unión de reactividad cruzada entonces se emplean en vacunas o análisis de selección celular.

5 La relación entre la afinidad de unión por moléculas de HLA de clase I y la inmunogenicidad de epitopos de péptidos discretos sobre antígenos unidos se determinó por primera vez por los inventores en Epimmune. Tal como se describe con más detalle en la presente, una mayor afinidad de unión a HLA se correlaciona con una mayor inmunogenicidad.

10 Una mayor inmunogenicidad puede manifestarse en varias formas diferentes. La inmunogenicidad se corresponde con la inducción de una respuesta inmunológica, si se produce, y con el vigor de cualquier respuesta concreta, así como con la proporción de una población en la que se induce una respuesta. Por ejemplo, un péptido puede inducir una respuesta inmunológica en un conjunto diverso de la población, pero no producir en ningún caso una respuesta vigorosa. Según estos principios, se ha descubierto que cerca del 90% de los péptidos de unión alta inducen una respuesta y, así, son "inmunogénicos", en contraste con aproximadamente 50% de los péptidos que se unen con afinidad intermedia (véase, por ejemplo, Schaeffer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988)). Los péptidos de clase I de unión de alta afinidad en general tienen una afinidad menor o igual a 100 nM. Además, no solo los péptidos con mayor afinidad de unión tienen una mayor probabilidad de generar una respuesta inmunológica, sino que la respuesta generada tiende a ser más vigorosa que la respuesta observada con péptidos de unión más débil. Como resultado, se requiere menos péptidos para inducir un efecto biológico similar si se emplea un péptido de unión de alta afinidad en lugar de uno de baja afinidad. Así, en algunos aspectos preferidos de la descripción, se emplean epitopos de unión de alta afinidad.

15 La correlación entre la afinidad de unión y la inmunogenicidad ha sido analizada por los presente inventores mediante dos estrategias experimentales diferentes (véase, por ejemplo, Sette, *et al.*, *J. Immunol.*, 153:5586-5592 (1994)). En una primera estrategia, se analizó la inmunogenicidad de epitopos potenciales que varían en la afinidad de unión a HLA a través de un intervalo en 10.000 veces en ratones transgénicos HLA-A*0201. En la segunda estrategia se evaluó la antigenicidad de aproximadamente 100 epitopos potenciales derivados del virus de la hepatitis B (HBV) diferentes, en los que todos portan motivos de unión A*0201, utilizado PBL procedentes de pacientes con hepatitis aguda. De acuerdo a estas estrategias, se determinó que un valor de umbral de afinidad de aproximadamente 500 nM (preferiblemente 50 nM o menor) determina la capacidad de un epitopo de péptido para inducir una respuesta de CTL. Estos datos son verdaderos para las mediciones de afinidad de unión de clase I para péptidos procesados de forma natural y para los epitopos de células T sintetizados. Estos datos también indican el importante papel de la selección de determinantes para configurar las respuestas de células T (véase, por ejemplo, Schaeffer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4649-4653 (1989)).

25 También se ha delineado un umbral de afinidad asociado con la inmunogenicidad en el contexto de moléculas de HLA de clase II (es decir, HLA DR) (véase, por ejemplo, Southwood, *et al.*, *J. Immunology*, 160:3363-3373 (1998), y la patente de EEUU n.º 6.413.527, expedida el 2 de julio, 2002). Para definir un umbral biológicamente significativo de afinidad de unión a HLA de clase II, se compiló una base de datos de las afinidades de unión de 32 epitopos restringidos por DR por su elemento restrictor (es decir, la molécula de HLA que se une al epitopo). En aproximadamente la mitad de los casos (15 de 32 epitopos), la restricción de DR se asoció con unas altas afinidades de unión, es decir, unos valores de afinidad de unión de 100 nM o menos. En la otra mitad de los casos (16 de 32), la restricción de DR se asoció con una afinidad intermedia (unos valores de afinidad de unión en el intervalo de 100-1000 nM). En solo uno de los 32 casos se asoció la restricción de DR con una CI_{50} de 1000 nM o mayor. Así, se define 100 nM como un umbral de afinidad asociado con la inmunogenicidad en el contexto de moléculas de DR.

Motivos y supermotivos de unión a epitopos

35 A lo largo del estudio de análogos de antígenos con una sustitución de un único aminoácido y la secuenciación de péptidos procesados naturalmente y unidos de modo endógeno, se han identificado restos críticos requeridos para la unión específica de alelo a moléculas de HLA. La presencia de estos restos en un péptido se correlaciona con la probabilidad de unión y con la afinidad de unión por moléculas de HLA.

40 La identificación de motivos y/o supermotivos que se correlacionan con una afinidad de unión alta e intermedia es importante cuando se identifican epitopos de péptidos inmunogénicos para su inclusión en una vacuna. Kast *et al.* (*J. Immunol.*, 152:3904-3912 (1994)) han demostrado que los péptidos que portan motivos representan 90% de los epitopos que se unen a moléculas de HLA de clase I específicas de alelo. En el estudio de Kast, se generaron todos los posibles péptidos con una longitud de 9 aminoácidos, cada uno solapante en ocho restos aminoácidos, que cubren la secuencia completa de las proteínas E6 y E7 del papilomavirus humano de tipo 16, lo cual produjo 240 péptidos. Los 240 péptidos se evaluaron para la unión a cinco moléculas de HLA específicas de alelo que son expresadas con alta frecuencia entre diferentes grupos étnicos. Este conjunto no sesgado de péptidos permite una evaluación de los valores predictivos de motivos de HLA de clase I. Del conjunto de 240 péptidos se identificaron 22 péptidos que se unen a una molécula de HLA específica de alelo con una afinidad alta o intermedia. De estos 22 péptidos, 20 (es decir, 91%) portan motivos. Así, este estudio demuestra el valor de los motivos para la identificación de epitopos de péptidos que se van a incluir en una vacuna.

Por consiguiente, el uso de técnicas de identificación basadas en motivos identifica aproximadamente 90% de todos los epitopos potenciales en una secuencia de proteína diana. Sin el análisis de motivos descrito, la capacidad de identificar un péptido o péptidos inmunogénicos de modo práctico para su uso en el diagnóstico o en productos terapéuticos se ve gravemente perjudicada.

5 Los péptidos, las composiciones farmacéuticas y las vacunas de la presente descripción también pueden comprender epitopos que se unen a moléculas DR de MHC de clase II. Existe un mayor grado de heterogeneidad en tamaño y en la unión a la posición en marco del motivo, con relación al N- y C-terminal del péptido, para los ligandos de péptidos de clase II. Esta mayor heterogeneidad de los los ligandos de péptidos de HLA de clase II es debida a la estructura del surco de unión de la molécula de HLA de clase II que, a diferencia de su homólogo de clase I, está menos físicamente constreñida en ambos extremos. El análisis cristalográfico de complejos de péptidos-DRB*0101 de HLA de clase II para identificar los restos asociados con la energía de unión mayor ha identificado los restos complejados con los bolsillos complementarios sobre las moléculas DRB1*0101. Un resto de anclaje importante se acopla con el bolsillo hidrófobo más profundo (véase, por ejemplo, Madden, D.R., *Ann. Rev. Immunol.*, 13:587 (1995)) y se denomina la posición 1 (P1). La P1 puede representar el resto N-terminal de un epitopo de péptidos de unión de clase II, pero más generalmente está flanqueando hacia el N-terminal por uno o más restos. Otros estudios también han indicado un papel importante al resto del péptido en la sexta posición hacia el C-terminal, con relación a P1, en la unión a diversas moléculas de DR. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU 5.736.142, y las solicitudes en tramitación junto con la presente tituladas "Alteración de las respuestas inmunológicas utilizando péptidos de unión a pan-DR", U.S.S.N. 09/709.774, presentada el 8 de noviembre, 2000, y 09/707.738, presentada el 6 de noviembre, 2000.

Supermotivo HLA-A2

Se han descrito las especificidades de anclaje primario para moléculas de HLA-A2.1 específicas de alelo (véase, por ejemplo, Falk *et al.*, *Nature*, 351:290-296 (1991); Hunt *et al.*, *Science*, 255:1261-1263 (1992); Parker *et al.*, *J. Immunol.*, 149:3580-3587 (1992); Ruppert *et al.*, *Cell*, 74:929- 937 (1993)) y la unión de reactividad cruzada entre moléculas de HLA-A2 y -A28 (véase, por ejemplo, Fruci *et al.*, *Human Immunol.*, 38:187-192 (1993); Tanigaki *et al.*, *Human Immunol.*, 39:155-162 (1994); del Guercio *et al.*, *J. Immunol.*, 154:685-693 (1995); Kast *et al.*, *J. Immunol.*, 152:3904-3912 (1994), para obtener un análisis de los datos pertinentes). Estos restos de anclaje primario definen el supermotivo HLA-A2 que, cuando está presente en ligandos de péptidos, se corresponde con la capacidad para unirse a varias moléculas de HLA-A2 y -A28 diferentes. El supermotivo HLA-A2 comprende ligandos de péptidos con L, I, V, M, A, T, o Q como resto de anclaje primario en la posición 2, y L, I, V, M, A, o T como resto de anclaje primario en la posición C-terminal de epitopo.

La correspondiente familia de moléculas de HLA (es decir, el supertipo HLA-A2 que se une a estos péptidos) está formado por al menos: A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*0209, A*0214, A*6802, y A*6901. Otras moléculas de HLA específicas de alelo que se predice que serán miembros de la superfamilia A2 se muestran en las tablas 4D y 6. Tal como se explica en detalle a continuación, la unión de cada una de las moléculas de HLA específicas de alelo individuales puede modularse mediante sustituciones en las posiciones de anclaje primario y/o de anclaje secundario, eligiendo preferiblemente los respectivos restos especificados para el supermotivo.

Motivo HLA-A*0201

40 Se determinó que un motivo HLA-A2*0201 está caracterizado por la presencia en los ligandos de péptidos de L o M como resto de anclaje primario en la posición 2, y L o V como resto de anclaje primario en la posición C-terminal de un péptido de 9 restos (véase, por ejemplo, Falk *et al.*, *Nature*, 351:290-296 (1991)) y después se descubrió que comprende I en la posición 2, e I o A en la posición C-terminal de un péptido de nueve aminoácidos (véase, por ejemplo, Hunt *et al.*, *Science*, 255:1261-1263, 6 de marzo, 1992; Parker *et al.*, *J. Immunol.*, 149:3580-3587 (1992)) y la posición 10 de un péptido decámero. Los presentes inventores también han definido que el motivo específico de alelo A*0201 comprende además V, A, T, o Q como resto de anclaje primario en la posición 2, y M o T como resto de anclaje primario en la posición C-terminal del epitopo (véase, por ejemplo, Kast *et al.*, *J. Immunol.*, 152:3904-3912, 1994).

50 Así, el motivo HLA-A*0201 comprende ligandos de péptidos L, I, V, M, A, T, o Q como restos de anclaje primario en la posición 2, y L, I, V, M, A, o T como resto de anclaje primario en la posición C-terminal del epitopo. Para esta relación de motivo-supermotivo, los restos preferidos y menos preferidos/tolerados que caracterizan las posiciones de anclaje primario del motivo HLA-A*0201 son idénticos a los restos que describen el supermotivo A2 (para obtener un análisis de los datos pertinentes, véase, por ejemplo, del Guercio *et al.*, *J. Immunol.*, 154:685-693, 1995; Ruppert *et al.*, *Cell*, 14:929-931, 1993; Sidney *et al.*, *Immunol. Today*, 17:261-266, 1996; Sette y Sidney, *Curr. Opin. in Immunol.*, 10:478-482, 1998). También se han definido los restos de anclaje secundario que caracterizan el motivo A*0201 (véase, por ejemplo, Ruppert *et al.*, *Cell*, 74:929-937, 1993). Estos anclajes secundarios se muestran en las tablas 4A, 4B, y 4C. La unión de péptidos a moléculas de HLA-A*0201 puede modularse mediante sustituciones en las posiciones de anclaje primario y/o de anclaje secundario, eligiendo preferiblemente los respectivos restos especificados para el motivo.

Motivos indicativos de epitopos de péptidos que inducen HTL de clase II

Los restos de anclaje primario y secundario de los motivos y supermotivos de epitopos de péptidos de HLA de clase II se resumen en las patentes de EEUU n.ºs 5.736.142, 5.679.640 y 6.413.935; las solicitudes en tramitación junto con la presente tituladas "Alteración de las respuestas inmunológicas utilizando péptidos de unión a pan-DR", U.S.S.N. 09/709.774, presentada el 8 de noviembre, 2000, y 09/707.738, presentada el 6 de noviembre, 2000; y las publicaciones PCT n.ºs WO 95/07707 y WO 97/26784.

Análogos de péptidos que estimulan una respuesta inmunológica

En general, las respuestas de CTL y HTL no se dirigen contra todos los posibles epitopos. En realidad, están restringidas a unos pocos determinantes "inmudominantes" (Zinkernagel, *et al.*, *Adv. Immunol.*, 27:5159, 1979; Bennink, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 168:1935-1939, 1988; Rawle, *et al.*, *J. Immunol.*, 146:3977-3984, 1991). Se ha reconocido que la inmunodominancia (Benacerraf, *et al.*, *Science*, 175:273-279, 1972) puede ser explicada por la capacidad de un epitopo dado para unirse selectivamente a una proteína de HLA concreta (teoría de la selección del determinante) (Vitiello, *et al.*, *J. Immunol.*, 131:1635, 1983; Rosenthal, *et al.*, *Nature*, 267:156-158, 1977), o para ser selectivamente reconocido por las especificidades TCR (receptor de células T) existentes (teoría del repertorio) (Klein, J., IMMUNOLOGY, THE SCIENCE OF SELF/NONSELF DISCRIMINATION, John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 270-310, 1982). Se ha demostrado que otros factores, muy probablemente relacionados con acontecimientos de procesamiento, también pueden desempeñar un papel clave en la determinación, más allá de la inmunogenicidad estricta, de cuáles, de entre los muchos determinantes potenciales, serán los presentados como inmunodominantes (Sercarz, *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 11:729-766, 1993).

El concepto de dominancia y subdominancia es importante para la inmunoterapia de enfermedades infecciosas y de malignidades. Por ejemplo, en el desarrollo de una enfermedad vírica crónica, el reclutamiento de epitopos subdominantes puede ser importante para que la eliminación de la infección tenga éxito, en especial si las especificidades de CTL o HTL dominantes han sido inactivadas por la tolerancia funcional, supresión, mutación de virus y otros mecanismos (Franco, *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 7:524-531, 1995). En el caso del cáncer y de antígenos tumorales, los CTL que reconocen al menos algunos de los péptidos de mayor afinidad de unión pueden ser funcionalmente inactivados. Los péptidos con una menor afinidad de unión son reconocidos preferentemente en estos casos y, por tanto, pueden ser preferidos para las vacunas anticáncer terapéuticas o profilácticas.

En particular, se ha advertido que un número significativo de epitopos derivados de antígenos asociados a tumores (TAA) no víricos conocidos se unen a HLA de clase I con una afinidad intermedia (CI_{50} en el intervalo de 50-500 nM), y no con una afinidad alta (CI_{50} menor que 50 nM).

Por ejemplo, se ha descubierto que 8 de 15 péptidos de TAA conocidos, reconocidos por linfocitos infiltrantes en tumores (TIL) o CTL, se unen en el intervalo de 50-500 nM (estos datos contrastan con el cálculo de que 90% de los antígenos víricos conocidos se unen a moléculas de HLA de clase I con una CI_{50} de 50 nM o menor, mientras que solo aproximadamente 10% se unen en el intervalo de 50-500 nM (Sette, *et al.*, *J. Immunol.*, 153:558-592, 1994)). En el escenario de un cáncer, este fenómeno probablemente es debido a la eliminación o la inhibición funcional de los CTL que reconocen varios de los péptidos con unión mayor, probablemente debido a acontecimientos de tolerización de células T.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que debido a que las células T contra epitopos dominantes han podido ser clónicamente delecionadas, la selección de epitopos subdominantes puede permitir reclutar a células T existentes, lo cual conduciría a una respuesta terapéutica o profiláctica. Sin embargo, la unión de moléculas de HLA a epitopos subdominantes a menudo es menos vigorosa que a epitopos dominantes.

Por consiguiente, es necesario poder modular la afinidad de unión de epitopos inmunogénicos concretos para una o más moléculas de HLA, para modular con ello la respuesta inmunológica inducida por el péptido, por ejemplo, para preparar péptidos análogos que induzcan una respuesta más vigorosa. Esta capacidad para modular la afinidad de unión y la respuesta inmunológica resultante según la presente descripción potencia en gran medida la utilidad de los agentes terapéuticos y las vacunas basadas en epitopos de péptidos.

Aunque los péptidos que presentan reactividad cruzada adecuada entre todos los alelos de una superfamilia se identifican mediante los procedimientos de selección descritos anteriormente, la reactividad cruzada no siempre es tan completa como sea posible, y en ciertos casos pueden ser útiles procedimientos para aumentar la reactividad cruzada de los péptidos; más aún, dichos procedimientos también pueden utilizarse para modificar otras propiedades de los péptidos, tales como la afinidad de unión o la estabilidad del péptido. Habiendo establecido las reglas generales que gobiernan la reactividad cruzada de péptidos por alelos de HLA dentro de un motivo o supermotivo concreto, pueden realizarse modificaciones (es decir, formación de análogos) en la estructura de los péptidos de particular interés para lograr una capacidad de unión a HLA más amplia (o modificada de otra forma). De modo más específico, pueden producirse péptidos que muestren los patrones de reactividad cruzada más amplios, según las indicaciones en la presente. Los presentes conceptos relacionados con la generación de análogos se indican con más detalle en el documento en tramitación junto con la presente U.S.S.N. 09/226.775, presentado el 5 de enero, 1999.

Brevemente, la estrategia de formación de análogos utiliza los motivos o supermotivos que se correlacionan con la unión a ciertas moléculas de HLA. Pueden crearse péptidos análogos sustituyendo restos aminoácidos en las posiciones de anclaje primario, anclaje secundario, o de anclaje primario y secundario. En general, se preparan análogos para péptidos que ya portan un motivo o supermotivo. Tal como se indica en la presente, los restos de anclaje primario y secundario preferidos de los supermotivos y motivos para los péptidos de unión a HLA-A2 de clase I se muestran en las tablas 4A, 4B y 4C. Para una serie de los motivos o supermotivos según la descripción, se definen restos que son perjudiciales para la unión a moléculas de HLA específicas de alelo o miembros de supertipos de HLA que se unen al respectivo motivo o supermotivo (tabla 4C). Por consiguiente, la eliminación de estos restos que son perjudiciales para la unión puede realizarse según la presente descripción.

Así, una estrategia para mejorar la reactividad cruzada de los péptidos dentro de un supermotivo dado es simplemente delecionar uno o más restos perjudiciales presentes dentro de un péptido, y sustituir un resto "neutro" pequeño, tal como Ala (que puede no influir en el reconocimiento del péptido por las células T). Se espera una mayor probabilidad de reactividad cruzada si, junto con la eliminación de los restos perjudiciales dentro de un péptido, se inserten restos "preferidos" asociados con una unión de alta afinidad a una molécula de HLA específica de alelo o a múltiples moléculas de HLA dentro de una superfamilia.

Para asegurarse de que un péptido análogo, cuando se emplea como vacuna, realmente induzca una respuesta de CTL contra el epitopo nativo *in vivo* (o, en el caso de los epitopos de clase II, induzca células T auxiliares que presenten reactividad cruzada con los péptidos de tipo salvaje), el péptido análogo puede utilizarse para inducir células T *in vitro* procedentes de individuos con el alelo HLA apropiado. Después, se evalúa la capacidad de las células inmunizadas para lisar células diana sensibilizadas con el péptido de tipo salvaje. Como alternativa, la evaluación de la actividad de las células puede realizarse controlando la liberación de IFN. Cada una de estas estrategias de control de las células evalúa el reconocimiento de la APC por los CTL. Sería deseable utilizar, como células presentadoras de antígenos, células que han sido infectadas o transfectadas con los genes apropiados, o (en general solo para epitopos de clase II, debido a la vía de procesamiento de péptidos diferente para HLA de clase II) células que han sido pulsadas con antígenos de proteínas completos, para saber si el antígeno producido de modo endógeno también es reconocido por las células T inducidas por el péptido análogo. Debe advertirse que las células dendríticas pulsadas con el péptido/proteína pueden utilizarse para presentar antígenos de proteínas completos para HLA de clase I y de clase II.

Otro aspecto de la descripción es crear análogos de péptidos de unión débil para asegurar, con ello, un número adecuado de ligantes celulares. Los péptidos de unión a clase I muestran unas afinidades de unión de 500-5000 nM, y portan un resto de anclaje primario aceptable, pero subóptimo, en una o ambas posiciones que puede ser "fijado" sustituyendo restos de anclaje preferidos según el respectivo supertipo. Los péptidos análogos después pueden ensayarse para la capacidad de unión y/o de unión cruzada.

Otro aspecto de la descripción es crear análogos de péptidos que ya son ligantes de reactividad cruzada y candidatos a vacuna, pero que se unen de forma débil a uno o más alelos de un supertipo. Si el ligante de reactividad cruzada porta un resto subóptimo (menos preferido o perjudicial) en una posición de anclaje primario o secundario, puede obtenerse un análogo del péptido sustituyendo un resto perjudicial y reemplazándolo por un resto preferido o menos preferidos, o sustituyendo un resto menos preferido y reemplazándolo por un resto preferido. El péptido análogo después puede ensayarse para la capacidad de unión cruzada.

Otro aspecto para generar análogos de péptidos eficaces implica la sustitución de restos que tienen un impacto adverso sobre la estabilidad o la solubilidad del péptido, por ejemplo, en un entorno líquido. Esta sustitución puede producirse en cualquier posición del epitopo de péptido. Por ejemplo, una cisteína (C) puede ser sustituida a favor de un ácido α -aminobutírico. Debido a su naturaleza química, la cisteína tiene propensión a formar puentes disulfuro y alterar suficientemente el péptido desde el punto de vista estructural como para que se reduzca la capacidad de unión. La sustitución de C por el ácido α -aminobutírico no solo mitiga este problema, sino que realmente mejora la capacidad de unión y de unión cruzada en ciertos casos (véase, por ejemplo, el análisis de Sette *et al.*, en: Persistent Viral Infections, eds. R. Ahmed e I. Chen, John Wiley & Sons, Reino Unido, 1999). La sustitución de una cisteína por ácido α -aminobutírico puede producirse en cualquier resto de un epitopo de péptido, por ejemplo, en posiciones de anclaje o de no anclaje.

Además, se ha demostrado que, en conjuntos de péptidos que portan el motivo A*0201 que contienen al menos un resto de anclaje secundario preferido, pero se evita la presencia de cualquier resto de anclaje secundario perjudicial, 69% de los péptidos se unirá a A*0201 con una CI_{50} menor que 500 nM (Ruppert, J. *et al.*, *Cell*, 74:929, 1993). La determinación de lo que es un resto preferido o perjudicial en Ruppert puede utilizarse para generar algoritmos. Estos algoritmos son flexibles porque las puntuaciones de corte pueden ajustarse para seleccionar conjuntos de péptidos con unas propiedades de unión predichas mayores o menores, según se desee.

Según los procedimientos descritos en la presente, se han identificado epitopos de péptidos de antígenos asociados a tumores y sus análogos que se ha descubierto que se unen a moléculas específicas de alelo de HLA-A2 y que se unen a miembros del supertipo HLA-A2.

Además, pueden añadirse restos aminoácidos adicionales a los terminales de un péptido para que sea más fácil

enlazar péptidos entre sí, para el acoplamiento a un soporte vehículo o péptido más grande, para modificar las propiedades físicas o químicas del péptido u oligopéptido, o similares. Pueden introducirse restos aminoácidos, tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico, o cualquier resto aminoácido natural o no natural, en el C- y/o N-terminal del péptido u oligopéptido, en particular péptidos de clase I. Debe advertirse que la modificación en el carboxilo terminal de un epitopo de CTL, en algunos casos, puede alterar las características de unión del péptido. Además, las secuencias del péptido u oligopéptido pueden diferir de la secuencia natural mediante la modificación por una acilación NH₂-terminal, por ejemplo, mediante una acetilación de alcanóilo (C₁-C₂₀) o tioglicolilo, una amidación carboxilo-terminal, por ejemplo, amoniaco, metilamina, etc. En algunos casos, estas modificaciones pueden proporcionar sitios para la unión a un soporte u otra molécula.

10 *Ensayos para detectar las respuestas de células T*

Tras haber identificado los péptidos de unión a HLA, estos pueden ensayarse para su capacidad para inducir una respuesta de células T. La preparación y la evaluación de péptidos que portan motivos se describe, por ejemplo, en las publicaciones PCT WO 94/20127 y WO 94/03205. Brevemente, los péptidos que comprenden epitopos de un antígeno concreto se sintetizan y se ensayan para su capacidad para unirse a proteínas de HLA pertinentes. Estos ensayos pueden implicar la evaluación de la unión del péptido a moléculas de HLA de clase I purificadas, con relación a la unión de un péptido de referencia radioyodado. Como alternativa, las células que expresan moléculas de clase I vacías (es decir, moléculas de HLA de la superficie celular que no tienen un péptido unido) pueden evaluarse para la unión de péptidos mediante tinción inmunofluorescente y microfluorimetría de flujo. Otros ensayos que pueden utilizarse para evaluar la unión de péptidos incluyen ensayos de ensamblaje de clase I dependiente de péptidos y/o la inhibición del reconocimiento de CTL por competición de péptidos. Los péptidos que se unen a una molécula de HLA de clase I, generalmente con una afinidad de 500 nM o menor, se evalúan también para su capacidad para actuar como dianas para CTL procedentes de individuos infectados o inmunizados, así como para su capacidad para inducir respuestas de CTL primarias *in vitro* o *in vivo* que pueden dar lugar a poblaciones de CTL capaces de reaccionar con células diana seleccionadas asociadas con una patología.

25 Se emplean ensayos análogos para la evaluación de los péptidos de unión de HLA de clase II. Los péptidos que portan motivos de HLA de clase II que se demuestra que se unen, generalmente con una afinidad de 1000 nM o menor, se evalúan también para su capacidad para estimular respuestas de HTL.

Los ensayos convencionales utilizados para detectar respuestas de células T incluyen ensayos de proliferación, ensayos de secreción de linfoquinas, ensayos de citotoxicidad directa, y ensayos de dilución limitante. Por ejemplo, células presentadoras de antígenos que han sido incubadas con un péptido pueden ensayarse para su capacidad para inducir respuestas de CTL en poblaciones de células respondedoras. Las células presentadoras de antígenos pueden ser células normales, tales como células mononucleares de sangre periférica o células dendríticas. Como alternativa, se emplean líneas de células de mamífero no humano mutantes que han sido transfectadas con un gen de MHC de clase I humano, y que son deficientes en su capacidad para cargar moléculas de clase I con péptidos internamente procesados, para evaluar la capacidad del péptido para inducir respuestas de CTL primarias *in vitro*. Pueden emplearse células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como fuente de precursores de CTL. Se incuban células presentadoras de antígenos con el péptido, tras lo cual las células presentadoras de antígenos cargadas con el péptido se incuban con la población de células respondedoras bajo condiciones de cultivo optimizadas. La activación de CTL positivos puede determinarse ensayando el cultivo para la presencia de CTL que lisen las células diana radiomarcadas, tanto dianas pulsadas con el péptido específico como células diana que expresan el antígeno procesado endógenamente a partir del cual se deriva el péptido específico. Como alternativa, puede determinarse la presencia de CTL específicos de epitopo mediante ELISA de IFN γ *in situ*.

En un aspecto de la descripción, dirigido al diagnóstico, se ha diseñado un método que permite la cuantificación directa de células T específicas de antígeno mediante tinción con complejos tetrámeros de HLA marcados con fluoresceína (Altman, J.D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10330, 1993; Altman, J.D. *et al.*, *Science*, 274:94, 1996). Otras opciones incluyen la tinción de linfoquinas intracelulares y ensayos de liberación de interferón o ensayos ELISPOT. La tinción de los tetrámeros, la tinción de linfoquinas intracelulares y los ensayos ELISPOT parecen ser al menos 10 veces más sensibles que los ensayos más convencionales (Lalvani, A. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 186:859, 1997; Dunbar, P.R. *et al.*, *Curr. Biol.*, 8:413, 1998; Murali-Krishna, K. *et al.*, *Immunity*, 8:177, 1998). Además, pueden utilizarse la tecnología DimerX como medio de cuantificación (véase, por ejemplo, *Science*, 274:94-99 (1996), y *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:7568-73 (1998)).

La activación de HTL también puede evaluarse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como la proliferación de células T o la secreción de linfoquinas (véase, por ejemplo, Alexander *et al.*, *Immunity*, 1:751-761, 1994).

Como alternativa, puede utilizarse la inmunización de ratones transgénicos HLA para determinar la inmunogenicidad de los epitopos de péptidos. Se han caracterizado varias razas de ratones transgénicos, por ejemplo, ratones con alelos humanos A2.1, A11 (que también puede utilizarse para analizar epitopos HLA-A3), y B7. Se están desarrollando otras razas de ratones transgénicos (por ejemplo, ratones transgénicos para HLA-A1 y A24). Además, se han desarrollado los modelos de ratón de HLA-DR1 y HLA-CR3. Según los principios de la técnica, se generarán otros modelos de ratones transgénicos con otros alelos de HLA según sea necesario.

Estos ratones pueden inmunizarse con péptidos emulsionados en adyuvante de Freund incompleto; después, cualquier célula T resultante puede ensayarse para su capacidad para reconocer células diana que han sido pulsadas con péptidos o transfectadas con genes que codifican el péptido de interés. Las respuestas de CTL pueden analizarse utilizando los ensayos de citotoxicidad descritos anteriormente. De modo similar, pueden analizarse las respuestas de HTL, por ejemplo, ensayos de proliferación de células T o de secreción de linfoquinas.

Composiciones de vacunas

Las vacunas que contienen una cantidad inmunológicamente eficaz de más péptidos de la invención son otra realización de la invención. Los péptidos pueden administrarse mediante diversos medios o formulaciones, denominadas colectivamente composiciones de "vacunas".

Además, las vacunas según la invención comprenden péptidos de la invención. Por consiguiente, un péptido puede estar presente en una vacuna de modo individual; como alternativa, el péptido puede existir como un homopolímero que comprende múltiples copias del mismo péptido, o como un heteropolímero de diversos péptidos. Los polímeros tienen la ventaja de una mayor probabilidad para producir una reacción inmunológica y, cuando se emplean diferentes epitopos de péptidos para fabricar el polímero, tienen la capacidad para inducir anticuerpos y/o células T que reaccionan con diferentes determinantes antigénicos del antígeno al que se dirige la respuesta inmunológica. La composición puede ser una región natural de un antígeno o puede prepararse, por ejemplo, de modo recombinante o mediante síntesis química.

Los vehículos que pueden utilizarse con las vacunas de la invención son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas, tales como albúmina de suero humana, toxoide del tétanos, restos poliaminoácidos, tales como poli-L-lisina, poli-L-ácido glutámico, proteínas del virus de la gripe, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B, y similares. Las vacunas pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable, tal como agua, o una disolución salina, preferiblemente disolución salina tamponada con fosfato. En general, las vacunas también incluyen un adyuvante. Los adyuvantes tales como adyuvante de Freund incompleto, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, o alumbre, son ejemplos de materiales muy conocidos en la técnica. Además, tal como se describe en la presente, las respuestas de CTL pueden ser cebadas conjugando los péptidos de la descripción con lípidos, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P₃CSS).

Después de la inmunización con una composición de péptidos según la invención mediante una inyección (por ejemplo, SC, ID, IM), aerosol, por vía oral, transdérmica, transmucósica, intrapleural, intratecal u otra vía adecuada, el sistema inmunológico del hospedante responde a la vacuna produciendo anticuerpos, CTL y/o HTL específicos para el antígeno o antígenos deseados. Por consiguiente, el hospedante se hace al menos parcialmente inmune a la posterior exposición al TAA, o al menos parcialmente resistente al posterior desarrollo de células que portan TAA y, con ello, se deriva un beneficio profiláctico o terapéutico.

En ciertos aspectos, los componentes que inducen respuestas de células T se combinan con componentes que inducen respuestas de anticuerpos contra el antígeno diana de interés. Un aspecto preferido de dicha composición comprende epitopos de clase I y de clase II según la descripción. Como alternativa, una composición comprende un epitopo de clase I y/o de clase II según la descripción, junto con una molécula PADRE® (Epimmune, San Diego, CA).

Las vacunas de la descripción pueden comprender células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, como vehículo para presentar los péptidos de la invención. Pueden crearse composiciones de vacunas *in vitro*, después de la movilización y la recolección de células dendríticas, en donde la carga de las células dendríticas se produce *in vitro*.

Las composiciones de vacunas de la descripción también pueden utilizarse en combinación con fármacos antivíricos, tales como interferón- α , o adyuvantes inmunológicos, tales como IL-12, GM-CSF, etc.

Preferiblemente, se emplean los siguientes principios cuando se selecciona un epitopo o epitopos y/o análogos para su inclusión en una vacuna, tanto para formulaciones basadas en péptidos como basadas en ácidos nucleicos. Los epitopos y análogos que pueden utilizarse en una vacuna para tratar o prevenir una enfermedad asociada a TAA se indican en la tabla 1. Cada uno de los siguientes principios puede equilibrarse para realizar la selección. Cuando se van a utilizar múltiples epitopos en una vacuna, los epitopos pueden estar, aunque no es necesario, contiguos en la secuencia en el antígeno nativo a partir del cual se derivan los epitopos. Estos múltiples epitopos pueden remitir al orden de los epitopos dentro de un péptido, o a la selección de epitopos que proceden de la misma región, para su uso en péptidos individuales o en un péptido multiepitópico.

1.) Se seleccionan epitopos y/o análogos que, después de su administración, imitan las respuestas inmunológicas que se ha observado que se correlacionan con la prevención o la eliminación de tumores que expresan TAA. Para HLA de clase I, esto incluye generalmente 3-4 epitopos y/o análogos procedentes de al menos un TAA.

2.) Se seleccionan epitopos y/o análogos para los que se ha establecido que la afinidad de unión requerida se correlaciona con la inmunogenicidad: para HLA de clase I, una CI₅₀ de 500 nM o menor, o para la clase II, una CI₅₀ de 1000 nM o menor. Para HLA de clase I, en la presente se prefiere seleccionar un péptido que tenga una CI₅₀ de

200 nM o menor, puesto que se cree que esto se correlaciona mejor no solo con la inducción de una respuesta inmunológica, sino también con la destrucción de células tumorales *in vitro*. Para HLA A1 y A24, se prefiere especialmente seleccionar un péptido que tenga una CI_{50} de 100 nM o menor.

5 3.) Se seleccionan epitopos y/o análogos que portan supermotivos, o un conjunto suficiente de epitopos y/o análogos que portan motivos específicos de alelos, para conseguir una amplia cobertura de población. En general, es preferible obtener al menos 80% de cobertura de población. Puede emplearse un análisis de Monte Carlo, una evaluación estadística conocida en la técnica, para evaluar la amplitud de la cobertura de la población.

4.) Para antígenos relacionados con el cáncer, puede resultar preferible seleccionar análogos, en lugar o además de los epitopos, porque el paciente puede haber desarrollado tolerancia al epitopo nativo.

10 5.) De particular importancia son los "epitopos anidados". Los epitopos anidados aparecen cuando al menos dos epitopos se solapan en una secuencia peptídica concreta. Por ejemplo, un epitopo anidado puede ser un fragmento de un antígeno procedente de una región que contenga múltiples epitopos que están solapados, o un epitopo que esté completamente incluido en otro, por ejemplo, MAGE3.159 y MAGE3.160 de los péptidos A2 están anidados. Un péptido que comprende "epitopos anidados trascendentes" es un péptido que tiene sobre él epitopos de HLA de clase I y de HLA de clase II. Cuando se proporcionan epitopos anidados, resulta preferible proporcionar una secuencia que tenga el mayor número de epitopos por secuencia proporcionada. Preferiblemente, se evita proporcionar un péptido que sea más largo que el amino-terminal del epitopo amino-terminal y el carboxilo-terminal del epitopo carboxilo-terminal en el péptido. Cuando se proporciona una secuencia que comprende epitopos anidados, resulta importante evaluar la secuencia para asegurarse de que no tenga propiedades patológicas u otras propiedades biológicas perjudiciales; esto es particularmente importante para vacunas dirigidas a organismos infecciosos.

15 6.) Si se crea una proteína con múltiples epitopos o un polinucleótido (por ejemplo, un minigén), un objetivo es generar el péptido más pequeño que incluya los epitopos de interés. Este principio es similar, sino el mismo, que el empleado cuando se selecciona un péptido que comprende epitopos anidados. Sin embargo, con un péptido artificial que comprende múltiples epitopos, el objetivo de minimización del tamaño se equilibra frente a la necesidad de integrar cualquier secuencia espaciadora entre epitopos en la proteína poliepitépica. Pueden introducirse restos aminoácidos espaciadores para evitar epitopos de unión (un epitopo reconocido por el sistema inmunológico, no presente en el antígeno diana y solo creado por la yuxtaposición de epitopos realizada por el ser humano), o para facilitar la ruptura entre epitopos y así potenciar la presentación de epitopos. Los epitopos de unión generalmente deben evitarse, porque el receptor puede generar una respuesta inmunológica contra este epitopo no nativo. De particular interés es un epitopo de unión que es un "epitopo dominante". Un epitopo dominante puede conducir a una respuesta tan entusiasta que las respuestas inmunológicas a otros epitopos disminuyen o son suprimidas.

Los principios son los mismos, excepto que los epitopos de unión se aplican a las secuencias que rodean al epitopo. También hay que tener cuidado con otras secuencias en construcción para evitar una respuesta inmunológica.

35 **Materiales de cebado de células T**

En algunos aspectos, puede resultar deseable incluir en las composiciones farmacéuticas de la descripción al menos un componente que cebe a los linfocitos T citotóxicos. Se han identificado lípidos como agentes capaces de facilitar el cebado de la respuesta de CTL *in vitro* contra antígenos víricos. Por ejemplo, pueden unirse restos ácido palmítico a los grupos ϵ - y α -amino de un resto lisina y después conectarse a un péptido. Pueden utilizarse uno o más restos conectores, tales como Gly-, Gly-Gly-, Ser-, Ser-Ser-, o similares. El péptido lipidado puede después administrarse directamente en una micela o partícula, incorporarse en un liposoma, o emulsionarse en un adyuvante, por ejemplo, adyuvante de Freund incompleto. Una composición inmunogénica preferida comprende ácido palmítico unido a los grupos ϵ - y α -amino de Lys a través de un resto conector, por ejemplo, Ser-Ser, añadido al extremo amino-terminal del péptido inmunogénico.

45 En otro aspecto del cebado facilitado por lípidos de las respuestas de CTL, pueden utilizarse lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P₃CSS) para cebar CTL cuando se unen covalentemente a un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres, *et al.*, *Nature*, 342:561, 1989). Así, los péptidos de la descripción pueden acoplarse a P₃CSS, por ejemplo, y el lipopéptido administrarse a un individuo para cebar específicamente una respuesta de CTL contra el antígeno diana. Además, debido a que la inducción de anticuerpos neutralizantes también puede ser cebada con epitopos conjugados con P₃CSS, dos de estas composiciones pueden combinarse para ser más eficaces para inducir respuestas humerales y mediadas por células.

50 **Células dendríticas pulsadas con péptidos de CTL y/o HTL**

Un aspecto de una composición de vacuna según la descripción comprende la administración *ex vivo* de un cóctel de péptidos que portan epitopos a PBMC, o DC aisladas a partir de ellos, procedentes de la sangre de un paciente. Puede utilizarse un producto farmacéutico para facilitar la recolección de DC, tal como Progenipietin™ (Monsanto, St. Louis, MO) o GM-CSF/IL-4. Después de pulsar las DC con péptidos y antes de la reinfusión a pacientes, las DC se lavan para eliminar los péptidos no unidos. En este aspecto, una vacuna comprende DC pulsadas con péptidos

que presentan los epitopos de péptidos pulsados en moléculas de HLA sobre su superficie.

Las DC pueden pulsarse *ex vivo* con un cóctel de péptidos, algunos de los cuales estimulan respuestas de CTL contra uno o más antígenos de interés, por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA), tales como HER2/neu, p53, MAGE2, MAGE3 y/o el antígeno carcinoembrionario (CEA). Colectivamente, estos TAA están asociados con cánceres de mama, colon y pulmón. Opcionalmente, un péptido de células T auxiliares (HTL), tal como PADRE®, puede incluirse para facilitar la respuesta de CTL. Así, una vacuna según la invención que comprende epitopos de HER2/neu, p53, MAGE2, MAGE3 y el antígeno carcinoembrionario (CEA) se emplea para tratar una enfermedad mínima o residual en pacientes con malignidades, tales como cáncer de mama, colon, pulmón u ovario; cualquier malignidad que porte cualquiera de estos TAA también puede tratarse con la vacuna. Una vacuna de TAA puede utilizarse después de procedimientos reductores, tales como cirugía, terapia de radiación o quimioterapia, con lo cual la vacuna proporciona el beneficio de aumentar la supervivencia sin enfermedad y la supervivencia global en los receptores.

Así, en aspectos preferidos, una vacuna de la invención es un producto que trata una mayoría de pacientes a través de una serie de tipos de tumores diferentes. Una vacuna que comprende una pluralidad de epitopos, preferiblemente epitopos que portan supermotivos, ofrece esta ventaja.

Administración para fines terapéuticos o profilácticos

Los péptidos de la presente invención, incluyendo sus composiciones, son útiles para la administración a mamíferos, en particular seres humanos, para tratar y/o prevenir una enfermedad. En un aspecto, los péptidos o las composiciones de vacunas de la invención se administran a un paciente que tiene una malignidad asociada con la expresión de uno o más TAA, o a un individuo susceptible, o que se encuentre en riesgo de alguna otra manera, de desarrollar una enfermedad relacionada con TAA. Tras la administración se induce una respuesta inmunológica contra los TAA, potenciando con ello las capacidades de respuesta inmunológica propia del paciente. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones de péptidos a un paciente en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunológica eficaz contra las células que expresan TAA y, así, curar, detener o frenar los síntomas y/o las complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por ejemplo, de la composición concreta administrada, la manera en que se realiza la administración, el estadio y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, el peso y el estado de salud general del paciente, y el criterio del médico encargado.

En ciertos aspectos, se proporciona un método para tratar el cáncer. En algunos casos, el tratamiento del cáncer puede incluir el tratamiento de tumores sólidos o el tratamiento de una metástasis. La metástasis es la forma del cáncer en la que las células transformadas o malignas están viajando y extendiendo el cáncer de un sitio a otro. El cáncer puede ser de colon, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLS"), de mama, ovario, riñón, recto, cabeza y cuello (que incluye, pero no se limita a las cavidades nasal y oral), próstata, páncreas, cáncer de pulmón microcítico, de útero, vejiga, tiroides, piel (que incluye, pero no se limita a melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Karposi, lunares de nevi displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis, y melanoma metastásico), de mama, cerebro, carcinomas cervicales, carcinomas testiculares, etc. Más en concreto, los cánceres pueden incluir, pero no se limitan a los siguientes órganos o sistemas: cardíaco, pulmón, gastrointestinal, tracto genitourinario, hígado, hueso, sistema nervioso, ginecológico, hematológico, piel, y glándulas adrenales. Más en concreto, los métodos de la presente pueden utilizarse para tratar gliomas (schwannoma, glioblastoma, astrocitoma), neuroblastomas, feocromocitomas, paraganliomas, meningiomas, carcinomas adrenocorticales, cáncer de riñón, cáncer vascular de diversos tipos, osteocarcinoma osteoblástico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, leiomiomas uterinos, cáncer de glándulas salivares, carcinoma del plexo coroide, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de colon, y leucemia megacarioblástica.

En aspectos preferidos, el cáncer que va a ser tratado mediante la presente descripción es el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLS"), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de cabeza y/o cuellos, cáncer endometrial, cáncer pancreático y/o cáncer esofágico.

En realizaciones preferidas, el cáncer que va a ser tratado mediante la presente invención es el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLS"), cáncer de mama y/o cáncer de ovario. En ciertas otras realizaciones preferidas, el cáncer es un cáncer de cabeza y/o cuello. La expresión "célula cancerosa", tal como se proporciona en la presente, incluye una célula afectada por uno cualquiera de los trastornos cancerosos proporcionados en la presente, o por cualquier cáncer.

En ciertos aspectos, la presente invención también puede utilizarse para tratar enfermedades asociadas con una mayor supervivencia de células, o la inhibición de la apoptosis, incluyendo cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones P53, y tumores dependientes de hormonas que incluyen, pero no se limitan a cáncer de colon, tumores cardíacos, cáncer pancreático, melanoma, retinoblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer intestinal, cáncer testicular, cáncer de estómago, neuroblastoma, mixoma, mioma, linfoma, endotelioma, osteoblastoma, osteoclastoma, osteosarcoma, condrosarcoma, adenoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario); enfermedades autoinmunitarias (tales como esclerosis múltiple, síndrome

de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar, enfermedad de Behcet, enfermedad de Crohn, polimiositis, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis relacionada con el sistema inmunológico y artritis reumatoide), e infecciones víricas (tales como herpes virus, poxvirus y adenovirus), inflamación, enfermedad del injerto frente al receptor, rechazo de injertos agudo y rechazo de injertos crónico.

5 En cierto aspecto, la invención se utiliza para tratar otras enfermedades o trastornos asociados con una mayor supervivencia celular que incluyen, pero no se limitan al avance y/o la metástasis de malignidades y trastornos relacionados, tales como leucemia (que incluye leucemias agudas (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (que incluye mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica)), policitemia vera, linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no hodgkiniana), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, y tumores sólidos que incluyen, pero no se limitan a sarcomas y carcinomas, tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

Las composiciones de vacunas de la invención pueden utilizarse puramente como agentes profilácticos. En general, la dosificación para una inmunización profiláctica inicial se encuentra generalmente en un intervalo de dosificación unitaria en el que el valor menor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500 o 1000 µg de péptido, y el valor mayor es de aproximadamente 10.000, 20.000, 30.000 o 50.000 µg de péptido. Los valores de dosificación para un ser humano generalmente varían de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 50.000 µg de péptido por 70 kilogramos de paciente. A esto le siguen unas dosificaciones de refuerzo de entre aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 50.000 µg de péptido, administradas a intervalos definidos de aproximadamente cuatro semanas a seis meses después de la administración inicial de la vacuna. La inmunogenicidad de la vacuna puede evaluarse midiendo la actividad específica de CTL y HTL obtenida de una muestra de la sangre del paciente.

Tal como se advirtió anteriormente, los péptidos que comprenden epitopos CTL y/o HTL de la invención inducen respuestas inmunológicas cuando son presentados por moléculas de HLA y se ponen en contacto con un CTL o HTL específico para un epitopo incluido en el péptido. La manera en que el péptido se pone en contacto con el CTL o HTL no es crítica para la descripción. Por ejemplo, el péptido puede ponerse en contacto con el CTL o HTL *in vitro* o *in vivo*. Si el contacto se produce *in vivo*, el péptido puede administrarse directamente, o en otras formas/vehículos, por ejemplo, células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas y similares.

Por consiguiente, para las composiciones farmacéuticas de la invención en forma de péptidos, los péptidos pueden administrarse directamente. Como alternativa, los péptidos pueden administrarse indirectamente presentados sobre APC. Además, los péptidos pueden administrarse de modo individual o como fusiones de una o más secuencias peptídicas.

Para un uso terapéutico, la administración debería comenzar generalmente en el primer diagnóstico de una enfermedad relacionada con TAA. A esto le siguen dosis de refuerzo al menos hasta que los síntomas remitan sustancialmente y durante un periodo después de esto. En los estados de enfermedad crónicos, pueden ser necesarias unas dosis de carga seguidas de dosis de refuerzo.

La dosificación para una inmunización terapéutica inicial generalmente se encuentra en un intervalo de dosificación unitaria en el que el valor menor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500 o 1000 µg de péptido, y el valor mayor es de aproximadamente 10.000, 20.000, 30.000 o 50.000 µg de péptido. Los valores de dosificación para un ser humano generalmente varían de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 50.000 µg de péptido por 70 kilogramos de paciente. Pueden administrarse unas dosificaciones de refuerzo de entre aproximadamente 1,0 µg a aproximadamente 50.000 µg de péptido, administradas según un régimen de refuerzo a lo largo de semanas o meses, dependiendo de la respuesta y estado del paciente. La respuesta del paciente puede determinarse midiendo la actividad específica de CTL y HTL obtenidos de la sangre del paciente.

En ciertos aspectos, los péptidos y las composiciones de la presente invención se emplean en estados de enfermedad graves. En estos casos, como resultado de las cantidades mínimas de sustancias extrañas y la naturaleza relativamente no tóxica de los péptidos, es posible y puede resultar deseable administrar excesos sustanciales de estas composiciones de péptidos con relación a estas cantidades de dosificación mencionadas.

Para el tratamiento de una enfermedad crónica, una dosis representativa está en el intervalo descrito anteriormente, concretamente cuando el valor menor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500 o 1000 µg de péptido, y el valor mayor

es de aproximadamente 10.000, 20.000, 30.000 o 50.000 µg de péptido, preferiblemente de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 50.000 µg de péptido por 70 kilogramos de paciente. Pueden ser necesarias unas dosis iniciales, seguidas de unas dosis de refuerzo a intervalos establecidos, por ejemplo, de cuatro semanas a seis meses, probablemente durante un periodo de tiempo prolongado para inmunizar a un individuo con eficacia. En el caso de una enfermedad crónica, la administración debe continuar hasta que al menos los síntomas clínicos o unos ensayos de laboratorio indiquen que la enfermedad ha sido eliminada o ha remitido sustancialmente, y durante un periodo de seguimiento después de esto. Las dosificaciones, las vías de administración y los programas de dosis se ajustan según las metodologías conocidas en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas para el tratamiento terapéutico están previstas para la administración parenteral, tópica, oral, intratecal o local. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica o intramuscular.

Así, en un aspecto preferido, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden una disolución de los péptidos inmunogénicos disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Puede utilizarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, disolución salina al 0,8%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales conocidas, o pueden ser esterilizadas mediante filtración. Las disoluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables o excipientes farmacéuticos según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc.

La concentración de los péptidos de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, a saber, desde menos de aproximadamente 0,1%, normalmente al 2% o al menos aproximadamente 2%, hasta un valor tan alto como 20% o 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente según los volúmenes de los fluidos, las viscosidades, etc., según la vía de administración concreta seleccionada.

Una forma de dosis unitaria humana de la composición de péptidos generalmente se incluye en una composición farmacéutica que también comprende una dosis unitaria humana de un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso, y se administra en un volumen de fluido conocido por los expertos en la técnica por ser el que se utiliza para la administración de estas composiciones a seres humanos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, A. Gennaro, editor, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1985).

Los péptidos de la invención también pueden administrarse a través de liposomas, que actúan para dirigir los péptidos hasta un tejido concreto, tal como tejido linfóide, o a dirigirlos selectivamente hasta células infectadas, así como para aumentar la semivida de la composición de péptidos. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas laminares y similares. En estas preparaciones, el péptido que se va a administrar se incorpora como parte de un liposoma, solo o junto con una molécula que se une a un receptor extendido entre las células linfoides (tales como anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno CD45), o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. Así, pueden dirigirse liposomas rellenos o decorados con un péptido de la invención deseado hasta el sitio de las células linfoides, en donde los liposomas entregan las composiciones de péptidos. Los liposomas para su uso según la descripción se forman a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que incluyen en general fosfolípidos con carga neutra y negativa y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos en general se orienta considerando, por ejemplo, el tamaño del liposoma, la labilidad frente a ácidos y la estabilidad de los liposomas en la corriente sanguínea. Está disponible una diversidad de métodos para preparar liposomas, tal como se describe, por ejemplo, en Szoka, *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9:467 (1980), y en las patentes de EEUU n.ºs 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028, y 5.019.369.

Para dirigir las composiciones de la invención hasta células del sistema inmunológico puede incorporarse un ligando en el liposoma, por ejemplo, anticuerpos o sus fragmentos específicos de determinantes de la superficie celular de las células del sistema inmunológico deseadas. Una suspensión de liposomas que contienen un péptido pueden administrarse por vía intravenosa, local, tópica, etc., en una dosis que varía según, entre otras cuestiones, la forma de administración, el péptido que se está administrando y el estadio de la enfermedad que se está tratando.

Para composiciones sólidas pueden utilizarse vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Para la administración oral se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes que se emplean normalmente, tales como los vehículos previamente listados, y generalmente del 10-95% del ingrediente activo, es decir, uno o más péptidos de la descripción, a menudo a una concentración del 25%-75%.

Para la administración en aerosol, los péptidos inmunogénicos se suministran preferiblemente en forma finamente dividida, junto con un tensioactivo y un propelente. Los porcentajes típicos de péptidos son del 0,01%-20% en peso,

5 a menudo del 1%-10%. Por supuesto, el tensioactivo debe ser farmacéuticamente aceptable, y preferiblemente soluble en el propelente. Los ejemplos representativos de dichos agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihidroxílico alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir del 0,1%-20% en peso de la composición, preferiblemente del 0,25-5%. El resto de la composición normalmente es propelente, aunque puede utilizarse un atomizador en el que no sea necesario propelente, y los otros porcentajes se ajustan en consecuencia. También puede incluirse un vehículo, por ejemplo, lecitina, para la administración intranasal.

10 Los péptidos antigénicos de la invención también se han empleado para inducir una respuesta de CTL y/o HTL *ex vivo*. Los CTL o HTL resultantes pueden utilizarse para tratar infecciones crónicas o tumores en pacientes que no responden a otras formas convencionales de terapia, o que no responden a una vacuna terapéutica de péptidos o de ácidos nucleicos según la descripción. Las respuestas de CTL o HTL *ex vivo* a un antígeno concreto (infeccioso o asociado a un tumor) son inducidas incubando en cultivo de tejidos las células precursoras de CTL o HTL del paciente u otras que sean genéticamente compatibles, junto con una fuente de células presentadoras de antígenos (APC), tales como células dendríticas, y el péptido inmunogénico apropiado. Después de un tiempo de incubación apropiado (generalmente de aproximadamente 7-28 días), en el que las células precursoras se activan y se expanden en células efectoras, las células se vuelven a infundir al paciente, en donde destruirán (CTL) o facilitarán la destrucción (HTL) de su célula diana específica (una célula infectada o una célula tumoral).

20 **Kits**

25 Las composiciones de péptidos de esta invención pueden proporcionarse en forma de un kit junto con instrucciones para la administración de vacunas. Generalmente, el kit incluirá la composición o composiciones deseadas de la invención en un recipiente, preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, e instrucciones para la administración. Por ejemplo, un kit incluirá una APC, tal como una célula dendrítica, previamente expuesta y que ahora presenta los péptidos de la invención, en un recipiente, preferiblemente en una forma de dosificación unitaria junto con instrucciones para la administración. También pueden incluirse linfoquinas, tales como IL-2 o IL-12, en el kit. Otros componentes del kit que también podría ser deseable incluir son, por ejemplo, una jeringa estéril, dosificaciones de refuerzo, y otros excipientes deseados.

30 La invención se describirá con más detalle mediante ejemplos específicos. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad una diversidad de parámetros no críticos que pueden ser cambiados o modificados para proporcionar aspectos alternativos según la descripción.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de antígenos asociados a tumores

35 Debido a que el supertipo A2 está ampliamente expresado en la población (39-49%), los péptidos que se unen a esta familia de moléculas proporcionan una base razonable para vacunas basadas en péptidos. Aunque la vacuna de A2 se dirige a pacientes que expresan moléculas de HLA-A2, la estrategia puede extenderse con facilidad para incluir péptidos que se unen a otros alelos o sus grupos de supertipo.

40 Las proteínas completas a menudo inducen una respuesta inmunológica limitada a epitopos específicos que pueden ser ineficaces para mediar en respuestas inmunológicas antitumorales eficaces (Disis *et al.*, *J. Immunology*, 156:3151-3158 (1996); Manca *et al.*, *J. Immunology*, 146:1964-1971 (1991)). Una vacuna basada en epitopos evita esta limitación mediante la identificación de epitopos de péptidos incluidos en TAA. En la tabla 1 se indican ejemplos de TAA.

45 Los péptidos se evaluaron basándose en los motivos de unión a MHC, en la capacidad para unirse a moléculas de MHC, y en la capacidad para activar CTL reactivos a tumores *in vitro* utilizando cultivos de linfocitos procedentes de individuos normales. Esta estrategia tiene varias ventajas. En primer lugar, no requiere el aislamiento de células derivadas del paciente, tales como CTL o células tumorales. En segundo lugar, la identificación de epitopos que estimulan CTL en individuos normales permite la identificación de una amplia gama de epitopos, que incluyen epitopos subdominantes y también dominantes.

50 Cuatro antígenos asociados a tumores, CEA, p53, MAGE 2/3 y HER2/neu, son expresados en diversos tipos de tumores (Kawashima *et al.*, *Human Immunology*, 59:1-14 (1998); Tomlinson, *et al.*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 32(3) (6 de julio, 1998)). En un aspecto preferido, una vacuna comprende epitopos (como uno o más péptidos o los ácidos nucleicos que los codifican) entre estos cuatro TAA. Por consiguiente, esta vacuna induce respuestas de CTL contra varios tipos de cánceres importantes.

55 El antígeno carcinoembrionario es una glicoproteína segregada y de la superficie celular de 180 kD sobreexpresada en la mayoría de los adenocarcinomas humanos. Estos incluyen de colon, rectal, pancreático y gástrico (Muraro, 1985), así como en 50% de mama (Steward, 1974) y en 70% de carcinomas de pulmón no microcíticos (Vincent, 1978). Este antígeno también se expresa en el epitelio normal y en algunos tejidos fetales (Thompson, 1991).

El antígeno HER2/neu (185 kDa) es una glicoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa cuya estructura es similar al receptor del factor del crecimiento epidérmico (Coussens, 1985; Bargmann, 1986; Yamamoto, 1986). Se ha indicado la amplificación del gen HER2/neu y/o la sobreexpresión de la proteína asociada en muchos adenocarcinomas humanos de mama (Slamon, 1987 y 1989; Borg, 1990), ovario (Slamon, 1989), útero (Berchuck, 1991; Lukes, 1994), próstata (Kuhn, 1993; Sadasivan, 1993), estómago (Yonemura, 1991; Kameda, 1990; Houldsworth, 1990), esófago (Houldsworth, 1990), páncreas (Yamanaka, 1993), riñón (Weidner, 1990) y pulmón (Kern, 1990; Rachwal, 1995).

Los MAGE, genes del antígeno de melanoma, son una familia de proteínas relacionadas que fueron descritas en primer lugar en 1991. Van der Bruggen *et al.* fueron capaces de identificar el gen MAGE después de aislar CTL de un paciente que mostró una regresión del tumor espontánea. Estos CTL reconocen líneas de células de melanoma, así como líneas tumorales procedentes de otros pacientes que expresan el mismo gen restringido por HLA-A 1 (van der Bruggen, 1991; De Plaen, 1994). Los genes MAGE son expresados en melanomas metastásicos (Brasseur, 1995), carcinomas de pulmón no microcíticos (Weynants, 1994), gástrico (Inoue, 1995), hepatocelular (Chen, 1999), renal (Yamanaka, 1998), colorrectal (Mori, 1996), y esofágico (Quillien, 1997), así como tumores de la cabeza y el cuello (Lee, 1996), ovarios (Gillespie, 1998; Yamada, 1995), vejiga (Chaux, 1998) y hueso (Sudo, 1997). También son expresados en tejido normal, de forma específica en la placenta y las células germinales masculinas (De Plaen, 1994). Sin embargo, estas células normales no expresan moléculas de MHC de clase I y, por tanto, no presentan péptidos de MAGE sobre su superficie.

En este estudio y en trabajos previos para identificar epitopos de la superfamilia A2 (Kawashima, 1998), se consideraron MAGE-2 y MAGE-3 como un único TAA, basándose en los patrones de expresión y las secuencias de aminoácidos primarias predichas de los dos genes. Estos dos miembros de la familia MAGE parecen estar regulados coordinadamente (Zakut, 1993), dando como resultado una distribución en cánceres que parece ser muy similar, sino idéntica. Por tanto, las respuestas inmunológicas dirigidas a cualquiera de los antígenos deberían proporcionar cobertura para el tratamiento de los cánceres que se espera que expresen estos TAA. Las proteínas de MAGE-2 y MAGE-3 son 84% idénticas al nivel de aminoácidos primario. Como resultado, algunos epitopos son idénticos en los dos antígenos, mientras que otros son exclusivos de uno o del otro. Debe advertirse que se han indicado dos subtipos de MAGE-2, denominados "a" y "b" (Zakut, 1993). El gen denominado en la presente MAGE-2 se corresponde con el subtipo MAGE-2a (C. Dahlberg comunicación personal, NB 1056, p.16; Van der Bruggen, 1991; Zakut, 1993).

El cuarto TAA seleccionado para su uso en la vacuna es p53. En células normales, el gen p53 induce una detención del ciclo celular que permite comprobar el ADN para determinar irregularidades y mantiene la integridad del ADN (Kuerbitz, 1992). La mutaciones en el gen abolen su función supresora y permite que las células transformadas escapen de la restricción del crecimiento controlado. Al mismo tiempo, estas mutaciones conducen a la sobreexpresión de p53 de tipo salvaje y mutado (Levine, 1991), lo cual hace que sea más probable que los epitopos dentro de la proteína puedan ser reconocidos por el sistema inmunológico. Las mutaciones más comunes se dan en las posiciones 175, 248, 273 y 282, y se han observado en cánceres de colon (Rodrigues, 1990), pulmón (Fujino, 1995), próstata (Eastham, 1995), vejiga (Vet, 1995) y hueso (Abudu, 1999; Hung, 1997).

La siguiente tabla 5 delinea la expresión de antígenos tumorales en mama, colon y pulmón. Estableciendo como diana los cuatro TAA se disminuye la probabilidad de mutación de las células tumorales (escape del tumor) mediante su transformación en células que no expresan ninguno de los antígenos tumorales. Preferiblemente, la inclusión de dos o más epitopos de cada TAA sirve para aumentar la probabilidad de que individuos de diferentes etnias respondan a la vacuna y proporciona una cobertura de población más amplia.

Esta estrategia lógica para composiciones de vacunas puede centrarse en un alelo de HLA concreto, o extenderse a diversas moléculas o supertipos de HLA para extender aún más la cobertura de población.

La tabla 6 muestra la incidencia, tasas de supervivencia a los 5 años y el número calculado de muertes anuales para estos tumores en EEUU para cada tipo de cáncer de la tabla 5. En términos de nuevos casos calculados, muertes calculadas y tasas de supervivencia a los 5 años, cada uno de estos tipos de tumores presenta necesidades no cubiertas. Globalmente, la incidencia de estos tumores es significativamente mayor.

Ejemplo 2: Una molécula PADRE® como epitopo auxiliar para la potenciación de la inducción de CTL

Existen cada vez más pruebas de que la actividad HTL es crítica para la inducción de unas respuestas de CTL de larga duración (Livingston *et al.*, *J. Immunol.*, 162:3088-3095 (1999); Walter *et al.*, *New Engl J. Med.*, 333:1038-1044 (1995); Hu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 177:1681-1690 (1993)). Por tanto, pueden utilizarse uno o más péptidos que se unen a moléculas de HLA de clase II y estimulan HTL según la descripción. Por consiguiente, una realización preferida de una vacuna incluye una molécula de la familia de epitopos de células T auxiliares (HTL) universal PADRE® que se dirige a la mayoría de las moléculas DR de una manera diseñada para estimular a las células T auxiliares. Por ejemplo, un péptido de epitopo de unión a pan-DR que tiene la fórmula aKXVAAZTLKAAa, en la que "X" es ciclohexilalanina, fenilalanina o tirosina; "Z" es triptófano, tirosina, histidina o asparagina; y "a" es D-alanina o L-alanina (SEQ ID NO:29) ha demostrado unirse a la mayoría de los alelos HLA-DR y estimular la respuesta de linfocitos T auxiliares de la mayoría de individuos, independientemente de su tipo de HLA.

Una molécula PADRE® particularmente preferida es un péptido sintético, aKXVAAWTLKAAA (a = D-alanina, X = ciclohexilalanina), que contiene restos aminoácidos no naturales, modificada de modo específico para maximizar la capacidad de unión a HLA-DR y la inducción de respuestas inmunológicas de células T.

5 Otras moléculas PADRE® preferidas son los péptidos aKFVAAWTLKAAA, aKYVAAWTLKAAA, aKFVAAWTLKAAA, aKXVAAWTLKAAA, aKYVAAWTLKAAA, aKFVAAWTLKAAA, aKXVAAWTLKAAA, aKYVAAWTLKAAA, aKFVAAWTLKAAA, aKXVAAWTLKAAA, aKYVAAWTLKAAA, aKFVAAWTLKAAA, aKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:30), aKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:31), aKYVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:32), aKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:33), aKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:34), aKYVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:35), aKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:36), aKXVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:37), aKYVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:38), aKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:39), aKXVAAWTLKAAA (SEQ ED NO:40), aKYVAAWTLKAAA (SEQ ID NO:41) (a = D-alanina, X = ciclohexilalanina).

10 En una realización preferida en la presente, el péptido PADRE® está amidado. Por ejemplo, una realización amidada particularmente preferida es una molécula PADRE® que se escribe, de modo convencional, aKXVAAWTLKAAA-NH₂.

15 Los ensayos de inhibición competitiva con moléculas de HLA-DR purificadas han demostrado que la molécula PADRE® aKXVAAWTLKAAA-NH₂ se une con una afinidad alta o intermedia (CI₅₀ ≤ 1.000 nM) a 15 de 16 de las moléculas de HLA-DR más prevalentes (Kawashima *et al.*, *Human Immunology*, 59:1-14 (1998); Alexander *et al.*, *Immunology*, 1:751-761 (1994)). A partir de una comparación de la capacidad de unión a DR de PADRE® y el péptido del toxoide del tétanos (TT) 830-843, se ha publicado un epítipo "universal" (Panina-Bordignon *et al.*, *Eur. J. Immunology*, 19:2237-2242 (1989)). El péptido TT 830-843 se une a solo siete de las 16 moléculas de DR

20 ensayadas, mientras que PADRE® se une a 15 de 16. Se predice que al menos 1 de las 15 moléculas de DR que se unen a PADRE® estará presente en >95% de todos los seres humanos. Por tanto, se anticipa que esta molécula PADRE® induce una respuesta de HTL en casi todos los pacientes, a pesar del extenso polimorfismo de las moléculas de HLA-DR en la población humana.

25 Datos tempranos de un ensayo de fase I/II patrocinado por los investigadores, realizado en the University of Leiden (C.J.M. Melief) apoyan el principio de que la molécula PADRE® aKXVAAWTLKAAA, y probablemente aKXVAAWTLKAAA-NH₂ amidada, es muy inmunogénica en seres humanos (Ressing *et al.*, *J. Immunother.*, 23(2):255-266 (2000)). En este ensayo, una molécula PADRE® se coemulsionó con diversos epítipos de CTL derivados de diversos virus del papiloma humano (HPV) y se inyectó en pacientes con carcinoma cervical recurrente o residual. Sin embargo, debido al estadio tardío del carcinoma en los pacientes del estudio, se espera que estos

30 pacientes estén inmunocomprometidos. El estado inmunocomprometido de los pacientes se demostró por su baja frecuencia de CTL específicos del virus de la gripe, unos niveles reducidos de expresión de CD3, y una baja incidencia de respuestas de memoria proliferativas después de la estimulación *in vitro* con antígenos convencionales.

35 Así, no se anticipa que se logre una eficacia en el ensayo de the University of Leiden, y más bien el objetivo de este ensayo fundamentalmente es evaluar la seguridad. De hecho, la seguridad fue demostrada.

40 Así, el componente o componentes del péptido PADRE® de la vacuna se une con amplia especificidad a múltiples formas alélicas de moléculas de HLA-DR. Además, el componente o componentes del péptido PADRE® se une con alta afinidad (CI₅₀ ≤ 1000 nM), es decir, a un nivel de afinidad que se correlaciona con ser inmunogénico para las células T restringidas por HLA de clase II. La administración *in vivo* de un péptido o péptidos PADRE® estimula la proliferación de HTL en seres humanos normales, así como en poblaciones de pacientes.

Pueden incluirse uno o más péptidos PADRE®, en un composición, por ejemplo, una vacuna, que comprende uno o más péptidos, como un péptido o péptidos individuales, condensados con uno o más péptidos de CTL (epítipo y/o análogo), o ambos.

Ejemplo 3: Competencia funcional de DC derivadas con ProGP

45 Un aspecto de una vacuna según la descripción comprende péptidos que portan epítipos de la invención administrados a través de células dendríticas (DC). Por consiguiente, se evaluaron DC en ensayos de función inmunológica *in vitro* e *in vivo*. Estos ensayos incluyen la estimulación de hibridomas de CTL y líneas de células CTL, y la activación *in vivo* de CTL.

Purificación de DC

50 Se purificaron DC movilizadas por ProGP a partir de sangre periférica (PB, "peripheral blood") y bazo de ratones C57Bl/6 tratados con ProGP para evaluar su capacidad para presentar antígenos y para inducir respuestas inmunológicas celulares. Brevemente, se purificaron DC a partir de WBC totales y bazo utilizando una estrategia de selección positiva que emplea esferas magnéticas revestidas con un anticuerpo específico de CD11c (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Para una comparación, se generaron DC expandidas *ex vivo* cultivando células de médula ósea procedentes de ratones C57Bl/6 no tratados con el cóctel convencional de GM-CSF e IL-4 (R&D Systems, Mineápolis, MN) durante un periodo de 7-8 días (Mayordomo *et al.*, *Nature Med.*, 1:1297-1302 (1995)). Estudios

recientes han revelado que esta población de DC expandidas *ex vivo* contiene células presentadoras de antígenos eficaces, con la capacidad para estimular respuestas inmunológicas antitumorales (Celluzzi *et al.*, *J. Exp. Med.*, 83:283-287 (1996)).

5 Se determinaron las purezas de DC derivadas con ProGP (100 µg/día, 10 días, SC) y DC expandidas *ex vivo* con GM-CSF/IL-4 mediante citometría de flujo. Las poblaciones de DC se definen como las células que expresan CD11c y moléculas de MHC de clase II. Después de la purificación de las DC de microesferas CD11c magnéticas, el porcentaje de DC derivadas con PB doble positivo, aisladas a partir de ratones tratados con ProGP, estaba enriquecido desde aproximadamente 4% hasta un intervalo de 48-57% (rendimiento medio = $4,5 \times 10^6$ DC/animal). El porcentaje de DC esplénicas purificadas aisladas a partir de ratones tratados con ProGP estaba enriquecido desde un intervalo de 12-17% hasta un intervalo de 67-77%. La pureza de las DC expandidas *ex vivo* con GM-CSF/IL-4 fue del 31-41% (Wong *et al.*, *J. Immunother.*, 21:32040 (1998)).

Estimulación *in vitro* de hibridomas de CTL y líneas celulares de CTL: presentación de epitopos de CTL específicos

15 Se demostró *in vitro* la capacidad de DC generadas con ProGP para estimular una línea celular de CTL utilizando un epitopo procedente de virus y una correspondiente línea de células CTL que responde al epitopo. Se trataron ratones transgénicos que expresan HLA-A2.1 humano con ProGP. Las DC esplénicas aisladas de estos ratones se pulsaron con un epitopo de péptido derivado del virus de la hepatitis B (HBV Pol 455) y después se incubaron con una línea de células CTL que responde al complejo de epitopo HBV Pol 455/HLA-A2.1 produciendo IFN γ . La capacidad de las DC esplénicas derivadas con ProGP para presentar el epitopo HBV Pol 455 fue mayor que las dos poblaciones de control positivo: cultivos de DC expandidos con GM-CSF e IL-4, o células B esplénicas purificadas. El desplazamiento a la izquierda en la curva de respuesta para las células esplénicas derivadas con ProGP frente a las otras células presentadoras de antígenos revela que estas células derivadas con ProGP requieren menos epitopos para estimular la liberación máxima de IFN γ por la línea de células respondedoras.

Ejemplo 4: Las DC derivadas con ProGP pulsadas con péptidos estimulan respuestas de CTL *in vivo*

25 También se evaluó la capacidad de DC pulsadas con péptidos *ex vivo* para estimular respuestas de CTL utilizando el modelo de ratón transgénico HLA-A2.1. DC derivadas de animales tratados con ProGP o DC control derivadas de células de médula ósea después de una expansión con GM-CSF e L-4 se pulsaron *ex vivo* con el epitopo de CTL HBV Pol 455, se lavaron y se inyectaron (IV) en estos ratones. A los siete días después de la inmunización, los bazo se retiraron y los esplenocitos que contienen DC y CTL se reestimularon dos veces *in vitro* en presencia del péptido de HBV Pol 455. Se evaluó la actividad CTL de tres cultivos independientes de células esplénicas reestimuladas midiendo la capacidad de los CTL para lisar células diana marcadas con ^{51}Cr pulsadas con o sin péptido. Se generaron respuestas de CTL vigorosas en los animales inmunizados con las DC derivadas con ProGP pulsadas con epitopos, así como las DC GM-CSF/IL-4 pulsadas con epitopos (figura 1). Por contraste, los animales que se inmunizaron con DC generadas con ProGP pulsadas de modo simulado (sin péptido) no mostraron pruebas de inducción de CTL. Estos datos confirman que las DC derivadas de ratones tratados con ProGP pueden pulsarse *ex vivo* con epitopos y utilizarse para inducir respuestas de CTL específicos *in vivo*. Así, estos datos apoyan el principio de que las DC derivadas con ProGP estimulan respuestas de CTL en un modelo que manifiesta moléculas de MHC de clase I humanas.

Los estudios farmacológicos *in vivo* en ratones no han demostrado una toxicidad aparente de la reinfusión de DC autólogas pulsadas en los animales.

Ejemplo 5: Aislamiento, pulsado, ensayo y administración de células dendríticas

45 En la presente se indica un procedimiento preferido en la presente para la vacunación. Brevemente, se tratan pacientes con ProGP para expandir y movilizar DC hacia la circulación. En el día del máximo de movilización de DC, determinado según procedimientos conocidos en la técnica, los pacientes se someten a una leucaféresis (aproximadamente 15 l de proceso, quizás repetido una vez si se necesita para recolectar suficientes células mononucleares). El producto de las células mononucleares se mezcla con los péptidos de la descripción mediante una inyección a través de filtros de microporos (este protocolo de mezcla no se necesita si se emplean péptidos estériles). Después de una incubación y un lavado para retirar los péptidos no unidos residuales, el aspecto de vacuna del producto celular se resuspende en una disolución crioprotectora (DMSO al 10% final) y, para los protocolos que implican múltiples refuerzos de vacunación, se dividen en partes alícuotas. El producto o productos de células mononucleares pulsadas se congela y se conserva según procedimientos aceptados para células precursoras hematopoyéticas.

50 La vacunación se realiza mediante inyección o infusión intravenosa del producto celular descongelado después de que se hayan disipado los efectos hematológicos de ProGP en el paciente (es decir, el hemograma ha vuelto a la línea de base). La figura 2 proporciona un diagrama de flujo del pulsado *ex vivo* de DC con péptidos, el lavado de DC, el ensayo de DC, y la criopreservación. En los siguientes ejemplos se proporciona una descripción más detallada del proceso.

Ejemplo 6: Administración de ProGP y recolección de células mononucleares mediante leucaféresis

Los pacientes se tratan con ProGP a diario mediante una inyección subcutánea (la dosis y el programa se determina según procedimientos médicos convencionales). En la tarde antes de la leucaféresis, los pacientes son evaluados por un médico o enfermero/técnico de aféresis para determinar la idoneidad de un acceso intravenoso para catéteres de aféresis de gran calibre. Si se considera que un acceso venoso periférico no es adecuado para mantener un flujo sanguíneo rápido para la aféresis, entonces el personal médico/quirúrgico apropiado puede insertar catéteres en venas centrales (sitios inguinales, subclavianos o yugulares internos). En el día del máximo de movilización de DC predicho se realiza una leucaféresis (aproximadamente 3 volúmenes de sangre o 15 l), por ejemplo, en un Cobe Spectra o Fenwal CS3000 (caudal ≥ 35 ml/min) para obtener células mononucleares. Se calcula el número de DC en el producto de la leucaféresis mediante recuento por citometría de flujo de las células mononucleares que poseen los inmunofenotipos lin-/HLA-DR+/CD11c+ y lin-/HLA-DR+/CD123+ en una muestra de 1 ml extraída de modo aséptico del producto de la aféresis. Se cuenta el número de granulocitos y linfocitos en el producto de la leucaféresis mediante citometría automática (CBC/diferencial). La CBC/diferencial se realiza inmediatamente después del procedimiento de leucaféresis y cada día alterno durante diez días para controlar la resolución de los efectos hematológicos del tratamiento de hematopoyetina y la aféresis.

15 **Ejemplo 7: Un procedimiento para el pulsado de células dendríticas**

Se retira plasma del producto de la leucaféresis mediante centrifugación y expresión del sobrenadante. Las células del sedimento de centrifugación se resuspenden en medio OptiMEM con albúmina de suero humana (HSA) al 1% a una densidad celular de 10^7 DC/ml en hasta 100 ml.

20 El péptido o péptidos de la descripción, preferiblemente como formulaciones de péptidos A2 estériles individuales, se administran directamente en la bolsa del cultivo de DC a través de un puerto de inyección utilizando una técnica aséptica. Después de mezclar, por ejemplo, comprimiendo e invirtiendo la bolsa varias veces, la suspensión celular se incuba durante cuatro horas a temperatura ambiente.

25 La disolución crioconservante se prepara disolviendo 50 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) de calidad farmacéutica en 200 ml de Plasmalyte®. Después del periodo de pulsado, la suspensión celular se lava mediante centrifugación y resuspensión en un volumen igual de disolución salina tamponada con fosfato. El procedimiento de lavado se repite un número definido de veces, por ejemplo, hasta que los estudios validen que los péptidos han sido retirados. Se retiran muestras de un mililitro cada una para en el ensayo de la viabilidad y el ensayo microbiológico. Las células después se preparan para la congelación mediante centrifugación y resuspensión en un volumen igual de disolución crioconservante (DMSO al 10% final). La suspensión celular en crioconservante después se divide en seis partes alícuotas iguales, se traslada a bolsas de congelación de 50 ml (Fenwal) y se congela a una velocidad controlada de 1 °C/min para su conservación en nitrógeno líquido hasta que se necesite para el procedimiento de vacunación.

Ensayo para evaluar el procedimiento de pulsado

35 Se emplean células presentadoras de antígenos, células T estimuladas a largo plazo correspondientes a los péptidos de la invención, o hibridomas de células T, para determinar el procedimiento óptimo para incubar los reactivos de péptidos de una vacuna con células humanas. Se realizan estudios de pulsado utilizando una o más de las siguientes fuentes de células: DC purificadas de ratones transgénicos HLA-A2.1 tratados con ProGP; líneas de células tumorales humanas que expresan HLA-A2; células mononucleares de sangre periférica de voluntarios humanos normales; células mononucleares de sangre periférica de pacientes tratados con ProGP; y/o DC obtenidas de voluntarios HLA-A2 humanos normales después del cultivo *ex vivo* de sus células mononucleares de sangre periférica con GM-CSF e IL-4.

Las condiciones evaluadas incluyen, por ejemplo:

- Procedimiento de aislamiento celular y número de células
- Concentración de los péptidos de vacuna
- Condiciones de lavado para eliminar reactivos auxiliares
- 45 - Manipulaciones tras el pulsado (resuspensión, congelación)

Por consiguiente, estos estudios demuestran la capacidad del procedimiento para producir complejos de HLA-A2/péptido funcionales sobre la superficie de las células humanas. La validación del procedimiento de pulsado se establece utilizando líneas de células T específicas de HLA-A2.1, tras lo cual se realiza el ensayo clínico de fase I.

Ejemplo 8: Validación de la retirada de los péptidos del producto de DC

50 Tras pulsar con los reactivos de péptidos, las DC del paciente se lavan varias veces para eliminar el exceso de péptido antes de infundir las células de nuevo al paciente. En este aspecto de una vacuna de la invención, el procedimiento de lavado elimina los péptidos no unidos. Por consiguiente, no existe exposición sistémica, o esta es insignificante, del paciente a los péptidos. Otras vacunas de la invención implican la administración directa de los péptidos de la invención a un paciente, la administración de un polipéptido multiepitópico que comprende uno o más

péptidos de la invención, la administración de los péptidos en forma de los ácidos nucleicos que los codifican, por ejemplo, mediante el uso de construcciones de minigenes, o mediante vectores víricos.

Ensayo para péptidos de vacuna en el tampón de lavado de células dendríticas

5 Después de que las DC se incuben con los péptidos, las células se lavan con múltiples volúmenes de tampón de lavado. Una parte alícuota del último lavado se coloca sobre un cartucho de extracción en fase sólida no polar y se lava para reducir el contenido en sales de la muestra. Cualquier péptido contenido en el tampón será eluido del cartucho de extracción y se evapora hasta la sequedad. La muestra después se reconstituye en la fase móvil de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se inyecta sobre una columna de HPLC en fase inversa con una base de polímero, y se eluye utilizando una cromatografía de gradiente de elución en fase inversa. Se detectan los péptidos residuales utilizando un montaje de espectrómetro de masas para controlar los iones moleculares protonados de cada péptido a medida que eluyen de la columna de HPLC. Los péptidos se cuantifican comparando la proporción de área de respuesta del analito y el patrón interno con la obtenida para los patrones en una curva de calibración.

Ejemplo 9: Validación de la eliminación del ácido trifluoroacético del producto de DC

15 En un aspecto concreto, los reactivos de péptidos pueden formularse utilizando ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. El procedimiento de lavado desarrollado para retirar el péptido residual también elimina el TFA residual.

Ejemplo 10: Ensayo de liberación de células dendríticas

Identidad

20 Se calcula el número de DC en el producto de la leucaféresis mediante un recuento por citometría de flujo de las células mononucleares que poseen los inmunofenotipos $lin^-/HLA-DR^+/CD11c^+$ y $lin^-/HLA-DR^+/CD123^+$ en una muestra de 1 ml extraída de modo aséptico del producto de la aféresis. Las células lin^- excluyen monocitos, linfocitos T, linfocitos B y granulocitos, mediante la utilización de un cóctel de anticuerpos contra los marcadores de linaje CD3, CD14, DC16, CD19, CD20, CD56.

Viabilidad de las células

25 Se evalúa la viabilidad de las células mononucleares después del pulsado y lavado, antes de la suspensión en crioconservante, mediante exclusión de tinte de azul de tripano. En general, si el producto celular contiene más del 50% de células positivas a azul de tripano, el producto no se administra a un paciente.

Ensayos microbiológicos

30 La suspensión celular en el crioconservante se examina para la contaminación microbiana mediante tinción Gram y sensibilidad/cultivo bacteriano y fúngico clínico habitual. Si los ensayos son positivos para la contaminación bacteriana o fúngica, una evidencia implícita de contaminación significativa, el producto no se infunde. Por ejemplo, si una tinción Gram es negativa, el producto puede infundirse para la primera vacunación mientras se esperan los resultados de sensibilidad/cultivo. Se instituye una terapia con antibióticos basada en los resultados del cultivo según el criterio del médico encargado si el presente muestra señales de infección apropiadas que podrían ser clínicamente atribuibles al contaminante infundido.

Ejemplo 11: Vacunación de pacientes

40 En un aspecto preferido, una parte alícuota del producto de células dendríticas pulsadas congelado se retira de la nevera de nitrógeno líquido y se mantiene congelada en un recipiente aislado que contiene nitrógeno líquido durante el transporte hasta el sitio de infusión. El producto se descongela mediante inmersión con agitación suave en un baño de agua a 37 °C. Inmediatamente después de la descongelación, la suspensión celular se infunde a través de una línea intravenosa mediante gravedad o mediante una bomba de jeringa. Como alternativa, la vacuna se administra mediante inyección, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular. Se controlan las señales vitales del paciente antes de la infusión/inyección y a intervalos de 5 minutos durante una infusión, después a intervalos de 15 minutos durante 1 hora después de la infusión/inyección.

45 Se realizan los protocolos de infusión según los conocimientos de la técnica para otros aspectos de vacunas de la invención, tales como la infusión directa de péptidos o la administración de ácidos nucleicos.

Ejemplo 12: Identificación de péptidos que portan el motivo/supermotivo A2

50 Se seleccionaron nueve epitopos de CTL derivados de antígenos tumorales bien caracterizados (MAGE-2/3, HER-2/neu, p53 y CEA) para la presente vacuna utilizando un proceso en tres etapas: 1) análisis de motivos por ordenador de la secuencia primaria de la proteína para identificar los péptidos que contienen motivos que, así, tendrán una alta probabilidad de unirse a moléculas de supertipo HLA-A2; 2) medición directa de la afinidad de unión a MHC de los péptidos que contienen motivos a alelos de supertipo A2; y 3) ensayo de la inmunogenicidad de los péptidos de unión a MHC de alta afinidad para la inducción de CTL. Además de identificar epitopos de la secuencia

nativa, se diseñaron análogos de epitopos modificados para proporcionar una mayor inmunogenicidad. Los análogos se generaron sustituyendo restos aminoácidos clave que potencian la afinidad de unión a MHC o la interacción con receptores de células T (TCR).

5 El producto de vacuna final, EP-2101, es un agrupamiento de los nueve epitopos de CTL asociados a tumores (secuencias naturales y de análogos) y un epitopo universal PADRE®, administrado a pacientes con cáncer como una emulsión en el adyuvante Montanide® ISA 51. La vacuna es similar a las vacunas de péptidos sintéticos (que contienen uno o más péptidos) que han sido ensayadas por otros investigadores en pacientes con cáncer, en los que se ha descrito la inducción de CTL, unas respuestas clínicas positivas y la seguridad de la vacuna (Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:31-44 (1991); Salgaller, M.L., *et al.*, *Cancer Res.*, 56:4149-4757 (1996); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000)). Todos los epitopos EP-2101 son inmunogénicos, empleando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos positivos a HLA-A2.1 y como ensayo de inducción primaria *in vitro*, para inducir CTL que responden al péptido y a líneas celulares tumorales que expresan TAA y presentes en el epitopo de tipo salvaje (Keogh, E., *et al.*, *J. Immunol.*, 167:181-196 (2001); Kawashima, I., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 59:1-14 (1998)). Se ha demostrado que estos epitopos son inmunogénicos cuando se ensayan en un modelo de ratón transgénico HLA-A2.1/K^b utilizado para determinar la inmunogenicidad de los epitopos humanos restringidos por HLA-A2.1 (Wentworth, P.A., *et al.*, *Eur. J Immunol.*, 26:91-101 (1996); Vitiello, A., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 177:1007-1015 (1991); Lustgarten, J., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 52:109-118 (1997)).

Secuencias de epitopos nativos

20 Se realizó una búsqueda por ordenador de algoritmos y motivos sobre las secuencias de aminoácidos primarias de CEA, MAGE-2/3, HER-2/neu y p53 para predecir los péptidos que sea más probable que se unan a las moléculas de MHC de los cinco alelos de la familia del supertipo HLA-A2 (tablas 4D y 6) (Sette, A. y J. Sidney, *Immunogenetics*, 50:201-212 (1999)). Después se sintetizaron péptidos positivos a algoritmo y motivo y se ensayaron para la unión a HLA-A2.1 purificada, la molécula que se expresa con más frecuencia en seres humanos, así como otras moléculas de MHC de la familia del supertipo HLA-A2.

30 En la etapa final del proceso de búsqueda de epitopos, los péptidos con una alta unión a MHC de reactividad cruzada con los receptores de la familia del supertipo HLA-A2 se ensayaron para la inmunogenicidad. El ensayo es un sistema de inducción de CTL primarios *in vitro*, en el que PBMC CD8⁺ procedentes de sujetos normales se estimulan *in vitro*, inicialmente con células dendríticas cargadas con péptido (PBMC adherentes expandidas en GM-CSF e IL-4), seguido de dos ciclos semanales de reestimulación con el péptido (Keogh, E., *et al.*, *J. Immunol.*, 167:181-196 (2001); Kawashima, I., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 59:1-14 (1998)). Después de la expansión de las células precursoras no expuestas, se determinó la actividad CTL en presencia de células diana positivas a HLA-A2.1 y péptido de tipo salvaje, utilizando la citotoxicidad (ensayo de liberación de ⁵¹Cr) o la producción de gamma-interferón (IFN-γ) (ELISA) como lectura de salida. Los péptidos inmunogénicos que inducen CTL después se ensayaron para las respuestas contra el epitopo procesado en la naturaleza expresado sobre líneas de células tumorales. Los epitopos que inducen CTL reactivos a tumores se consideraron candidatos a vacunas.

Análogos de anclaje fijado

40 Para romper la tolerancia y mejorar la inducción de CTL contra epitopos débilmente inmunogénicos, se modificaron péptidos asociados a tumores con baja actividad de unión a MHC para potenciar su unión sustituyendo los restos de anclaje de interacción con MHC subóptimos por restos asociados a motivos óptimos (Kawashima, I., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 59:1-14 (1998); Parkhurst, M.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 157:2539-2548 (1996)). Esta estrategia de restos de anclaje "fijados" se ha descrito para una serie de epitopos de tumores y enfermedades infecciosas, y estos análogos han demostrado una inmunogenicidad *in vivo* potenciada, comparados con el epitopo de tipo salvaje (Kawashima, I., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 52:1-14 (1998); Vierboom, M.P., *et al.*, *J. Immunother.*, 27:399-408 (1998)), un descubrimiento que se correlaciona con una mayor unión a MHC (Parkhurst, M.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 157:2539-2548 (1996)). La importancia para enfermedades de los análogos de anclaje fijado ha sido demostrada por su capacidad para inducir, no solo respuestas de CTL más potentes, sino también la producción de CTL que presentan reacción cruzada contra el epitopo de tipo salvaje nativo expresado sobre células tumorales (Kawashima, I., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 59:1-14 (1998); Vierboom, M.P., *et al.*, *J. Immunother.*, 27:399-408 (1998); Sarobe, P., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 102:1239-1248 (1998)). De manera más importante, se ha observado una significativa regresión del tumor en pacientes con melanoma inmunizados con un epitopo de anclaje fijado junto con una terapia con IL-2 (Rosenberg, S.A., *et al.*, *Nat. Med.*, 4:321-321 (1998)).

Análogos heteroclínicos

55 También se empleó una segunda estrategia para generar análogos con mayor potencia para la inducción de CTL. Se introdujeron sustituciones de aminoácidos que afectan a un resto o restos de contacto con TCR, en epitopos de CTL conocidos, puesto que se ha demostrado que estos análogos inducen respuestas más potentes que el epitopo de tipo salvaje (Zaremba, S., *et al.*, *Cancer Res.*, 57:4570-4577 (1997); Zugel, U.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 161:1105-1109 (1998); Rivoltini, L.P., *et al.*, *Cancer Res.*, 59:301-306 (1999); Slansky, J.E., *et al.*, *Immunity*, 73:529-538 (2000)). La respuesta de células T estimulada por los análogos heteroclínicos, comparada con el epitopo de tipo

salvaje, se manifiesta como un aumento en la magnitud de respuesta, así como en una potenciación de la avidéz de los TCR (Zugel, U.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 161:1105-1109 (1998); Rivoltini, L.P., *et al.*, *Cancer Res.*, 59:301-306 (1999); Slansky, J.E., *et al.*, *Immunity*, 73:529-538 (2000); Tangri, S., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 194:833-846 (2001)), y se piensa que esto último sería un mecanismo potencial para la heteroclicidad (Slansky, J.E., *et al.*, *Immunity*, 73:529-538 (2000)).

Los análogos heteroclíticos son potencialmente importantes en las vacunas del cáncer no solo por su capacidad para inducir respuestas potentes de células T, sino también por su capacidad para romper la tolerancia de las células T. Estas propiedades han sido demostradas en ensayos con animales y también con seres humanos (Zugel, U.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 161:1105-1109 (1998); Slansky, J.E., *et al.*, *Immunity*, 73:529-538 (2000); Fong, L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:8809-8814 (2001)). En seres humanos, se han indicado unas respuestas antitumorales significativas en un ensayo recientemente presentado que estudia el tratamiento del cáncer de colon y pacientes NSCLC con DC cargadas con un análogo heteroclítico de un epitopo de CEA, llamado CAP1-6D (denominado en la presente CEA.605D6, péptido 1350.01), que inicialmente fue descrito por Zaremba *et al.* (Zaremba, S., *et al.*, *Cancer Res.*, 57:4570-4577 (1997)). En este estudio clínico (Fong, L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8809-8814 (2001)), se observaron cinco respondedores clínicos de 12 pacientes que recibieron la vacuna de DC, y se observó una correlación entre la respuesta clínica y un aumento en el porcentaje de células T CD8⁺ específicas del análogo después de la vacunación, según se detectó mediante tinción de tetrámeros. Durante los estudios preclínicos de los inventores, se identificaron análogos heteroclíticos que condujeron a la generación de seis nuevos análogos modificados a partir de tres epitopos tumorales conocidos, MAGE-3.112, MAGE-2.157, y CEA.691 (Tangri, S., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 194:833-846 (2001)). Todos estos análogos inducen potentes respuestas de CTL humanos primarios *in vitro* que muestran reacción cruzada contra el epitopo nativo expresado por las células tumorales (Tangri, S., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 194:833-846 (2001)).

Utilizando el proceso de selección de epitopos descrito anteriormente, se seleccionaron nueve epitopos para el producto de vacuna. Estos epitopos, mostrados en las tablas 3 y 7, se eligieron basándose en la demostración de: 1) una amplia cobertura de antígenos tumorales con una mezcla de epitopos de la secuencia nativa de CTL, análogos de anclaje fijado y análogos heteroclíticos; 2) una alta afinidad de unión de reactividad cruzada por alelos del supertipo HLA-A2; 3) una inmunogenicidad en el ensayo de inducción de CTL primarios humanos *in vitro*, en particular para generar CTL que responden a células tumorales que expresan epitopos de tipo salvaje; y 4) cuando estén disponible, informes publicados en la bibliografía que muestren respuestas CTL primarias o postvacunación en sujetos normales o pacientes con cáncer.

Según el objetivo clínico de los inventores de inducir una respuesta a múltiples antígenos y múltiples epitopos en pacientes con cáncer, se emplean dos epitopos que representan a cada uno de los tres TAA (HER-2/neu, p53 y MAGE-2/3) y tres epitopos de CEA, un TAA más ampliamente expresado en tumores asociados a pulmón y colón. El grado de la unión de reactividad cruzada contra múltiples alelos del supertipo HLA-A2 debería permitir que la vacuna cubra una población amplia y sin sesgo étnico entre individuos que expresan alelos del supertipo HLA-A2.

Cuatro de los epitopos seleccionados son análogos de anclaje fijado que han sido modificados para una mejor unión a MHC. Un análogo de anclaje fijado se derivó del epitopo HER-2/neu.369, bien caracterizado, que se ha demostrado que induce potentes respuestas de CTL de memoria y postvacunación en pacientes con cáncer (Zaks, T.Z. y Rosenberg, S.A., *Cancer Res.*, 55:4902-4908 (1998); Knutson, K.L., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 107:411-484 (2001)). Aumentando la unión al supertipo mediante la sustitución de restos de anclaje a MHC, se espera que el análogo V2V9 de HER-2/neu.369 demuestre una inmunogenicidad aún mayor en individuos de supertipo HLA-A2. El resto de análogos de anclaje fijado (CEA.24V9, p53.139L2B3, y p53.149M2) se diseñaron a partir de epitopos identificados en el proceso de selección y no han sido ensayados previamente en la clínica. El análogo p53.139L2B3 contiene una sustitución adicional ácido de α -aminoisobutírico en la posición 3 (una posición de no anclaje) que evita cuestiones de estabilidad potenciales con el resto cisteína que se encuentra en el epitopo de tipo salvaje. Al igual que los epitopos derivados de secuencias de tipo salvaje, todos los análogos de anclaje fijado inducen CTL que presentan reacción cruzada con el epitopo de tipo salvaje presentado por las líneas de células tumorales (tabla 7) (Keogh, E., *et al.*, *J. Immunol.*, 167:181-196 (2001)).

Otras clase de análogos representada en las presentes vacunas son los análogos con actividad heteroclítica que resulta de la sustitución de restos de contacto con TCR (Zaremba, S., *et al.*, *Cancer Res.*, 57:4570-4577 (1997); Zugel, U.R., *et al.*, *J. Immunol.*, 161:1105-1709 (1998); Rivoltini, L.P., *et al.*, *Cancer Res.*, 59:301-306 (1999); Slansky, J.E., *et al.*, *Immunity*, 73:529-538 (2000)). De los tres análogos heteroclíticos incluidos, dos análogos (MAGE-3.11215 y CEA.691H5) inducen una potente actividad CTL que excede la del péptido de tipo salvaje (Tangri, S., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 194:833-846 (2001)). El tercer análogo heteroclítico, CEA.605D6 (CAP1-6D) (Zaremba, S., *et al.*, *Cancer Res.*, 57:4570-4577 (1997)), se incluye en la presente vacuna para proporcionar más amplitud de epitopo e inducción de CTL antitumorales, en particular a la luz de recientes datos clínicos que informan de significativas respuestas de CTL y clínicas en pacientes con cáncer de colon y pulmón vacunados con DC cargadas con este análogo de CEA heteroclítico (Fong, L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:8809-8814 (2001)).

La inmunogenicidad de los epitopos de vacuna ha sido corroborada, en particular en sistemas humanos, por más informes. Por ejemplo, los epitopos HER-2/neu.369 y p53.149 epitopes (versiones de tipo salvaje de los análogos utilizados en EP-2101), y HER-2/neu.689 han inducido respuestas de CTL específicos utilizando PBMC obtenidas de

donantes sanos a través de inducción *in vitro* primaria (zum Buschenfelde, C.M., *et al.*, *J. Immunol.*, 165:4133-4140 (2000); Chikamatsu, K., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:1281-1288 (1999)), así como respuestas de memoria utilizando PBMC de pacientes con cáncer (Knutson, K.L., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 107:411-484 (2001); Rongcun, Y., *et al.*, *J. Immunol.*, 763:1037-1044 (1999)). Además, otros han demostrado que los epitopos p53.139L2, p53.149M2, HER-2meu.369, y MAGE-2.157 inducen CTL reactivos a células tumorales y péptidos *in vivo* en ratones transgénicos HLA-A2.1 (Lustgarten, J., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 52:109-118 (1997); Visseren, M.J., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 73:125-130 (1997); Petersen, T.R., *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 53:357-364 (2001); Theobald, M., *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92:11993-11997 (1995)).

El epitopo final incluido en la vacuna es un epitopo universal PADRE® (Alexander, J., *et al.*, *Immunity*, 7:751-761 (1994)). El epitopo PADRE® se diseñó para unirse con reactividad cruzada a la mayoría de los alelos del supertipo DR (Alexander, J., *et al.*, *Immunity*, 1:151-161 (1994)), de modo que se predice que >90% de la población general responda contra este epitopo. En la presente vacuna, el epitopo PADRE® se incluye para potenciar la inducción de CTL por el agrupamiento de epitopos de CTL. Un número de estudios publicados han demostrado la capacidad de las respuestas de HTL para aumentar y apoyar el mantenimiento de las respuestas de CTL *in vivo* (Knutson, K.L., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 107:411-484 (2001); Kalams, S.A. y Walker, B.D., *J. Exp. Med.*, 188:2199-2204 (1998); Weber, J.S. y Mule, J.J., *J. Clin. Invest.*, 107:553-554 (2001); Toes, R.E., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 189:153-156 (1999)). En efecto, el epitopo PADRE® (Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000); Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999)), así como otros epitopos y antígenos inductores de HTL (Vitiello, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:341-349 (1995); Dhodapkar, M.V., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 104:113-180 (1999)), han sido un componente integral de varias vacunas de ensayos clínicos.

En resumen, se han seleccionado nueve epitopos de CTL que representan una combinación de secuencias nativas de anclaje fijo y análogos heterocliticos, y un epitopo de HTL universal PADRE®, para su inclusión en EP-2101. Este conjunto de epitopos constituye una combinación exclusiva de constituyentes de vacuna previstos para proporcionar una amplia cobertura de población y antígenos entre individuos HLA-A2. Los epitopos de CTL seleccionados para la presente vacuna son capaces de inducir CTL a partir de precursores no expuestos en PMBC procedentes de sujetos normales y de pacientes con cáncer. Esta observación sugiere en gran medida la ausencia de tolerancia completa contra estos epitopos asociados a tumores y apoya su utilidad para inducir respuestas de CTL beneficiosas en pacientes con cáncer.

Ejemplo 13: Inmunogenicidad de los epitopos de vacunas y productos de vacunas

Tal como se describió anteriormente, durante el proceso de selección de epitopos para identificar candidatos a vacunas, se ensayaron epitopos individuales procedentes de TAA para su capacidad para inducir CTL *in vitro* a partir de PBMC humanas obtenidas de individuos HLA-A2.1. Se ha demostrado que todos los epitopos seleccionados para la presente vacuna generan CTL *in vitro* y los CTL generados son capaces de reconocer el epitopo de tipo salvaje expresado sobre líneas de células tumorales (Keogh, E., *et al.*, *J. Immunol.* 167:181-196 (2001); Kawashima, I., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 59:1-14 (1998); Zaremba, S., *et al.*, *Cancer Res.*, 57:4570-4577 (1997)). Estas observaciones apoyan la inmunogenicidad potencial de los epitopos de vacunas cuando se administran a seres humanos y proporcionan más pruebas de la existencia de CTL precursores que pueden ser cebados con epitopos asociados a tumores en pacientes con cáncer. Los resultados también son apoyados por datos generados en otros laboratorios que demuestran respuestas de CTL de memoria o postvacunación contra la mayoría de los nueve epitopos de vacunas (que incluyen las versiones de tipo salvaje de los análogos en la presente vacuna) (Lustgarten, J., *et al.*, *Hum. Immunol.*, 52:109-118 (1997); Knutson, K.L., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 107:411-484 (2001); zum Buschenfelde, C.M., *et al.*, *J. Immunol.*, 765:4133-4140 (2000); Chikamatsu, K., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:1281-1288 (1999); Rongcun, Y., *et al.*, *J. Immunol.*, 763:1037-1044 (1999); Visseren, M.J., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 73:125-130 (1997); Petersen, T.R., *et al.*, *Scand. J. Immunol.*, 53:357-364 (2001); Theobald, M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11993-11991 (1995)).

También se analizó la inmunogenicidad de EP-2101 utilizando ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b que expresan la molécula de HLA-A2.1 humana (véanse también los ejemplos 15-17). Estos ratones se han utilizado para evaluar la inmunogenicidad de epitopos restringidos por HLA-A2.1 después de una inmunización *in vivo* (Wentworth, P.A., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:97-101 (1996); Vitiello, A., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 773:1007-1015 (1991)), y aunque son útiles para la evaluación *in vivo*, tienen varias limitaciones. Los estudios de los inventores, que emplean una diversidad de epitopos de CTL, indican que los ratones transgénicos HLA responden a aproximadamente 80% de los epitopos restringidos por HLA-A2.1 a los cuales responden los seres humanos (Wentworth, P.A., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:97-101 (1996); Wentworth, P.A., *et al.*, *Int. Immunol.*, 8:651-659 (1996)). Además, la magnitud de la respuesta detectada para un epitopo concreto puede variar ampliamente de un experimento a otro, en especial para respuestas que son de una magnitud menor. Por último, la magnitud relativa de la respuestas detectada en ratones transgénicos HLA no indica necesariamente la magnitud relativa que será inducida en seres humanos.

Para los estudios de inmunogenicidad *in vivo* en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b, se inyectó EP-2101 (preparada mediante un protocolo de emulsión (véase el ejemplo 17) similar al propuesto para la fabricación de fármacos) en ratones y se midieron las respuestas de CTL contra todos los epitopos en la vacuna y se compararon con las respuestas de CTL inducidas por la coinmunización de ratones con cada epitopo de CTL solo más el epitopo PADRE®, en el adyuvante Montanide® ISA 51. Se determinaron las respuestas de CTL midiendo la producción de

IFN- γ por los CTL utilizando un ELISA *in situ* (McKinney, D.M., *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 237:105-117 (2000)), después de la estimulación *in vitro* de esplenocitos procedentes de animales inmunizados con el péptido. Tal como se muestra en la figura 3B, basándose en los datos recogidos hasta ese momento de 6-10 experimentos independientes, la vacuna EP-2101 parece mostrar inmunogenicidad para la mayoría de los epitopos de CTL. Para la mitad de los epitopos de CTL en EP-2101 se observaron unas potentes respuestas de CTL mayores que 50 unidades secretoras (SU) de producción de IFN- γ (CEA.24V9, CEA.691H5, HER-2/neu.369V2V9, MAGE-2.157, y MAGE-3.11215). El resto de los epitopos mostraron unas respuestas de CTL de moderadas a débiles (<10-50 SU), y estas respuestas estaban asociadas en general con unas variaciones experimentales mayores, según indican las barras de desviación estándar más grandes. Tal como se analizó anteriormente, estas variaciones reflejan las limitaciones del ensayo de ratones transgénicos.

Sin embargo, a pesar de la variabilidad inherente del ensayo, las respuestas de CTL a múltiples epitopos inducidas por el agrupamiento de los epitopos de CTL en EP-2101 parecen comparables a las respuestas de CTL inducidas en los ratones por cada epitopo de CTL por sí solo, cuando se coinmunizan con el epitopo PADRE® en el adyuvante Montanide® ISA 51. Así, en conjunto, estos experimentos indican que EP-2101 es inmunogénica en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b. Otros experimentos también indican que EP-2101 puede inducir respuestas de HTL contra el epitopo PADRE® en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b, que están restringidas por el alelo H-2 I-A^b de ratón (Alexander, J., *et al.*, *Immunity*, 1:151-161 (1994)).

Ejemplo 14: Estudio inmunofarmacológico en ratones HLA-A2.1/K^b

La EP-2101 es una vacuna inmunoterapéutica diseñada para inducir respuestas de CTL contra nueve epitopos de péptidos derivados de cuatro TAA que son ampliamente expresados sobre células de cáncer de colon y pulmón (CEA, p53, HER-2/neu, y MAGE-2/3). Debido a que los TAA representan autoproteínas que son sobreexpresadas en células tumorales, la inducción de una respuesta terapéutica por EP-2101 puede requerir la ruptura de la tolerancia de CTL contra autoepitopos y la inducción de una respuesta de CTL limitada pero eficaz, que elimine específicamente las células tumorales sin inducir una inmunopatología grave contra cualquier tejido normal que pueda expresar niveles bajos de los mismos TAA. La caracterización preclínica de EP-2101 indica que la vacuna en efecto es inmunogénica, puesto que se indujo una amplia respuesta de CTL de magnitud significativa en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b contra varios epitopos de TAA de tipo salvaje y análogos en la vacuna (véase el ejemplo 13).

La inmunogenicidad de la vacuna EP-2101 contra múltiples epitopos y múltiples autoproteínas de tumores hizo surgir la posibilidad de que puedan inducirse respuestas inmunopatológicas dirigidas contra tejidos normales que expresan niveles bajos de TAA en pacientes con cáncer después de una vacunación, aunque estudios en modelos murinos (Mizobata, S.K., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 49:285-295 (2000); Morgan, D.J., *et al.*, *J. Immunol.*, 160:643-651 (1998)) y ensayos clínicos previos (Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:37-44 (1997); Salgaller, M.L., *et al.*, *Cancer Res.*, 56:4749-4757 (1996); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999); Lee, P., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 79:3836-3847 (2001)) han indicado la ausencia de toxicidades autoinmunológicas asociadas con la inducción de una respuesta de CTL anti-TAA. Para tratar este importante problema, se llevó a cabo un estudio inmunofarmacológico preclínico en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b para determinar si se producen respuestas patológicas autoinmunológicas después de la inmunización *in vivo* con EP-2101. Aunque no es un modelo animal validado para ensayos toxicológicos, este sistema de ratón transgénico ofrece la oportunidad de evaluar este importante problema de seguridad en un entorno preclínico, puesto que el transgén HLA-A2.1/K^b permite la inducción de respuestas de CTL murinos contra los epitopos de CTL humanos en la vacuna (Wentworth, P.A., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:91-101 (1996); Vitiello, A., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 773:1007-1015 (1991)).

En este estudio de 18 semanas, ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b reciben un total de seis tratamientos con EP-2101 o una emulsión control de placebo a intervalos de tres semanas. Los ratones se inyectaron en la base de la cola con EP-2101 a una dosis en exceso en 150 veces sobre una base de mg/kg, comparado con la dosis planeada para pacientes con cáncer en el ensayo clínico. Se realizó una histopatología sobre los animales inyectados en tres momentos: en la semana dos después de un único tratamiento, en la semana 9 después de tres tratamientos, y en la semana 18 después de seis tratamientos, en tejidos de siete órganos principales (corazón, pulmón, riñón, estómago, intestino, cerebro e hígado) procedentes de cada animal, así como sobre piel aislada del sitio de inyección. Además de la histopatología, los animales se controlaron a intervalos regulares para observar la aparición de acontecimientos adversos y el peso corporal. Al mismo tiempo que los análisis de histopatología en los 3 momentos y el control de los acontecimientos adversos, las respuestas de CTL en el bazo de ratones vacunados y tratados con placebo también se midieron para correlacionar cualquier inmunopatología con la presencia de respuestas de CTL contra epitopos en la vacuna.

Los resultados de este estudio de inmunofarmacología indican que el tratamiento con EP-2101 o una emulsión control no produjeron una inmunopatología autoinmunológica en los principales órganos de ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b en todos los momentos estudiados, aunque se detectaron potentes respuestas de CTL en los animales. Las secciones de histología de siete órganos principales de animales tratados con EP-2101 o la emulsión control aparecen normales en todos los momentos estudiados. La única patología observada en este estudio atribuible al

tratamiento fue la aparición de una inflamación granulomatosa y la formación de granulomas en la piel del sitio de inyección, que aparecieron en los grupos de tratamiento con vacuna y con emulsión de control. Esta observación es un efecto secundario común del tratamiento con el adyuvante de Montanide® ISA 51 utilizado en este estudio (Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Lee, P., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 79:3836-3847 (2001); Leenaars, M., *et al.*, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 61:291-304 (1998); Yamanaka, M., *et al.*, *J. Vet. Med. Sci.*, 54:685-692 (1992)).

El control de acontecimientos adversos en los ratones tratados a lo largo del estudio de 18 semanas indica una ausencia general de sintomatologías asociadas con una enfermedad o toxicidad, en los grupos tratados con vacuna y con emulsión de control (por ejemplo, letargo, diarrea, caquexia, parálisis, postura anómala). La única observación notable fue la aparición de un bulto palpable en la base de la cola de todos los animales, que es coherente con la formación de granulomas, que apareció de modo transitorio a lo largo de un periodo de 2 semanas y media entre el 4º y 5º periodo de tratamiento, en los grupos tratados con vacuna y con emulsión de control. Este acontecimiento adverso transitorio no se asoció con necrosis o sangrado en la piel del sitio de la inyección, y estas lesiones no se observaron en ningún animal a lo largo de la duración del estudio entero. Por último, la ausencia de acontecimientos adversos graves e inmunopatología en los animales de ensayo fue confirmada por las mediciones de su peso corporal, que fueron normales y aumentaron a un ritmo constante a lo largo del estudio.

En resumen, la ausencia de patología inflamatoria autoinmunitaria en el sistema de modelo de ratón HLA-A2.1/K^b observada en este estudio recuerda a la ausencia de patologías similares indicada en ensayos clínicos humanos previos, en los que las vacunas de péptidos formuladas en adyuvante de Montanide® ISA 51 se administraron a pacientes con cáncer (Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:37-44 (1997); Salgaller, M.L., *et al.*, *Cancer Res.*, 56:4749-4757 (1996); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999); Lee, P., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 79:3836-3847 (2001)). Para la vacuna EP-2101, la ausencia de inmunopatología autoinmunitaria en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b frente a una respuesta de CTL ampliamente específicos dirigida contra múltiples epitopos de autoantígenos tumorales apoya la seguridad general de la administración de esta vacuna a pacientes con cáncer de colon y pulmón en los ensayos clínicos propuestos.

Ejemplo 15: Ensayo clínico

La EP-2101 es una vacuna de péptidos terapéutica para su uso como una terapia adyuvante en pacientes con cáncer. La vacuna está diseñada para la administración a pacientes para la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) dirigidos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), p53, receptor epidérmico humano-2/neurológico (HER-2/neu) y el antígeno del melanoma 2 y 3 (MAGE-2/3), los antígenos asociados a tumores (TAA) que con frecuencia aparecen sobreexpresados en el cáncer de colon y de pulmón no microcítico (NSCLC). El objetivo clínico para inducir respuestas de CTL contra estos cuatro TAA bien caracterizados es retrasar o prevenir la recurrencia del cáncer después de una cirugía, quimioterapia o radiación.

El cáncer de pulmón sigue siendo un importante problema de salud con una tasa de mortalidad muy alta. Se predicen aproximadamente 170.000 nuevos casos de cáncer de pulmón en EEUU en 2001 y se calcula que 160.000 pacientes mueran como consecuencia de la enfermedad. Aproximadamente 80% de los cánceres de pulmón son NSCLC, y la mayoría de estos pacientes presentan el estadio tardío de la enfermedad. Las "normas asistenciales" para NSCLC siguen siendo la cirugía, la terapia de radiación o la quimioterapia. Además, algunos pacientes reciben terapia adyuvante después de la cirugía en forma de quimioterapia después de la retirada del tumor detectable, aunque solo ahora los estudios clínicos están empezando a evaluar el beneficio de este tratamiento. A pesar de estos tratamientos, la tasa de supervivencia en 2 años es del 30% para el estadio IIIa, 45% para IIb, 60% para IIa y Ib, y 80% para la (Mountain, C., *Lung Cancer; A Handbook For Staging, Imaging and Lymph Node Classification* (1999)). Por tanto, son urgentes unas terapias adyuvantes eficaces.

La mejora continuada en la detección de los cánceres de colon ha potenciado la capacidad para tratar pacientes en un estadio temprano de la enfermedad. Según the American Cancer Society, la tasa de supervivencia en 5 años para la enfermedad local es del 91%, mientras que la tasa de supervivencia para la enfermedad diseminada solo es del 7% (American Cancer Society, *Cancer Facts and Figures 2001*). Las muertes previstas en EEUU como consecuencia del cáncer de colon son aproximadamente 50.000 en 2001. Las "normas asistenciales" para el cáncer de colon de estadio III son cirugía seguida de quimioterapia utilizando 5-fluorouracilo y leucovorina. En fechas recientes ha aumentado el uso de irinotecano con 5-fluorouracilo y leucovorina en el escenario adyuvante. A pesar de estos regímenes disponibles, son necesarios más tratamientos adyuvantes seguros y eficaces.

La EP-2101 está compuesta por diez péptidos sintéticos, cada uno compuesto de 9-13 restos aminoácidos, formulados como una emulsión de agua en aceite estable en el adyuvante Montanide® ISA 51. Nueve de los péptidos representan epitopos de CTL. Cada epitopo de CTL está restringido por HLA-A2.1 y al menos otro miembro de la superfamilia HLA-A2 de moléculas de MHC de clase I, que proporciona una cobertura de aproximadamente 45% de la población general. Los epitopos de CTL incluidos representan una combinación de epitopos de análogos heterocliticos, análogos de anclaje fijado, y de tipo salvaje. El décimo péptido sintético es un epitopo pan-DR (PADRE®), un epitopo de linfocitos T auxiliares (HTL) diseñado de modo lógico, incluido para aumentar la magnitud y la duración de las respuestas de CTL.

- El concepto de inducir una respuesta de CTL para retrasar o prevenir la recurrencia del cáncer está apoyado por significativos datos de modelos animales, por estudios que correlacionan la infiltración tumoral con un resultado clínico favorable y por informes de regresión de tumores tras unas respuestas de células T antitumorales inducidas por vacunas o espontáneas (Yu, Z. y Restifo, N.P., *J. Clin. Invest.*, 110:289-294 (2002)). Se han utilizado epitopos peptídicos para la inducción de respuestas de CTL en pacientes con cáncer en numerosos estudios clínicos con algunos resultados alentadores (Rosenberg, S.A., *et al.*, *Nat. Med.*, 4:321-321 (1998); Fong, L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8809-8814 (2001)). Para mejorar el resultado clínico en los estudios propuestos, la vacuna de péptidos EP-2010 se diseñó para incorporar los descubrimientos y los conceptos prometedores de estudios previos. De forma específica, EP-2101 incorpora:
1. unos epitopos de CTL definidos con una longitud óptima derivados de múltiples TAA bien caracterizados;
 2. epitopos con una alta afinidad de unión a HLA y una capacidad demostrada para inducir CTL que reconocen líneas de células tumorales;
 3. epitopos que son una mezcla de secuencias de tipo salvaje y dos tipos de análogos, de anclaje fijado y heteroclínicos, que se ha demostrado que inducen respuestas en seres humanos que se correlacionan con respuestas clínicas;
 4. un epitopo PADRE® de células T auxiliares, diseñado de forma lógica y que no es un autoepitopo, que se ha demostrado que induce respuestas auxiliares en seres humanos;
 5. Montanide® ISA 51, un adyuvante de aceite mineral similar al adyuvante de Freund incompleto que es un adyuvante bien caracterizado para un uso humano que ha mostrado una seguridad y potencia aceptables en numerosos estudios clínicos (Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999); Lee, P., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 19:3836-3841 (2001); Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:37-44 (1997); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000); Yamshchikov, G.V., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 92:103-111 (2001); Rosenberg, S.A., *et al.*, *J. Immunol.*, 763:1690-1695 (1999)).
- La combinación exclusiva de epitopos de tipo salvaje y análogos derivados de TAA bien estudiados y administrada en un adyuvante que ha producido datos clínicos alentadores debería proporcionar una oportunidad para mejorar los resultados obtenidos hasta la fecha utilizando vacunas del cáncer basadas en péptidos.

Base lógica para la selección de dosis

- La EP-2101 es una vacuna inmunoterapéutica que consiste en nueve epitopos peptídicos derivados de cuatro TAA que estimulan respuestas de CTL y el epitopo de células T auxiliares universal PADRE®. Los 10 péptidos se formulan en una emulsión con el adyuvante Montanide® ISA 51, que se administrará a pacientes con cáncer de colon y NSCLC para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna. Las indicaciones con respecto a la dosificación de vacuna apropiada para tratar pacientes fueron proporcionadas por informes de ensayos clínicos previos, en los que se indicaron respuestas de CTL y clínicas, así como la seguridad de la vacuna, después de la administración de una vacuna de péptido/Montanide® ISA 51 (Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999); Lee, P., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 79:3836-3847 (2001); Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:37-44 (1997); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000); Yamshchikov, G.V., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 92:103-111 (2001); Rosenberg, S.A., *et al.*, *J. Immunol.*, 763:1690-1695 (1999)).
- Se han ensayado varias vacunas de péptidos formuladas en Montanide® ISA 51 en pacientes con cáncer, y se ha considerado que, en general, estas vacunas son seguras y bien toleradas, sin que se hayan indicado toxicidades sistémicas graves relacionadas con la dosis (Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999); Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:37-44 (1997); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000)). La dosis de péptido administrada a los pacientes en estos ensayos fue tan alta como 10 mg de péptido total por tratamiento, estando la mayoría en el intervalo de 1-2 mg de péptido total, y el programa de tratamiento fue similar al propuesto por el ensayo clínico de EP-2101 (es decir, 4-6 inyecciones subcutáneas a intervalos de 3-4 semanas). Las toxicidades más habituales indicadas fueron reacciones en el sitio de la inyección (dolor, molestias, y formación de granulomas) que casi siempre se clasificaron como de gravedad de grado 1 o 2 (Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000); Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000)). Otras toxicidades de grado 1/2 transitorias que a veces se observan incluyen náuseas, dolores de cabeza, fiebre y fatiga. Los estudios que ensayan vacunas con más de un solo péptido formuladas en adyuvante de Montanide® ISA 51 incluyen los ensayos clínicos presentados por Yamshchikov *et al.* (Yamshchikov, G.V., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 92:703-711 (2001)) y Rensing *et al.* (Rensing, M.E., *et al.*, *J. Immunother.*, 23:255-266 (2000)). En cada estudio, pacientes con melanoma o carcinoma cervical fueron tratados con una mezcla de tres o cinco péptidos, respectivamente, inyectados a unas dosis de hasta 3 mg de péptido total. Al igual que lo observado en otros estudios, ambas vacunas mostraron solo toxicidades limitadas de grado 1/2. Así, en su conjunto, los datos de estos ensayos clínicos indican que las vacunas que consisten en uno o varios epitopos de péptidos

formulados en Montanide® ISA 51 a una dosis de péptido total de hasta 10 mg son bien toleradas en general.

Con respecto a la inducción de CTL y las respuestas clínicas a vacunas de péptido/Montanide® ISA 51, los ensayos clínicos que estudian el aumento de la dosis del péptido, que varía de 0,1 a 10 mg de péptido por dosis de inyección, han demostrado que se inducen respuestas de CTL y respuestas clínicas en este intervalo de dosis, en particular a unas dosis cercanas a 1 mg por péptido (Weber, J.S., *et al.*, *J. Immunother.*, 22:431-440 (1999); Cormier, J.N., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.*, 3:37-44 (1997); Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2756-2765 (1999); Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000))¹⁻⁴. Por ejemplo, en un estudio notable por Rosenberg *et al.* 7;8 (Rosenberg, S.A., *et al.*, *Nat. Med.*, 4:321-321 (1998); Rosenberg, S.A., *et al.*, *J. Immunol.*, 763:1690-1695 (1999)), en el que se indicaron unas significativas respuestas clínicas postvacunación, una dosis de 1 mg de un único péptido análogo de anclaje fijado, gp100.209(210M), fue administrada en Montanide® ISA 51. En este ensayo, se observó una tasa de respuesta clínica del 40% en pacientes con melanoma después de la vacunación con péptidos junto con una terapia con IL-2, comparado con la tasa de respuesta histórica del 15% solo con terapia con IL-2 (Rosenberg, S.A., *et al.*, *Nat. Med.*, 4:321-321 (1998)). De forma similar, en otro ensayo en el que se ensayó una vacuna de péptidos HPV-16 E7 en pacientes con neoplasia intraepitelial cervical de alto grado, se indicaron respuestas de CTL y respuestas clínicas a unas dosis de 0,3 mg y 1 mg (Muderspach, L., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:3406-3416 (2000)). Con respecto a la correlación de la inducción de CTL con la dosis de péptido, Wang *et al.* (Wang, F., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2156-2165 (1999)) han observado que una dosis alta del péptido Melan-A/MART-1.27 en el adyuvante Montanide® ISA 51 (2 mg de péptido/dosis) parece producir una mayor magnitud de respuestas de CTL, según se mide mediante la liberación de gamma-interferón (IFN- γ) utilizando el ensayo de inmunomanchas ligado a enzimas (ELISPOT), cuando se compara con pacientes que reciben una dosis menor (0,1 mg/dosis). Aunque el número de pacientes en este ensayo fue limitado, este descubrimiento es coherente con otros estudios en humanos inmunizados con una construcción de péptido de CTL HBV lipidado (Vitiello, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:341-349 (1995)) o un péptido de punto de corte bcl-abl específico de tumor administrado en el adyuvante QS-21 (Pinilla-Ibarz, J., *et al.*, *Blood*, 95:1781-1787 (2000))¹⁰, en el que se demostró que dosis más altas de péptido eran más constantes para inducir respuestas de células T que dosis menores.

Se generó una emulsión estable a una dosis de 5 mg/ml de péptido total (0,5 mg/ml por epitopo de péptido). Así, los pacientes con cáncer en el ensayo clínico de EP-2101 recibirán una dosificación que corresponde a 5 mg de péptido total (0,5 mg por epitopo) en un volumen de inyección de 1 ml. Los pacientes recibirán seis inyecciones subcutáneas totales a intervalos de tres semanas en un volumen de inyección de 1 ml.

Los riesgos potenciales de la administración de vacunas son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen molestias en el sitio de la inyección, síntomas generales asociados con la administración de una vacuna (escalofríos, fiebre, sarpullidos, dolores, náuseas, dolor de cabeza y fatiga); toxicidad reproductiva, reacción anafiláctica, efectos sobre el embarazo y el desarrollo fetal, y reacciones autoinmunitarias, que incluyen las producidas en la retina.

Fórmula estructural

La secuencia de aminoácidos de cada péptido se indica en las tablas 3 y 7.

Formulación de la forma de dosificación

La EP-2101 es una emulsión estéril sin conservantes de 10 epitopos de péptidos a una concentración de 0,5 mg/ml cada uno, formulada en adyuvante Montanide® ISA 51 a una proporción de 1:1 (en p:p) e introducida en viales de vidrio con tapón de goma. Los péptidos se sintetizan utilizando la química de Boc o Fmoc convencional para la síntesis de péptidos en fase sólida, comenzando con la resina apropiada, y purificados mediante métodos convencionales. El adyuvante es un adyuvante de aceite mineral, similar al adyuvante de Freund incompleto, fabricado y suministrado por Seppic, Inc., Fairfield, NJ. La EP-2101 se fabrica bajo condiciones asépticas. Los péptidos se disuelven en tres disolventes diferentes, se esterilizan mediante filtración, se reúnen y después se emulsionan en adyuvante a través de una homogeneización bajo condiciones controladas.

Vía de administración

La EP-2101 está diseñada para la inyección subcutánea. La vacuna se administrará como una inyección de 1 ml cada tres semanas durante un total de seis inyecciones. La dosis de péptido total para cada inyección será de 5,0 mg (0,5 mg de cada péptido).

Fabricación de la sustancia fármaco

Los péptidos se preparan utilizando una metodología de síntesis en fase sólida. Brevemente, se emplean grupos fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y/o *terc*-butiloxicarbonilo (Boc) como grupos protectores para los restos aminoácidos en la síntesis. El péptido se construye sobre la resina apropiada.

Se añaden derivados de aminoácidos a los aminoácidos con una base de resina utilizando tres equivalentes de cada uno de DIC y HOBt como reactivos de acoplamiento. El grupo protector Fmoc o Boc se retira del aminoácido terminal del péptido con una base de resina utilizando piperidina al 20% en DMF o TFA al 65% en diclorometano, respectivamente.

Se añaden el resto de los restos aminoácidos Fmoc-N- o Boc-N- protegidos al péptido con una base de resina en ciclos de acoplamiento secuenciales utilizando DIC y HOBt como reactivos de acoplamiento y piperidina al 20% en DMF o TFA al 65% en diclorometano para eliminar los grupos protectores Fmoc y Boc, respectivamente.

5 Algunos grupos protectores de la cadena lateral se retiran utilizando mezclas orgánicas apropiadas antes de la escisión del péptido de la resina. Tanto la retirada de los grupos protectores adicionales como la escisión de la resina se logran mediante el tratamiento del péptido-resina con una mezcla de fluoruro de hidrógeno/metoxibenceno o TFA/agua. El péptido se extrae de la resina con ácido acético y, en algunos casos, una extracción con ácido trifluoroacético. La resina se lava con éter. El péptido se aísla mediante liofilización desde la disolución de HOAc/TFA.

10 El péptido se purifica mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) sobre una fase estacionaria de sílice derivatizado C18. La columna se eluye, y las fracciones que contienen el péptido puro se reúnen y el péptido se aísla mediante liofilización. En algunos casos, después de la RP-HPLC se realiza una purificación de intercambio iónico/desalación utilizando disolventes tamponados con HOAc. Las fracciones resultantes se aíslan mediante liofilización.

15 Solubilidad de péptidos individuales

Se han realizado estudios de solubilidad sobre los péptidos, definiéndose la solubilidad como una disolución transparente sin partículas visibles (tabla 8). Solo 6 de los 10 péptidos (1013.08, 1243.08, 1295.03, 1323.06, 1350.01 y 1352.03) fueron solubles a pH fisiológico. Por tanto, los péptidos se ensayaron a 2-5 mg/ml en diversas disoluciones ácidas acuosas y disoluciones básicas acuosas, además del dimetilsulfóxido (DMSO).

20 Especificaciones y métodos analíticos para la sustancia fármaco

La tabla 9 describe las especificaciones para la sustancia fármaco

Componentes y composición cuantitativa

Los componentes y la composición cuantitativa de EP-2101 se describen en la tabla 10.

Especificaciones de los componentes

25 Los componentes utilizados en la fabricación del producto de fármaco se listan en la tabla 11.

Método de fabricación del producto de fármaco a granel y del producto de fármaco

El producto de fármaco a granel se prepara como se muestra en la figura 3A. El producto de fármaco a granel se formula en tres disoluciones (véanse las tablas 8 y 12) basándose en la solubilidad de los péptidos individuales en cada uno de los tres disolventes y la solubilidad de los péptidos cuando se reúnen. Brevemente, para permitir el procesamiento aséptico, los 10 péptidos se disuelven en una disolución ácida (ácido acético 0,1875 M), una disolución básica (hidróxido de sodio 0,1 M) o el disolvente orgánico DMSO. Estos tres agrupamientos que contienen péptidos se esterilizan mediante filtración. Bajo condiciones asépticas, estos tres agrupamientos de péptidos se combinan, se tamponan, se ajusta el pH y después se homogeneizan con el adyuvante Montanide® ISA 51 bajo condiciones de temperatura controlada para formar el producto de fármaco. El producto de fármaco, una emulsión 1:1 (en p:p) estable, después se introduce en viales de vidrio de 2 ml y se conserva a 2-8 °C.

Especificaciones del producto de fármaco y métodos analíticos

Las tablas 13 y 14 describen las especificaciones para el producto de fármaco a granel de EP-2101 y el producto de fármaco, respectivamente.

Concentración de péptidos (cada péptido)

40 La concentración de todos los componentes peptídicos en el producto de fármaco de EP-2101 se ensaya mediante RP-HPLC (las condiciones se ilustran en la tabla 15). Una cantidad especificada de la emulsión se mezcla con una disolución de TFA al 10% en DMSO para formar una mezcla en dos capas. Los intentos para producir una disolución transparente y homogénea para el análisis de HPLC utilizando disolventes distintos a DMSO no tuvieron éxito. La toma de muestras de la mezcla en dos fases mencionada anteriormente se realiza insertando una jeringa o pipeta a través de la capa superior de aceite mineral y hacia la capa inferior de DMSO. La única muestra tomada para el análisis de HPLC se obtiene de la capa de DMSO, en la que todos los péptidos son solubles. Una cromatografía de HPLC produce un pico cromatográfico diferenciado para cada péptido, que después de la integración y la comparación con una curva de calibración produce la concentración del péptido individual en el producto de fármaco de EP-2101. La naturaleza bifásica de la muestra introduce una variabilidad en el cálculo del volumen completo de muestra, así como la transferencia de la muestra. Después, debido a la complejidad de la preparación y la manipulación de la muestra, se observaron unos errores inusualmente grandes cuando se determina la concentración del péptido (tal altos como 30%). Esta alta variabilidad no vino acompañada de la formación del producto principal de la degradación ni de otros cambios físicos inusuales de la muestra, y se infiere que es el

resultado de la preparación y la manipulación de la muestra. Para esta razón, se estableció la especificación de $\pm 50\%$ de la concentración prevista como un criterio de liberación y estabilidad. En la actualidad, se están realizando intentos para mejorar la manipulación de las muestras y para simplificar la mezcla bifásica de aceite mineral-DMSO, con el objetivo principal de estrechar las especificaciones de liberación y estabilidad.

5 Potencia

La EP-2101 está compuesto de epitopos de péptidos de CTL y HTL sintéticos. Puede determinarse la integridad y el contenido en péptidos de forma precisa mediante caracterización física/química utilizando los métodos analíticos descritos anteriormente (por ejemplo, HPLC, viscosidad, y análisis del tamaño de las partículas). Además, se ha desarrollado un método para evaluar la potencia global del producto de fármaco.

10 El desarrollo de un ensayo de potencia pertinente resulta un reto, porque la vacuna EP-2101 está diseñada para estimular específicamente las respuestas de CTL restringidas por HLA-A2.1 en seres humanos y no en otras especies. Una manera de enfrentarse a este reto es medir la potencia *in vivo* de EP-2101 utilizando ratones que expresan la molécula de HLA-A2.1 como un transgén (es decir, ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b). El ensayo de potencia de EP-2101 propuesto es similar al ensayo preclínico utilizado para medir la inmunogenicidad de los epitopos de CTL de EP-2101 en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b (véase el ejemplo 13). Debe advertirse que el ensayo de ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b tiene limitaciones en la cuantificación de las respuestas de CTL, de modo específico: 1) solo aproximadamente 80% de los epitopos restringidos por HLA-A2.1 que son inmunogénicos en humanos inducen también respuestas de CTL en ratones transgénicos (Wentworth, P.A., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:97-101 (1996)), y por tanto las respuestas de CTL contra algunos epitopos no pueden cuantificarse utilizando este sistema, y; 2) utilizando una serie de estrategias, los inventores han descubierto que las respuestas de CTL *in vivo* generadas en ratones transgénicos HLA, tanto inducidas por una vacunación como por infección natural, varían de un experimento a otro debido a diferencias individuales entre los animales y a la manipulación *in vitro* de células T cebadas requeridas para este método de ensayo. Aunque el ensayo de la potencia tiene las limitaciones habituales de los bioensayos *in vivo*, proporciona una medición de la potencia global de EP-2101. Por consiguiente, actúa como un complemento apropiado para los ensayos analíticos cuantitativos y muy sensibles descritos anteriormente.

En el ensayo de la potencia de EP-2101, ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b se inyectan con EP-2101 y, 14 días después, esplenocitos procedentes de los animales inmunizados se estimulan *in vitro* con epitopos de CTL de EP-2101 representativos, CEA.691H5 (1352.02) y HER-2/neu.369V2V9 (1334.10), para expandir los CTL cebados *in vivo*. Después de la expansión *in vitro*, las respuestas de CTL cebados *in vivo* (también denominados células efectoras) se cuantificarán midiendo, con un ELISA, su capacidad para producir IFN- γ cuando de nuevo se estimulan *in vitro* con los péptidos CEA.691H5 o HER-2/neu.369V2V9. La actividad CTL medida mediante ELISA se expresa como unidades secretoras (SU), que representan el número de células efectoras necesarias para segregar 100 pg de IFN- γ en respuesta al péptido (McKinney, D.M., *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 237: 105-117 (2000)). Así, el valor de SU es un reflejo del nivel de CTL inducido por EP-2101 en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b y es una medición de la potencia de la vacuna.

Ejemplo 16: Descripción detallada del ensayo de la potencia

Para evaluar la potencia del fármaco, se ha desarrollado un ensayo para medir la capacidad de la vacuna para inducir una respuesta de CTL en ratones transgénicos que expresan una molécula de MHC de clase I quimérica en la que la cadena pesada está compuesta por el primer y segundo dominio de la molécula de HLA-A2.1, y el tercer dominio, el dominio transmembrana y el dominio citoplásmico de la molécula de H-2K^b de ratón. Previamente, se ha demostrado que cuando ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b son inmunizados con epitopos restringidos por HLA-A2.1 conocidos por ser inmunogénicos en seres humanos, aproximadamente 80% de los epitopos inducen respuestas de CTL (Wentworth, P.A., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:91-101 (1996)). Estos datos confirman la validez de utilizar estos ratones para cuantificar las respuestas de CTL inducidas tras la inmunización con una vacuna compuesta por epitopos restringidos por HLA-A2.1.

La selección de dos epitopos de CTL para medir la potencia de EP-2101 y el establecimiento de una especificación del ensayo de la potencia se describe a continuación. En el ejemplo 17 se describen protocolos específicos.

50 Brevemente, el análisis de la inmunogenicidad de EP-2101 en varios experimentos indica que los diferentes epitopos en la vacuna inducen respuestas variables que varían desde una media de aproximadamente 10 SU hasta >100 SU, y estas respuestas estaban asociadas con una alta variabilidad intra- e interexperimental, en particular para epitopos débilmente inmunogénicos. Ambos factores hacen que no sea factible medir la potencia de la vacuna basándose en las respuestas de CTL contra los nueve epitopos en la vacuna. En su lugar, se desarrolló un ensayo utilizando las mediciones de inmunogenicidad de dos epitopos inmunogénicos representativos en EP-2101 como indicador de la potencia global de la vacuna.

La selección de los dos epitopos se base en un análisis retrospectivo de los datos de inmunogenicidad de CTL generados a partir de experimentos en los que ratones fueron inyectados con EP-2101 a dosis de emulsión variables. Se evaluaron las respuestas de CTL de 6-10 experimentos independientes en los que ratones fueron

5 inmunizados con una dosis de emulsión de 10 mg/ml y los dos epitopos inmunogénicos principales en EP-2101 fueron CEA.691H5 (media geométrica de la respuesta, 164 x/\pm 1,8 SU) y HER-2/neu.369V2V9 (media geométrica de la respuesta, 152 x/\pm 2,4 SU), actuando un tercer epitopo, MAGE-3.11215 (media geométrica de la respuesta, 92 x/\pm 2,1 SU) como epitopo de seguridad potencial. Además de la alta magnitud de respuesta, la variabilidad global asociada con estas respuestas está dentro de los intervalos que normalmente se observan para epitopos inmunogénicos ensayados en ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b (SD entre x/\pm 1,8 - 2,4). Aunque se generó esta extensa base de datos con EP-2101 a una dosis de emulsión de 10 mg/ml, otros experimentos indican que las emulsiones de EP-2101 a una dosis total de péptido de 2,5 mg/ml y 5 mg/ml inducen un nivel comparable de respuesta de CTL que la dosis de emulsión de 10 mg/ml contra los epitopos muy inmunogénicos CEA.691H5, HER-2/neu.369V2V9 y MAGE-3.11215.

15 Un mayor apoyo para la selección de epitopos lo proporcionaron los datos de las respuestas medidas en el ensayo ELISPOT que ensaya la actividad de las células efectoras CTL sin la expansión *in vitro* por estimulación de péptidos. Pueden detectarse respuestas de CTL coherentes mediante el ensayo ELISPOT contra los epitopos HER-2/neu.369V2V9 y CEA.691H5, y estos resultados confirman la fuerte inmunogenicidad de los dos epitopos del ensayo de potencia candidatos, comparado con otros en la vacuna cuando se ensayan con este ensayo.

20 Además de las respuestas medidas en ratones inmunizados, también se consideraron las respuestas de CTL de la línea de base observadas en ratones no expuestos o en ratones inyectados con una emulsión placebo de Montanide® ISA 51. Para los tres epitopos candidatos principales, las respuestas de CTL en ratones de control negativo en tres experimentos independientes fueron bajas (<10 SU), de modo que la diferencia en la magnitud entre la línea de base y las respuestas de CTL inducidas por vacunas fue lo suficientemente grande como para asegurar la detección de la disminución de la potencia de la vacuna, si se produjese después de la fabricación.

25 Una consideración final en la selección de epitopos para el ensayo de potencia es la variabilidad de la inducción de CTL asociada con ratones individuales. Puesto que el protocolo para el ensayo de potencia de EP-2101 especifica la medición de las respuestas de CTL en una población de esplenocitos reunidos derivados de 6 ratones inmunizados, una fuente potencial de variabilidad en el ensayo puede ser la frecuencia de inducción de CTL en animales individuales. Esta consideración no es trivial, puesto que se han observado respuestas de CTL esporádicas que se comportan de un modo de todo o nada en ratones individuales inyectados con diferentes tipos de construcciones de vacuna muy inmunogénicas (por ejemplo, lipopéptido, ADN) (resultados no publicados). A la luz de este importante parámetro, se inició un estudio para determinar la variabilidad de la inducción de CTL contra los tres principales epitopos de potencia candidatos en 15 ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b individuales inmunizados con la vacuna EP-2101. Pudieron demostrarse respuestas de CTL contra los tres epitopos en 100% de los animales inmunizados. Tal como se esperaba, la jerarquía de las respuestas de CTL contra cada uno de los tres epitopos fue similar a la medida con un agrupamiento de esplenocitos procedentes de los ratones cebados, y el grado de variabilidad de las respuestas entre los animales individuales se encontraba dentro de un intervalo aceptable para un ensayo *in vivo*. Así, CEA.691H5 y HER-2/neu.369V2V9 inducen la respuesta de CTL más robusta y reproducible en todos los animales, seguido del epitopo MAGE-3.11215 (la media geométrica de la respuesta SU en los 15 ratones contra los epitopos CEA, HER-2/neu y MAGE-3 fue de 252 x/\pm 1,4, 169 x/\pm 1,7, y 48 x/\pm 1,7, respectivamente, y estas respuestas están dentro del intervalo observado con los esplenocitos reunidos de los animales inmunizados con EP-2101).

40 En resumen, se seleccionaron los epitopos CEA.691H5 y HER-2/neu.369V2V9 como los epitopos del ensayo de potencia, y el epitopo MAGE-3.11215 se diseñó como epitopo de seguridad basándose en 1) la potencia de las respuestas de CTL medidas en los animales inmunizados con EP-2101 utilizando los ensayos ELISA *in situ* y ELISPOT *ex vivo*, 2) la magnitud equivalente de las respuestas de CTL generadas contra los epitopos con la vacuna EP-2101 formulada a diversas dosis de emulsión del péptido, 3) la variabilidad inter- e intraexperimental de estas respuestas de CTL, 4) las respuestas de la línea de base en animales de control negativo, y 5) la coherencia de la inducción de CTL en animales individuales.

50 Se estableció una especificación del ensayo de potencia para determinar los límites superior e inferior de las respuestas de CTL contra los dos epitopos de potencia inducidas por EP-2101. Para establecer el límite de especificación inferior, la base de datos generada en ratones no expuestos o de emulsión control (placebo) en seis experimentos (18 puntos de datos) se analizaron y se compilaron los valores de SU de todos los cultivos procedentes de ratones de control negativo. El límite inferior de la especificación se estableció calculando primero la media geométrica de la respuesta SU y la SD de todos los cultivos de control negativo, y después calculando un valor de corte de 3 SD. Se calculó que este valor para el epitopo CEA.691H5 es 22 SU (media geométrica x 3 SD = 1,53 x 14,01; con redondeo al siguiente número entero mayor) y 8 SU para el epitopo HER-2/neu.369V2V9 (media geométrica x 3 SD = 0,49 x 14,58). Para una muestra de ensayo concreta de EP-2101 para aprobar la potencia, la media geométrica del valor SU de la actividad CTL de esplenocitos cebados con EP-2101 para ambos epitopos debe ser igual o mayor que su respectiva especificación del límite inferior.

60 Para establecer el límite superior del ensayo, se compilaron los valores de SU de 11 experimentos (32 puntos de datos) generados de ratones inyectados con EP-2101 y se calculó la media geométrica del valor SU de los tres experimentos con valores más altos para cada epitopo. Para el epitopo CEA.691H5, este cálculo produjo un valor de 289,5 SU basado en las respuestas de cultivos individuales de tres experimentos. Para HER-2/neu.369V2V9, la

media geométrica de SU de los tres experimentos con mayor respuesta fue 330,9 SU. Puesto que las respuestas biológicas *in vivo* en sujetos inmunizados con vacunas tienden a generar diferencias significativas a intervalos logarítmicos de dosificación (Vitiello, A., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:341-349 (1995); Pinilla-Ibarz, J., *et al.*, *Blood*, 95:1781-1787 (2000)), se estableció un valor de respuesta de CTL una unidad logarítmica mayor de la media de las mayores respuestas observadas en animales inmunizados con EP-2101 como límite superior de la especificación. Así, el límite superior de la especificación para los dos epitopos se determinó multiplicando la media geométrica del valor SU de los tres experimentos con valores más altos por 10 y después redondeando este valor. Para CEA.691H5, se calculó que este valor era 2.895 SU o 2.900 SU, y para el epitopo HER-2/neu el mismo cálculo produjo un valor de 3.309 SU o 3.300 SU. Una muestra de ensayo concreta de EP-2101 que exceda el límite superior de la especificación de 2.900 SU y 3.300 SU para los epitopos CEA.691H5 y HER-2/neu.369V2V9, respectivamente, suspende el ensayo de potencia debido a problemas relacionados con una actividad inductora de CTL superóptima y una toxicidad potencial.

Cada experimento de potencia también incluye controles de idoneidad del sistema que determinarán la validez de las mediciones de potencia de EP-2101, obtenidos en el experimento. Como control positivo, los ratones se coinmunizarán con cada epitopo de CTL solo y el epitopo PADRE® en una emulsión de Montanide® ISA 51, y las respuestas de CTL en este grupo se controlarán utilizando la misma especificación establecida para el producto de vacuna de EP-2101. Como control negativo, esplenocitos procedentes de ratones no expuestos (no vacunados) se serán estimulados *in vitro* con cada epitopo de CTL bajo condiciones idénticas a los esplenocitos recolectados de ratones inmunizados con EP-2101, y como criterio para un ensayo de potencia válido, las respuestas de CTL en este grupo control no deberían exceder el límite inferior de la especificación para cada epitopo.

Ejemplo 17: Protocolos detallados

Ratones

Se generaron ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b como se ha descrito previamente (Vitiello A., *et al.*, *J. Exp. Med.*, 173:1007-15 (1991)) como una generación F1 de un cruzamiento entre una raza transgénica HLA-A2.1/K^b generada sobre el entorno de C57/BL6 y ratones BALB/c.

Medio de cultivo de células

Todas las células se cultivaron en medio RPMI-1640 con HEPES (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 4 mM, 2-ME 5 x 10⁻⁵ M, piruvato de sodio 0,5 mM, 1x restos aminoácidos no esenciales, estreptomycin 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml (denominado en lo sucesivo medio RPMI-10).

Preparación de emulsiones de péptidos con Montanide ISA 51

Para las preparaciones de emulsiones, los péptidos individuales en la vacuna de EP-2101 se solubilizaron a partir de un polvo liofilizado en la disolución acuosa o de DMSO apropiada y a las concentraciones apropiadas para producir 10, 5 o 2,5 mg/ml de péptido total en la emulsión adyuvante final. Las diferentes disoluciones, los respectivos péptidos formulados en ellas y el método de formulación se describen a continuación.

Disolución 1 (agrupamiento ácido): Los péptidos CEA.691H5, p53.149M2, MAGE3.11215 y PADRE se solubilizaron en ácido acético 0,1875 M. El péptido CEA.691H5 se solubilizó primero mediante una agitación en vórtice durante 2 minutos a alta velocidad, seguido de 5-10 minutos de sonicación (35-40 °C). Los otros péptidos se añadieron uno a uno y se solubilizaron mediante agitación en vórtice durante 1-2 minutos.

Disolución 2 (agrupamiento básico): Los péptidos CEA.24V9, CEA.605D6, HER2.689, MAGE2.157 y p53.139L2B3 se solubilizaron en NaOH 0,1 M. Los péptidos se solubilizaron con facilidad mediante una breve agitación en vórtice (1-2 minutos).

Disolución 3 (DMSO): El péptido HER2.369V2V9 se solubilizó en DMSO con agitación en vórtice (2 minutos) y calentamiento (35-40 °C).

Todas las disoluciones se conservaron a 4 °C hasta que se reunieron para generar el agrupamiento 4 que contiene una mezcla de los 10 péptidos.

Agrupamiento 4 (combinación de las disoluciones 1, 2 y 3): Las disoluciones 1, 2 y 3 se reunieron en una proporción 4:5:1 (en v:v, por ejemplo, 0,8:1:0,2 ml, respectivamente) o en una proporción 3,2:4:1 (en v:v, por ejemplo, 0,8:1:0,25 ml, respectivamente), que produjo la precipitación de algunos péptidos. El agrupamiento combinado se tamponó con 0,2 ml de fosfato de sodio 62,5 mM (pH 7) y el pH se ajustó a pH 7 con NaOH 0,5 M (aproximadamente 178 µl por 2,5 ml del agrupamiento final 4 después de tamponar y de la adición de agua), y después se ajustó el volumen (2,5 ml) con agua para inyección (WFI).

La disolución del agrupamiento 4 final después se combinó 1:1 en v:v con Montanide® ISA 51 (Seppic Inc.) y se emulsionó mediante homogeneización utilizando un homogeneizador Silverson L4RT equipado con una sonda

tubular minimicro de 0,95 cm. Generalmente, se prepara una emulsión de investigación 10 mg/ml en un volumen total de 1,5-5 ml, manteniendo el tubo enfriado en hielo durante la preparación. Inicialmente, la sonda se insertó cuidadosamente en la capa de aceite cerca de la interfase agua/aceite, y la capa de aceite se mezcla a baja velocidad antes de trasladar la sonda al fondo del tubo y ajustar la velocidad a 8.000 rpm. La homogeneización se realizó durante un total de 30 minutos y se produjo una emulsión homogénea elevando y bajando repetidamente el tubo durante este intervalo. El producto emulsionado de EP-2101 final se mantuvo a 4 °C antes de la inyección a los animales.

Se prepararon emulsiones a una dosis de péptido total 2,5 mg/ml y 5 mg/ml a una escala de aproximadamente 25 ml, 500 ml o 1 litro utilizando sondas y tamices de mezclado con un diámetro y un tamaño de poro apropiados.

Se preparó una emulsión placebo (emulsión control) tal como se describió anteriormente, excepto que las disoluciones 1, 2 y 3 no contienen péptidos.

Inmunización de ratones y expansión *in vitro* de CTL cebados *in vivo*

Ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b se inmunizaron con EP-2101 o emulsión placebo por vía subcutánea en la base de la cola en un volumen de inyección de 50-100 µl/animal. De 11 a 14 días después de la inmunización, los animales de cada grupo experimental se sacrificaron y se preparó una suspensión de una única célula a partir de un agrupamiento de bazo de ratón. Los cultivos individuales de esplenocitos (20-25 x 10⁶ células por cultivo) después se estimularon *in vitro* en matraces en vertical de 25 cm² estando representados los epitopos de CTL individuales en EP-2101 (concentración de péptido final 1 µg/ml en 10 ml de medio RPMI-10; se establecen cultivos por duplicado o triplicado por epitopo). Como APC, se añadieron 1-1,25 x 10⁷ blastos activados con LPS irradiados (4000 rad) a cada cultivo. Los blastos con LPS se prepararon estimulando *in vitro* células de bazo de ratones HLA-A2.1/K^b no tratados con LPS 6,25 µg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) y sulfato de dextrano 7 µg/ml (500.000 PM, azufre al 17%, Pharmacia Bioprocess Technology, Uppsala, Suecia) durante 3 días a 37 °C.

Los cultivos de esplenocitos estimulados con el péptido EP-2101 se incubaron durante 6 días a 37 °C en CO₂ al 5% antes de que cada cultivo se midiese para la actividad CTL utilizando un ELISA *in situ* de IFN-γ, según se describe a continuación.

Medición de la actividad CTL

Seis días después del inicio del cultivo, se midió la actividad CTL de los cultivos individuales mediante un ELISA *in situ* de IFN-γ, según se describió previamente (McKinney, D.M., *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 237:105 (2000)). Brevemente, se añadieron células efectoras CTL (4 x 10⁵) a 4 o 6 pocillos en una placa de 96 pocillos (de fondo plano, prerrevestido con un anticuerpo monoclonal de captura anti-IFN-γ). Las células después se diluyen en serie en 4 veces en medio RPMI-10 hasta que se logra una concentración final de 391 células/pocillo. Entonces se añadieron células tumorales Jurkat-A2.1/K^b (10⁵/pocillo) a cada pocillo. La mitad de los pocillos en cada duplicado (las células se cultivan en duplicados de 6 o 4 pocillos) recibieron 10 µg/ml del péptido de CTL y los pocillos restantes recibieron medio. Después de una incubación durante la noche, los pocillos se lavaron y se revelaron para determinar el contenido en IFN-γ mediante un tratamiento secuencial con un anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ biotinilado secundario, estreptavidina, peroxidasa y, por último, sustrato. Se calcularon los pg de IFN-γ liberados por pocillo por los CTL en presencia o ausencia de péptido midiendo la absorbancia con un lector de ELISA automático y extrapolando la concentración de IFN-γ de una curva patrón. Los datos se expresan en unidades secretoras (SU) calculadas mediante el método descrito por McKinney *et al.* (McKinney, D.M., *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 237:105 (2000)). Una unidad secretora se define como la liberación de 100 pg/pocillo de IFN-γ por 10⁶ células efectoras.

Medición de la inducción de CTL y HTL mediante el ensayo ELISPOT

Se realizaron ensayos ELISPOT para medir las respuestas de CTL o HTL inducidas por EP-2101 según protocolos previamente publicados (Lewis J.J., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 81:391 (1998)). Brevemente, placas de nitrocelulosa de 96 pocillos de fondo plano (IP, Millipore) se revistieron con mAb IFN-γ (10 µg/ml, clon R4-6A2, PharMingen) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de lavar con PBS, las placas se bloquearon con medio RPMI-10 durante 1 h a 37 °C. Se añadieron 4 x 10⁵ células CD8⁺ o células CD4⁺ (aisladas con el sistema de aislamiento Miltenyi a partir de esplenocitos inmunizados con EP-2101) y 5 x 10⁴ células Jurkat-A2.1/K^b (para las células CD8⁺) o 10⁵ células esplénicas no expuestas γ-irradiadas (para las células CD4⁺, tratadas con tampón de lisis de eritrocitos) a cada pocillo. Los pocillos también recibieron 10 µg/ml de péptido CTL o HTL para ensayar la inducción de respuestas contra epitopos de EP-2101 o una concentración idéntica de un péptido irrelevante. El péptido irrelevante para el ensayo ELISPOT de CD8 es el péptido 132 del núcleo de HCV (DLMGYIPLV (SEQ ID NO:_) y el péptido NS3.1253 de HCV (GYKVLVLNPSVAATL (SEQ ID NO:_) para el ensayo ELISPOT de CD4. Después de una incubación, las placas se lavaron a fondo con PBS/Tween 20 al 0,05% y se añadió mAb de IFN-γ biotinilado (2 µg/ml, clon XMG1.2, PharMingen) a cada pocillo y se incubó durante 2-4 h a 37 °C. Después de lavar cuatro veces con PBS/Tween 20 al 0,05%, se añadió la peroxidasa Vectastain ABC (kit Vectastain Elite, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, EEUU) a los pocillos y las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se volvieron a lavar de nuevo 3 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%, seguido de 3 lavados con PBS. Se

5

añadieron 100 µl de una disolución AEC (Sigma Chemical Co.) para revelar las manchas. La reacción se detuvo después de 4-6 minutos bajo el agua del grifo. Las manchas se contaron mediante un análisis de imágenes por ordenador (Zeiss KS ELISPOT Reader, Jena, Alemania). Se calculó el número neto de manchas/10⁶ células CD8⁺ o células CD4⁺ como (número de manchas contra el péptido pertinente) - (número de manchas con péptido control irrelevante) x 2,5.

Tabla 1: Secuencia de los péptidos en la sustancia de fármaco

Identificación del péptido	Secuencia	Epitopo	Tipo
965.10 (SEQ ID NO:1)	aKXVAAWTLKAAa	PADRE®	Epitopo de células T auxiliares universal
1013.08 (SEQ ID NO:2)	RLLQETELV	HER-2/neu.689	Tipo salvaje
1090.01 (SEQ ID NO:3)	YLQLVFGIEV	MAGE2.157	Tipo salvaje
1243.08 (SEQ ID NO:4)	LLTFWNPPV	CEA.24V9	Análogo de anclaje fijado
1295.03 (SEQ ID NO:5)	SMPPPGTRV	p53.149M2	Análogo de anclaje fijado
1323.06 (SEQ ID NO:6)	KLBPVQLWV	p53.139L2B3	Análogo de anclaje fijado
1334.10 (SEQ ID NO:7)	KVFGSLAFV	HER-2/neu.369V2V9	Análogo de anclaje fijado
1350.01 (SEQ ID NO:8)	YLSGADLNL	CEA.605D6	Análogo heteroclitico
1352.02 (SEQ ID NO:9)	IMIGHLVGV	CEA.691H5	Análogo heteroclitico
1352.03 (SEQ ID NO:10)	KVAEIVHFL	MAGE-3.11215	Análogo heteroclitico

a = d-alanina, B = ácido α-aminoisobutírico, X = ciclohexilalanina

Tabla 2: Visión de conjunto de las estrategias de vacunas del cáncer actuales

Estrategia	Descripción	Problemas	Puntos fuertes
Vacunas de células completas	Implican la administración de células cancerosas completas que actúan para potenciar la respuesta inmunológica.	<ul style="list-style-type: none"> - A menudo es difícil obtener células tumorales. - Variabilidad entre pacientes. - Producto para pacientes individuales. - Tienen una concentración relativamente baja de epitopos de TAA pertinentes. 	- Es probable que presente nuevos TAA.
Vacunas de lisados celulares	Consisten en partículas de membranas de células cancerosas alogeneicas lisadas que son ingeridas por macrófagos y presentadas como antígenos tumorales a las células efectoras.	<ul style="list-style-type: none"> - A menudo es difícil obtener células tumorales. - Variabilidad entre pacientes. - Producto para pacientes individuales. - Tienen una concentración relativamente baja de epitopos de TAA pertinentes. 	- Es probable que presente nuevos TAA.

ES 2 456 666 T3

Estrategia	Descripción	Problemas	Puntos fuertes
Vacunas idiotópicas	Contienen proteínas derivadas de tumores de pacientes individuales o de tipos de tumores específicos.	<ul style="list-style-type: none"> - A menudo es difícil obtener células tumorales. - Variabilidad entre pacientes. - Producto para pacientes individuales. - Tienen una concentración relativamente baja de epitopos de TAA pertinentes. 	- TAA específicos.
Vacunas de antígenos completos		<ul style="list-style-type: none"> - Cobertura de la enfermedad limitada. - Difícil de romper la tolerancia. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pueden inducirse respuestas inmunológicas "naturales" complejas. - Fabricación relativamente sencilla de un único compuesto.
Vacunas de oncolisados víricos	Consisten en una célula cancerosa infectada por un virus de vaccina, lisada para formar segmentos de membranas que expresan antígenos de vaccina y de la célula cancerosa.	<ul style="list-style-type: none"> - A menudo es difícil obtener células tumorales. - No siempre es posible infectar células cancerosas. - Tratamiento específico para el paciente. - Tienen una concentración relativamente baja de epitopos de TAA pertinentes. 	
Vacunas de antígenos desprendidos	Similares a las vacunas de células completas y de lisados, pero están parcialmente purificadas.	<ul style="list-style-type: none"> - Es difícil purificar los antígenos. - Tratamiento específico para el paciente. - Tienen una concentración relativamente baja de epitopos de TAA pertinentes. 	- Es probable que presente nuevos TAA.
Vacunas de células tumorales genéticamente modificadas	Se están explorando una serie de vías, que incluyen la transducción de células con GM-CSF.	<ul style="list-style-type: none"> - Es muy difícil obtener tejidos tumorales y cultivarlos para permitir una transducción estable. - Tratamiento específico para el paciente. 	- Las células contienen nuevos TAA y adyuvantes.

Estrategia	Descripción	Problemas	Puntos fuertes
Vacunas de péptidos	Se producen péptidos sintéticos que se corresponden con antígenos asociados a tumores. Están diseñadas para estimular una respuesta de células T citotóxicas (CTL).	<ul style="list-style-type: none"> - Es necesario escoger los péptidos correctos para inducir una respuesta inmunológica eficaz. - Restricción al subtipo de HLA o a supertipos de HLA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se emplea una única preparación para múltiples pacientes y quizás múltiples enfermedades. - Es posible combinar diversos antígenos/dianas. - Producción de antígenos reproducible. - Capaz de romper la tolerancia. - Capaz de inducir respuestas a epitopos subdominantes. - Puede dirigirse a supertipos para una amplia cobertura de la población.
Vacunas de carbohidratos	Son carbohidratos asociados a tumores producidos de modo sintéticos, diseñados para estimular una respuesta de anticuerpos contra los antígenos de carbohidratos.	<ul style="list-style-type: none"> - Puede ser necesaria una respuesta de CTL, además de una respuesta humoral. - Los antígenos de carbohidratos son dependientes de HLA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se emplea una única preparación para múltiples pacientes y quizás múltiples enfermedades.

Tabla 3

SUPERMOTIVOS	POSICIÓN 2 (anclaje primario)	POSICIÓN 3 (anclaje primario)	POSICIÓN C-terminal (anclaje primario)
A1	T, I, L, V, M, S		F, W, Y
A2	L, I, V, M, A, T, Q		I, V, M, A, T, L
A3	V, S, M, A, T, L, I		R, K
A24	Y, F, W, I, V, L, M, T		F, I, Y, W, L, M
B7	P		V, I, L, F, M, W, Y, A
B27	R, H, K		F, Y, L, W, M, I, V, A
B44	E, D		F, W, Y, L, I, M, V, A
B58	A, T, S		F, W, Y, L, I, V, M, A
B62	Q, L, I, V, M, P		F, W, Y, M, I, V, L, A
MOTIVOS			
A1	T, S, M		Y
A1		D, E, A, S	Y
A2.1	L, M, V, Q, I, A, T		V, L, I, M, A, T
A3	L, M, V, I, S, A, T, F, C, G,		K, Y, R, H, F, A

ES 2 456 666 T3

SUPERMOTIVOS	POSICIÓN 2 (anclaje primario)	POSICIÓN 3 (anclaje primario)	POSICIÓN C-terminal (anclaje primario)
	<i>D</i>		
A11	V, T, M, L, I, S, A, G, N, C, <i>D, F</i>		K, R, Y, H
A24	Y, F, W, M		F, L, I, W
A*3101	M, V, T, A, L, I, S		R, K
A*3301	M, V, A, L, F, I, S, T		R, K
A*6801	A, V, T, M, S, L, I		R, K
B*0702	P		L, M, F, W, Y, A, I, V
B*3501	P		L, M, F, W, Y, I, V, A
B51	P		L, I, V, F, W, Y, A, M
B*5301	P		I, M, F, W, Y, A, L, V
B*5401	P		A, T, I, V, L, M, F, W, Y

Los restos en negrita son los preferidos, los restos en cursiva son menos preferidos. Se considera que un péptido porta un motivo si tiene anclajes primarios en cada posición de anclaje primario para un motivo o supermotivo, según se especifica en la anterior tabla.

5

Tabla 3a

SUPERMOTIVOS	POSICIÓN 2 (anclaje primario)	POSICIÓN 3 (anclaje primario)	POSICIÓN C-terminal (anclaje primario)
A1	T, I, L, V, M, S		F, W, Y
A2	V, Q, A, T		I, V, L, M, A, T
A3	V, S, M, A, T, L, I		R, K
A24	Y, F, W, I, V, L, M, T		F, I, Y, W, L, M
B7	P		V, I, L, F, M, W, Y, A
B27	R, H, K		F, Y, L, W, M, I, V, A
B58	A, T, S		F, W, Y, L, I, V, M, A
B62	Q, L, I, V, M, P		F, W, Y, M, I, V, L, A
MOTIVOS			
A1	T, S, M		Y
A1		D, E, A, S	Y
A2.1	<i>V, Q, A, T*</i>		V, L, I, M, A, T
A3.2	L, M, V, I, S, A, T, F, C, G, <i>D</i>		K, Y, R, H, F, A
A11	V, T, M, L, I, S, A, G, N, C, <i>D, F</i>		K, R, Y, H
A24	Y, F, W		F, L, I, W

ES 2 456 666 T3

* Si 2 es V o Q, el C-terminal no es L.

Los restos en **negrita** son los preferidos, los restos en *cursiva* son menos preferidos. Se considera que un péptido porta un motivo si tiene anclajes primarios en cada posición de anclaje primario para un motivo o supermotivo, según se especifica en la anterior tabla.

5

TABLA 4



SUPERMOTIVOS

A1	1° anclaje T,I,L,V,M,S	1° anclaje F,W,Y	
A2	1° anclaje L,I,V,M,A, T,Q	1° anclaje L,I,V,M,A,T	
A3	preferidos 1° anclaje V,S,M,A,T, L,I	Y,F,W (4/5) Y,F,W (4/5) Y,F,W (4/5) P, (4/5)	1° anclaje R,K
	perjudiciales D,E (3/5); P, (5/5)	D,E (4/5)	
A24	1° anclaje Y,F,W,I,V, L,M,T	1° anclaje F,I,Y,W,L,M	
B7	preferidos F,W,Y (5/5) L,I,V,M (3/5)	1° anclaje P	1° anclaje F,W,Y, (3/5) V,I,L,F,M,W,Y,A
	perjudiciales D,E (3/5); P(5/5); G(4/5); A(3/5); Q,N, (3/5)	D,E, (3/5) G, (4/5) Q,N, (4/5) D,E, (4/5)	
B27	1° anclaje R,H,K	1° anclaje F,Y,L,W,M,V,A	
B44	1° anclaje E,D	1° anclaje F,W,Y,L,I,M,V,A	
	1° anclaje	1° anclaje	

TABLA 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	C-terminal
B58		A,T,S							F,W,Y,L,I,V,M,A
B62		I° anclaje Q,L,I,V,M, P							I° anclaje F,W,Y,M,I,V,L,A

TABLA 4 (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	0	C-terminal
MOTIVOS										C-terminal
A1 preferidos 9-micro	G,F,Y,W,	I° anclaje S,T,M,	D,E,A,	Y,F,W,	P,	D,E,Q,N,	Y,F,W,	I° anclaje Y		
perjudiciales	D,E,	R,H,K,L,I,V M,P,	A,	G,	A,					
A1 preferidos 9-micro	G,R,H,K	A,S,T,C,L,I V,M,	I° anclaje D,E,A,S	G,S,T,C,	A,S,T,C,	L,I,V,M,	D,E,	I° anclaje Y		
perjudiciales	A	R,H,K,D,E, P,Y,F,W,	D,E,	P,Q,N,	R,H,K,	P,G,	G,P,			

TABLA 4 (continuación)

		POSICIÓN									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-terminal
A1	preferidos	Y,F,W,	<u>1° anclaje</u> S,T,M	D,E,A,Q,N,	A,	Y,F,W,Q,N	P,A,S,T,C,	G,D,E,	P,	<u>1° anclaje</u> Y	
	perjudiciales	G,P,	R,H,K,G,L,I, V,M,	D,E,	R,H,K,	Q,N,A	R,H,K,Y,F, W,	R,H,K,	A		
A1	preferidos	Y,F,W,	<u>1° anclaje</u> M,	S,T,C,L,I,V	A,	Y,F,W,	P,G,	G,	Y,F,W,	<u>1° anclaje</u> Y	
	perjudiciales	R,H,K,	R,H,K,D,E, P,Y,F,W,		P,	G,		P,R,H,K,	Q,N,		
A2.1	preferidos	Y,F,W,	<u>1° anclaje</u> L,M,I,V,Q, A,T	Y,F,W,	S,T,C,	Y,F,W,	A,	P	<u>1° anclaje</u> V,L,I,M,A,T		
	perjudiciales	D,E,P,	D,E,R,K,H		R,K,H,	R,K,H	D,E,R,K,H				
A2.1	preferidos	A,Y,F,W	<u>1° anclaje</u> L,M,I,V,Q, A,T	L,V,I,M,	G,	G,		F,Y,W,L, V,I,M,	<u>1° anclaje</u> V,L,I,M,A, T		
	perjudiciales	D,E,P,	D,E,	R,K,H,A,	P,	R,K,H,	D,E,R,K, H				

TABLA 4 (continuación)

		POSICIÓN										C-terminal
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0
A3	preferidos	R,H,K	1° anclaje L,M,V,I,S, A,T,F,C,G, D	Y,F,W	P,R,H,K, Y,F,W	A	Y,F,W		P			1° anclaje K,Y,R,H,F, A
	perjudiciales	D,E,P	D,E									
A11	preferidos	A	1° anclaje V,T,L,M,I, S,A,G,N,C, D,F	Y,F,W	Y,F,W	A	Y,F,W	Y,FW	P			1° anclaje K,,R,Y,H
	perjudiciales	D,E,P					A		G			
A24 9-micro	preferidos	Y,F,W,R,H,K	1° anclaje Y,F,W,M		S,T,C		Y,F,W	Y,F,W	Y,F,W			1° anclaje F,L,I,W
	perjudiciales	D,E,G	D,E		G	Q,N,P	D,E,R,H,K	G	A,Q,N			
A24 10-micro	preferidos		1° anclaje Y,F,W,M		P	Y,F,W,P		P				1° anclaje F,L,I,W
	perjudiciales		G,D,E		Q,N	R,H,K	D,E	A	Q,N			D,E,A
A3101	preferidos	R,H,K	1° anclaje M,V,T,A,L, I,S	Y,F,W	P		Y,F,W	Y,F,W	A,P			1° anclaje R,K

TABLA 4 (continuación)

		POSICIÓN							C-terminal			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	C-terminal
perjudiciales	D,E,P,			D,E,		A,D,E,	D,E,	D,E,	D,E,			
A3301	preferidos		1° anclaje M,V,A,L,F, I,S,T	Y,F,W			A,Y,F,W					1° anclaje R,K
perjudiciales	G,P		D,E									
A6801	preferidos	Y,F,W,S,T,C,	1° anclaje A,V,T,M,S, L,I		Y,F,W,L,I, V,M		Y,F,W,	P,				1° anclaje R,K
perjudiciales	G,P,		D,E,G,		R,H,K,			A,				
B0702	preferidos	R,H,K,F,W,Y,	1° anclaje P	R,H,K,	R,H,K,	R,H,K,	R,H,K,	P,A,				1° anclaje L,M,F,W,Y, A,I,Y
perjudiciales	D,E,Q,N,P,		D,E,P,	D,E,	D,E,	G,D,E,	Q,N,	D,E,				
B3501	preferidos	F,W,Y,L,I,V,M,	1° anclaje P	F,W,Y,			F,W,Y,					1° anclaje L,M,F,W,Y, J,Y,A
perjudiciales	A,G,P,		G,	G,								

TABLA 4 (continuación)

		POSICIÓN									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-terminal
B51	preferidos	L,I,V,M,F,W,Y, S,T,C	L° anclaje P	F,W,Y, S,T,C	F,W,Y, S,T,C	F,W,Y, S,T,C	F,W,Y, S,T,C	G,	F,W,Y,	F,W,Y, L,I,V,F,W, Y,A,M	C-terminal L° anclaje
	perjudiciales	A,G,P,D,E,R,H,K, S,T,C			D,E, G,	D,E,	G,	D,E,Q,N,	G,D,E,		
B5301	preferidos	L,I,V,M,F,W,Y, P	L° anclaje P	F,W,Y, S,T,C	F,W,Y, S,T,C	F,W,Y, S,T,C	F,W,Y, S,T,C	L,I,V,M,F, W,Y	F,W,Y,	F,W,Y, L,I,V,F,W,Y, A,L,Y	L° anclaje
	perjudiciales	A,G,P,Q,N,			G,			R,H,K,Q,N,	D,E,		
B5401	preferidos	F,W,Y, P	L° anclaje P	F,W,Y,L,I,V, M,	L,I,V,M,	L,I,V,M,	L,I,V,M,	A,L,I,V,M,	F,W,Y,A,P,	F,W,Y,A,P, A,T,I,V,L, M,F,W,Y	L° anclaje
	perjudiciales	G,P,Q,N,D,E,		G,D,E,S,T,C,	R,H,K,D,E,	D,E,		Q,N,D,G,E,	D,E,		

Los restos en cursiva indican los restos menos preferidos o "tolerados".

La información en la tabla II es específica para 9-meros, a menos que se indique lo contrario.

Las especificidades de anclaje secundario se indican para cada posición independientemente.

Tabla 5: Expresión de antígenos asociados a tumores (TAA)

TAA	% de tumores que expresan el TAA		
	Cáncer de colon	Cáncer de mama	Cáncer de pulmón
CEA	95	50	70
p53	50	50	40-60
MAGE 2/3	20-30	20-30	35
HER-2/neu	28-50	30-50	20-30
Total	99	86-91	91-95

Tabla 6

Supertipo de HLA	Miembros del supertipo de HLA específicos de alelo	
	Verificado ^a	Predicho ^b
A1	A*0101, A*2501, A*2601, A*2602, A*3201, A*2902	A*0102, A*2604, A*3601, A*4301, A*8001
A2	A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*0209, A*0214, A*6802, A*6901	A*0208, A*0210, A*0211, A*0212, A*0213
A3	A*0301, A*1101, A*3101, A*3301, A*6801	A*0302, A* 1102, A*2603, A*3302, A*3303, A*3401, A*3402, A*6601, A*6602, A*7401
A24	A*2301, A*2402, A*3001	A*2403, A*2404, A*3002, A*3003
B7	B*0702, B*0703, B*0704, B*0705, B*1508, B*3501, B*3502, B*3503, B*3503, B*3504, B*3505, B*3506, B*3507, B*3508, B*5101, B*5102, B*5103, B*5104, B*5105, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*5602, B*6701, B*7801	B*1511, B*4201, B*5901
B27	B*1401, B*1402, B*1509, B*2702, B*2703, B*2704, B*2705, B*2706, B*3801, B*3901, B*3902, B*7301	B*2701, B*2707, B*2708, B*3802, B*3903, B*3904, B*3905, B*4801, B*4802, B*1510, B*1518, B*1503
B44	B*1801, B*1802, B*3701, B*4402, B*4403, B*4404, B*4001, B*4002, B*4006	B*4101, B*4501, B*4701, B*4901, B*5001
B58	B*5701, B*5702, B*5801, B*5802, B*1516, B*1517	
B62	B*1501, B*1502, B*1513, B*5201	B*1301, B*1302, B*1504, B*1505, B*1506, B*1507, B*1515, B*1520, B*1521, B*1512, B*1514, B*1510

5 ^a Los alelos verificados incluyen los alelos cuya especificidad ha sido demostrada mediante análisis de secuenciación del agrupamiento, ensayos de unión de péptidos o mediante el análisis de las secuencias de los epitopos CTL.

^b Los alelos predichos son alelos cuya especificidad se predice basándose en la estructura del bolsillo B y G que se solapa con la especificidad del supertipo.

Tabla 7: Expresión de antígenos asociados a tumores (TAA)

TAA	% de tumores que expresan el TAA		
	Cáncer de colon	Cáncer de mama	Cáncer de pulmón
CEA	95	50	70
p53	50	50	40-60
MAGE 2/3	20-30	20-30	35
HER-2/neu	28-50	30-50	20-30
Total	99	86-91	91-95

Tabla 8: Incidencia y tasa de supervivencia de pacientes con cáncer de mama, colon o pulmón en EEUU

	Nuevos casos calculados 1998	Muertes calculadas 1998	Tasas de supervivencia con relación a 5 años		
			1974-76	1980-82	1986-1993
Mama	180.300	43.900	75%	77%	80%
Colon	95.600	47.700	50%	56%	63%
Pulmón	171.500	160.100	12%	14%	14%

5 Fuente: Cancer Statistics, 1998, enero/febrero de 1998, vol. 48, n.º 1

Tabla 9: Cobertura de población por los epitopos del supertipo de HLA de clase I

Supertipo	Frecuencia alélica mínima						
	Moléculas HLA representativas*	Caucásicos	Negros	Japoneses	Chinos	Hispanos	Media
A2	2,1, 2,2, 2,3, 2,5, 2,6, 2,7, 68,02	45,8	39,0	42,4	45,9	43,0	43,2
A3	3, 11, 31, 33, 68,01	37,5	42,1	45,8	52,7	43,1	44,2
B7	7, 51, 53, 35, 54	43,2	55,1	57,1	43,0	49,3	49,5
Cobertura de población total		84,3	86,8	89,5	89,8	86,8	87,4

Tabla 10: Genes y antígenos asociados a tumores (TAA)

Antígeno	Referencia bibliográfica
MAGE 1	Traversari C., Boon T., J. Ex. Med., 176:1453, 1992
MAGE 2	De Smet C., Boon T., Immunogenetics, 39(2):121-129, 1994
MAGE 3	Gaugler B., Boon T., J. Ex. Med., 179: 921, 1994
MAGE-11	Jurk M., Winnacker L., Int. J. Cancer, 75, 762-766, 1998
MAGE-A10	Huang L., Van Pel A., J. Immunology, 162:6849-6854
BAGE	Boel P., Bruggen V., Immunity, 2:167, 1995

ES 2 456 666 T3

Antígeno	Referencia bibliográfica
GAGE	Eynde V., Boon T., J. Exp. Med., 182:689, 1995
RAGE	Gaugler B., Eynde V., Immunogenetics, 44:325, 1996
MAGE-C1	Lucas S., Boon T., Cancer Research, 58, 743-752, 1998
LAGE-1	Lethel B., Boon T., Int. J. Cancer, 10; 76(6), 903-908
CAG-3	Wang R., Rosenberg S., J. Immunology, 161:3591-3596, 1998
DAM	Fleischhauer K., Traversari C., Cancer Research, 58, 14, 2969, 1998
MUC1	Karanikas V., McKenzie I.F., J. Clinical Investigation, 100:11, 1-10, 1997
MUC2	Bohm C., Hanski, Int. J. Cancer, 75, 688-693, 1998
MUC18	Putz E., Pantel K., Cancer Res., 59(1):241-248, 1999
NY-ES0-1	Chen Y., Old L.J., PNAS, 94, 1914-1918, 1997
MUM-1	Coulie P., Boon T., PNAS 92:7976, 1995
CDK4	Wolfel T., Beach D., Science, 269:1281, 1995
BRCA2	Wooster R., Stratton M., Nature, 378, 789-791, 1995
NY-LU-1	Gure A., Chen, Cancer Research, 58, 1034-1041, 1998
NY-LU-7	Gure A., Chen, Cancer Research, 58, 1034-1041, 1998
NY-LU-12	Gure A., Chen, Cancer Research, 58, 1034-1041, 1998
CASP8	Mandrizzato S., Bruggen P., J. Ex. Med., 186, 5, 785-793, 1997
RAS	Sidransky L., Vogelstei B., Science, 256:102
KIAA0205	Gueguen M., Eynde, J. Immunology, 160:6188-6194, 1998
SCCs	Molina R., Ballesta A.M., Tumor Biol., 17(2):81-89, 1996
p53	Hollstein M., Harris C.C., Science, 253, 49-53, 1991
p73	Kaghad M., Caput D., Cell, 90(4):809-819, 1997
CEA	Muraro R., Schlom J., Cancer Research, 45:5769-55780, 1985
Her-2/neu	Disis M., Cheever M, Cancer Res 54:1071, 1994
Melan-A	Coulie P., Boon T., J. Ex. Med., 180:35, 1994
gp100	Bakker A., Figdor, J. Ex. Med., 179:1005, 1994
tirosinasa	Wolfel T., Boon T., E. J. I., 24:759, 1994
TRP2	Wang R., Rosenberg S.A., J. Ex. Med., 184:2207, 1996
gp75/TRPI	Wang R, Rosenberg S.A., J. Ex. Med., 183:1131, 1996
PSM	Pinto J.T., Heston W.D.W., Clin. Cancer Res., 2(9), 1445-1451, 1996
PSA	Correale P., Tsang K., J. Natl. Cancer Institute, 89:293-300, 1997
PT1-1	Sun Y., Fisher P.B., Cancer Research, 57(1):18-23, 1997
B-catenina	Robbins P., Rosenberg S.A., J. Ex. Med., 183:1185, 1996
PRAME	Neumann E., Seliger B., Cancer Research, 58, 4090-4095, 1998

ES 2 456 666 T3

Antígeno	Referencia bibliográfica
telomerasa	Kishimoto K., Okamoto E., J. Surg. Oncol., 69(3): 119-124, 1998
FAK	Kornberg L.J., Head Neck, 20(8):745-752, 1998
antígeno Tn	Wang B.I., J. Submicrosc. Cytol. Path., 30(4):503-509, 1998
proteína ciclina D1	Linggui K., Yaowu Z., Cancer Lett., 130(1-2), 93-101, 1998
NOEY2	Yu Y., Bat. R.C., PNAS, 96(1):214-219, 1999
EGF-R	Biesterfeld S., Cancer Weekly, 15 de febrero, 1999
SART-1	Matsumoto H., Itoh K., Japanese Journal of Cancer Research, 59, is. 12, 1292-1295, 1998
CAPB	Cancer Weekly, 29 de marzo, 4-5, 1999
HPVE7	Rosenberg S.A., Immunity, 10, 282-287, 1999
p15	Rosenberg S.A., Immunity, 10, 282-287, 1999
receptor de folato	Gruner B.A., Weitman S.D., Investigational New Drugs, vol. 16, is. 3, 205-219, 1998
CDC27	Wang R.F., Rosenberg S.A., Science, vol. 284, 1351-1354, 1999
PAGE-1	Chen, J. Biol. Chem., 273:17618-17625, 1998
PAGE-4	Brinkmann, PNAS, 95:10757, 1998
calicreína 2	Darsom, Urology, 49:857-862, 1997
PSCA	Reiter R., PNAS, 95:1735-1740, 1998
DD3	Bussemakers M.J.G., European Urology, 35:408-412, 1999
RBP-1	Takahashi T., British Journal of Cancer, 81(2):342-349, 1999
RU2	Eybde V.D., J. Exp. Med., 190(12):1793-1799, 1999
proteína de unión a folato	Kim D., Anticancer Research, 19:2907-2916, 1999
EGP-2	Heidenreich R., Human Gene Therapy, 11:9-19, 2000

Tabla 11: Secuencias de antígenos asociados a tumores (TAA)

CEA SEQ ID NO: 11

MESPSAPPHRWCIWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEV
 LLLVHNLQPQLHFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIHPNASL
 LIQNIHQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVA
 FTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSRLQLSNGNRRLTLFNVTRNDTASYKCETQ
 NPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWVFN
 GTFQOSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRRTVTITVYAEPPKPFITSNN
 SNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSRLQLSNDNRRLTLLSVTRN
 DVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSSLSCHAASN
 PPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTTITVSA
 ELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSRLQLSNGN
 RRLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGA
 NLNLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRN
 NSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

Her2/neu SEQ ID NO: 12

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRRLPASPETHLDMLRHL
 YQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIHNSQVRQVPLQRLRIVRG
 TQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNP
 QLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQS
 LTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFNHSGICELHC
 PALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNEQVT
 AEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLP
 ESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRI
 LHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPH
 QALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEE
 CRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCV
 ARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLT
 SIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQKIRKYTMRLLQETELVEPLTPSGAMPNQ
 AQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKAN
 KEILDEAYVMAGVGSYVSRLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLG
 SQDLLNWCMIQAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDI
 DETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDG
 IPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFREL VSEFSRMARD
 PQRVVIQNE DLGPASPLDSTFYRSLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAP
 GAGGMVHHRHRSSSTRSGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLG
 MGAAGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVR
 PQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFVAFGGAVENPEYLTPOG
 GAAPQHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV

MAGE2 SEQ ID NO: 13

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQQTASSSSTLVEVTL
GEVPAADSPSPPHSPQGASSFSTTINYTLWRQSDEGSSNQEEEGPRMFPDLESEFQ
AAISRKMVELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLESVLRNCQDFFPVIFSKASEYLQLV
FGIEVVEVVPISHLYILVTCLGLSYDGLLDGNQVMPKTGLLIIVLAIHAIIEGDCAPEE
KIWEELSMLEVFEGREDSVFAHPRKLLMQDLVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW
GPRALIETSYVKVLHHTLKIGGEPHISYPPLHERALREGEE

MAGE3 SEQ ID NO: 14

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSSTLVEVTL
GEVPAAESPDPPQSPQGASSLPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQ
AALSRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFFPVIFSKASSSLQL
VFGIELMEVDPIGHLIYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPKAGLLIIVLAIHAIAREGDCAP
EEDIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFL
WGPRALVETSYVKVLHMHMVKISGGPHISYPPLHEWVLRREGEE

p53 SEQ ID NO: 15

MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIE
QWFTEDPGPDEAPRMPEAAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGS
YGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAM
AIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHS
VVVPYEPPEVGSDCCTTIHYNMCMSSCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFE
VRVCACPGRDRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGE
YFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHK
KLMFKTEGPDS

Tabla 12: Proteína del núcleo del virus de la hepatitis B (SEQ ID NO:16)

MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSV
RDLLDTASALYREALESPHHTALRQAILCWGELMTLATWVGVNLEDPAS
RDLVVSIVNTNMGLKFRQLLWFHISCLTFGRETVIEYLVSFVWIRTTPPAYRPPN
APILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTPSRRRRRSQSPRRRRRSQSRESQC

Tabla 13: Alelos de la familia del supertipo HLA-A2

Alelo prototipo	Otros alelos del supertipo
HLA-A*0201	HLA-A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*6802, A*6901

Tabla 14: Lista de epitopos de vacunas

Epitopo	Secuencia	Número del péptido	n.º de alelos A2 con unión cruzada ¹	Respuesta CTL		Referencia para el epitopo de tipo salvaje o análogo
				péptido de tipo salvaje	célula tumoral	
Epitopos de tipo salvaje						
HER-2/neu.689	RLQETELV	1013.08	2	+	+	Knutson K., 2001; Rongcun Y., 1999
MAGE-2.157	YLQLVFGIEV	1090.01	4	+	+	Visseren M.J., 1997; Kawashima I., 1998
Análogos de anclaje fijado						
CEA.24V9	LLTFWNPPV	1243.08	4	+	+	Kawashima I., 1998
HER-2/neu.369V2V9	KVFGSLAFV	1334.10	4	+	+	Keogh E., 2001
p53.139L2B3	KLBPVQLWV ²	1323.06	4	+	+	Keogh E., 2001
p53.149M2	SMPPPGTRV	1295.03	4	+	+	Keogh E., 2001; Petersen T.R., 2001
Análogos heteroclíticos						
CEA.691H5	IMIGHLVGV	1352.02	5	+	+	Tangri S., 2001
MAGE-3.11215	KVAEIVHFL	1352.03	5	+	+	Tangri S., 2001
CEA.605D6	YLSGADLNL	1350.01	3	+	+	Zaremba S., 1997
Epitopo de células T auxiliares universal						
PADRE	aKXVAAWTLKAAa ³	965.10				Alexander J., 1994

¹ Todos los péptidos se unen a la molécula HLA-A2.1 prototipo

² B indica el ácido α -aminoisobutírico.

³ X indica ciclohexilalanina y a indica d-alanina.

5

Tabla 15: Solubilidad de los péptidos

Péptido	Condiciones ácidas (pH 2-4) ¹	Condiciones básicas (pH 9,6-13) ²	DMSO
965.10	+	- ³	+
1013.08	+/- ⁴	+	+
1090.01	- ³	+	+

Péptido	Condiciones ácidas (pH 2-4) ¹	Condiciones básicas (pH 9,6-13) ²	DMSO
1243.08	+ ⁶	+	+
1295.03	+	+ ⁷	+
1323.06	+ ⁶	+	+
1334.10	+	-	+
1350.01	+ ⁶	+	+
1352.02	+	-	+
1352.03	+	+ ⁷	+

1. TFA al 0,1%, ácido acético 0,15-0,1875 M, acetato de sodio 25 mM pH 4

2. arginina 25 mM pH 9,6, bicarbonato de sodio 25 mM pH 9,6, NaOH 0,1 M

3. No ensayado en NaOH 0,1 M, se supone insoluble puesto que no es soluble bajo otras condiciones básicas.

4. No soluble en tampón acetato pH 4.

5. No ensayado en ácido acético diluido, se supone insoluble bajo estas condiciones puesto que es insoluble bajo otras condiciones ácidas.

6. No ensayado en ácido acético diluido, se supone soluble bajo estas condiciones puesto que es soluble en TFA al 0,1%.

10. 7. No ensayado en NaOH 0,1 M, se supone soluble bajo estas condiciones puesto que es soluble en otros tampones básicos.

Tabla 16: Especificaciones de liberación de péptidos componentes de la sustancia fármaco a granel

Nombre del ensayo	Método de ensayo	Especificación
Aspecto	Visual	polvo blanco a blancuzco
Identidad	Espectrometría de masas	peso molecular
	Espectrometría de masas en tandem	secuencia del péptido
	Análisis de aminoácidos	composición de aminoácidos
Pureza	HPLC	≥ 90%
Contenido en acetato	Cromatografía iónica	resultado del informe
Contenido en péptidos	AAA o UV	resultados del informe
Volátiles orgánicos residuales	USP 24 <467>	isopropanol ≤ 300 ppm
	USP 24 <467>	cloruro de metileno ≤ 20 ppm
	USP 24 <467>	acetoneitrilo ≤ 100 ppm
Contenido en agua	USP 24 <921>	resultados del informe
Endotoxinas	USP 24 <85>	≤ 0,5 EU/mg
Biocarga	USP 24 <61>	resultados del informe
Flúor total	Combustión/ISE	resultados del informe
Equilibrio de masas total	Cálculo de NPC + HOAc + H ₂ O	90-105%

ES 2 456 666 T3

Nombre del componente	Concentración (g/l)
Péptido	
965.10	0,5
1013.08	0,5
1090.01	0,5
1243.08	0,5
1295.03	0,5
1323.06	0,5
1334.10	0,5
1350.01	0,5
1352.02	0,5
1352.03	0,5
Adyuvante	
Montanide® ISA 51	459
Excipientes	
acetato de sodio	2,83
fosfato de sodio, dibásico	0,33
DMSO (USP)	50,5

Tabla 18: Componentes para su uso en la fabricación del producto de fármaco EP-2101

Componentes para la fabricación del producto de fármaco EP-2101	
Péptidos	1352.02
	1295.03
	1352.03
	965.10
	1243.08
	1350.01
	1013.08
	1090.01
	1323.06
	1334.10
Productos químicos/disoluciones	ácido acético (USP)
	NaOH anhidro (NF)
	DMSO (USP)
	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O (USP)

Componentes para la fabricación del producto de fármaco EP-2101	
	agua estéril para inyección (USP)
Adyuvante	Montanide® ISA 51

Tabla 19: Asignaciones de agrupamientos para los epitopos de péptidos de EP-2101

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Disolución 1	Disolución 2	Disolución 3
965.10 PADRE®	AkXVAAWTLKAAa	+		
1013.08	RLLQETELV		+	
1090.01	YLQLVFGIEV		+	
1243.08	LLTFWNPPV		+	
1295.03	SMPPPGRV	+		
1323.06	KLBPVQLWV		+	
1334.10	KVFGSLAFV			+
1350.01	YLSGADLNL		+	
1352.02	IMIGHLVGV	+		
1352.03	KVAEIVHFL	+		

+ = asignación de disolución, a = d-alanina, B = ácido α -aminoisobutírico, X = ciclohexilalanina

5

Tabla 20: Especificaciones del producto de fármaco a granel EP-2101

Nombre del ensayo	Método de ensayo	Especificación
Endotoxinas	USP 25 <85>	≤ 10 EU/ml
Esterilidad	USP 25 <71>	No hay crecimiento después de 14 días

Tabla 21: Especificaciones del producto de fármaco EP-2101

Nombre del ensayo	Método de ensayo	Especificación
Aspecto	Visual	Emulsión blanca a amarilla pálida
Endotoxinas	USP 25 <85>	≤ 20 EU/ml
Esterilidad	USP 25 <71> (conforme a 21 CFR 610.12)	No hay crecimiento después de 14 días
Viscosidad	Placa y cono	Valor del informe
pH	Electrodo de pH	pH $7,0 \pm 1,0$
Distribución del tamaño de partícula	Difracción de luz de láser	Valor del informe
Concentración de péptido de cada péptido	HPLC	$0,50 \pm 0,25$ mg/ml de emulsión
Identidad	HPLC	Se ajusta al patrón

ES 2 456 666 T3

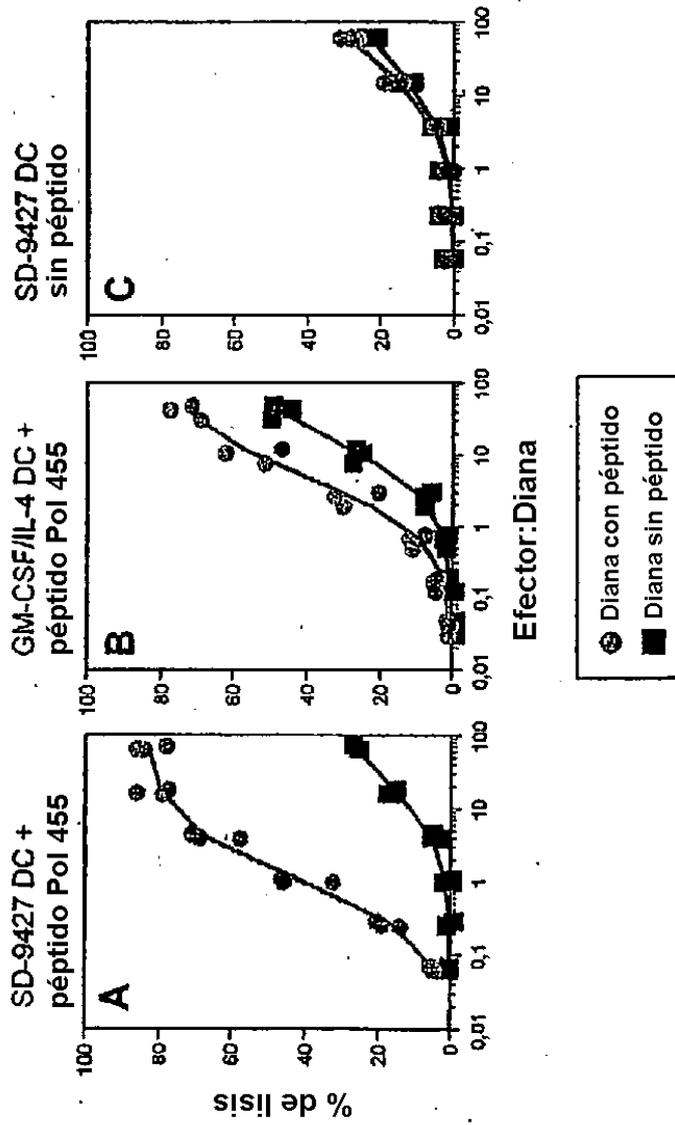
Nombre del ensayo	Método de ensayo	Especificación
Volumen extractable	Capacidad de extracción con jeringa	≥ 1,00 ml
Potencia	Inmunogenicidad <i>in vivo</i>	péptido 1352.02: ≥ 22 SU y ≤ 2900 SU péptido 1334.10: ≥ 8 SU y ≤ 3300 SU

Tabla 22: Parámetros de HPLC para la determinación de la concentración de péptido

Parámetros de HPLC				
Fase móvil A: TFA al 0,1%				
Fase móvil B: TFA al 0,1% en acetonitrilo al 80% en agua				
Columna: PLRP-S (300 A, 5 µm, 4,6 x 250 mm), Polymer Laboratories				
Caudal: 1,0 ml/min				
Longitud de onda: 214 nm				
Temperatura de la columna: 40 °C				
Temperatura del automuestreador: ambiente				
Gradiente de disolvente				
Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B	Curva
0,00	1,0	95,0	5,0	N/A
5,00	1,0	80,0	20,0	lineal
40,00	1,0	60,0	40,0	lineal
54,00	1,0	5,0	95,0	lineal
60,00	1,0	5,0	95,0	lineal
65,00	1,0	95,0	5,0	lineal
77,00	1,0	95,0	5,0	lineal

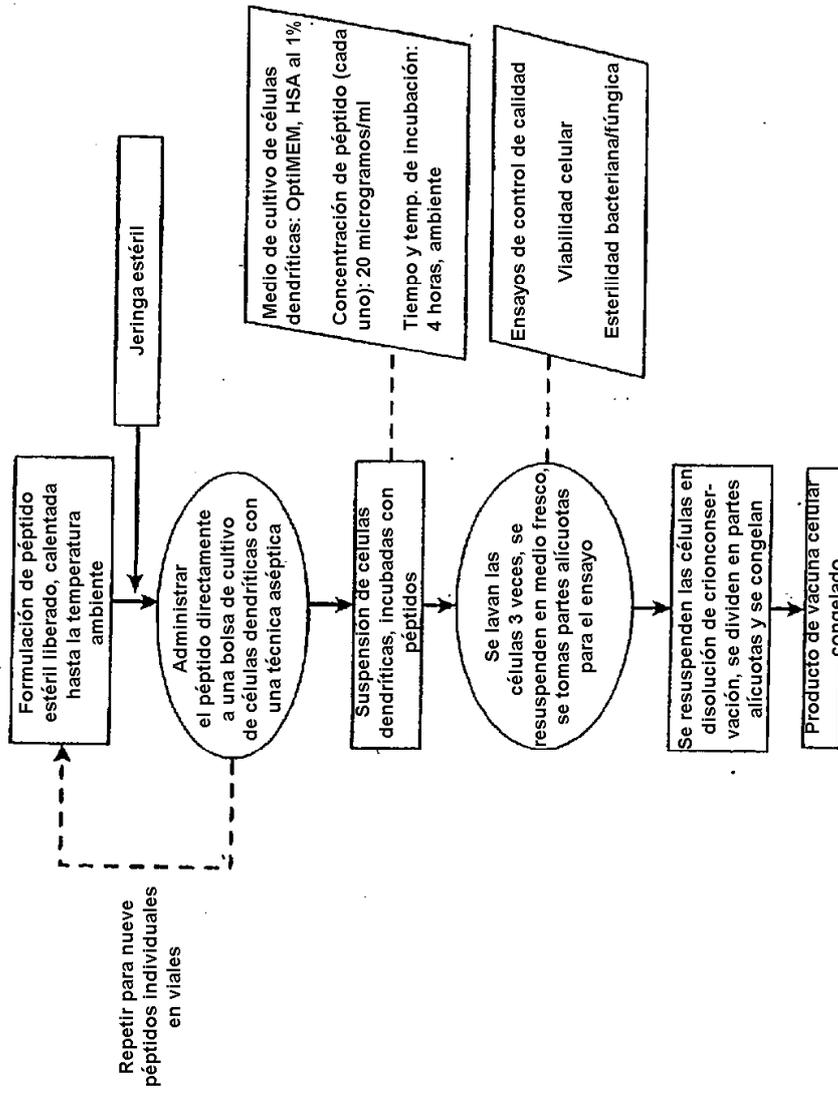
REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición, que comprende los 9 péptidos de CTL de la tabla 1 de SEQ ID NO:2-10, cuya composición comprende también un péptido de HTL que tiene la fórmula aKXVAAZTLKAAa, en la que «X» es ciclohexilalanina, fenilalanina o tirosina, «Z» es triptófano, tirosina, histidina o asparagina, y "a" es D-alanina o L-alanina.
- 5 2.- La composición de la reivindicación 1, que comprende además un adyuvante.
- 3.- La composición de la reivindicación 2, en la que dicho adyuvante es un adyuvante de aceite mineral.
- 4.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso para retrasar la recurrencia del cáncer después de cirugía, quimioterapia o radiación.
- 10 5.- La composición de la reivindicación 4, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, y un cáncer de la cabeza y/o cuello.
- 6.- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento del cáncer en individuos positivos a HLA-A2 o supertipo HLA-A2.



Las DC esplénicas procedentes de ratones tratados con ProGP inducen respuestas de CTL *in vivo*

Figura 1



Esquema de pulsado y ensayo de células dendríticas para una realización de vacuna celular

Figura 2

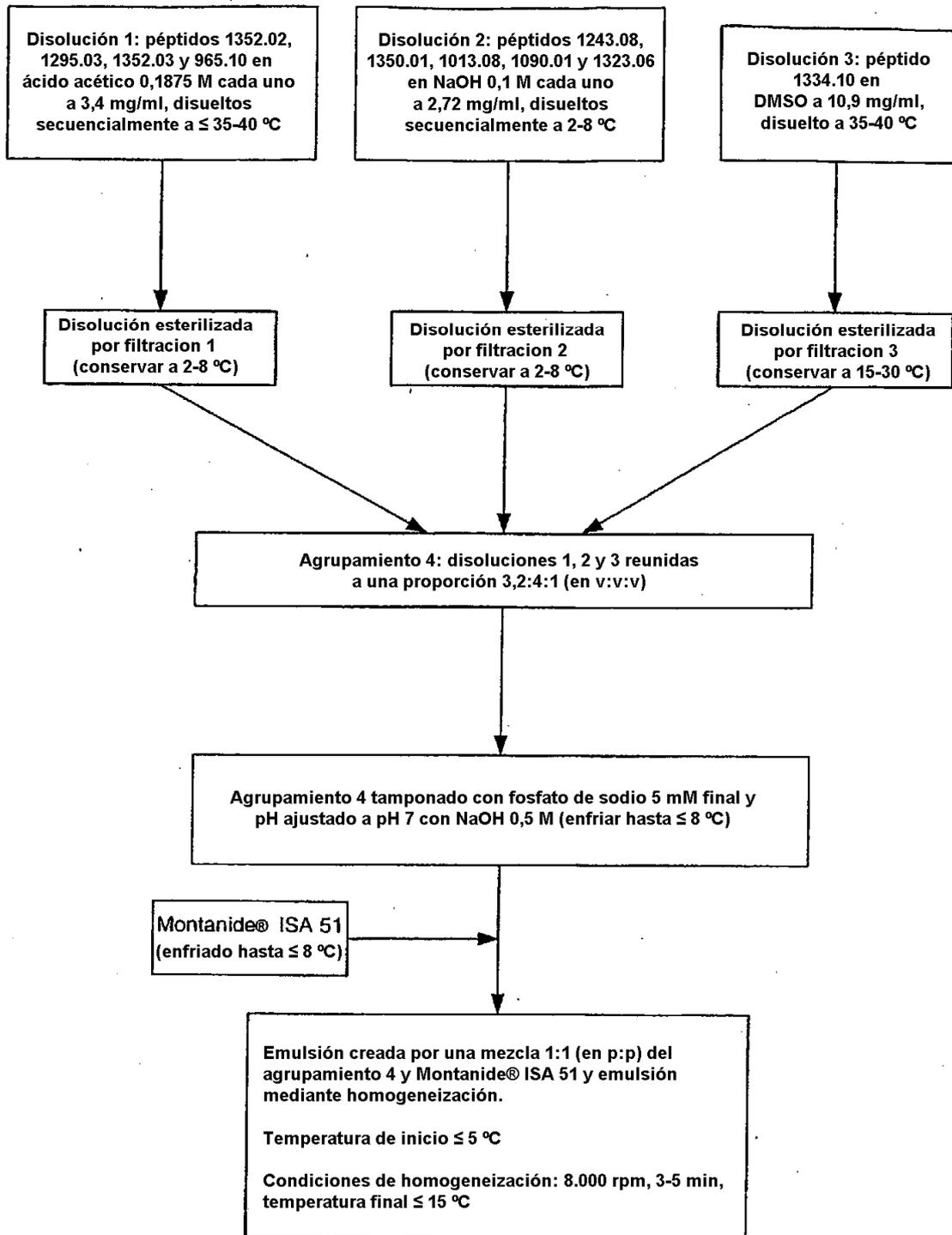


FIG. 3A

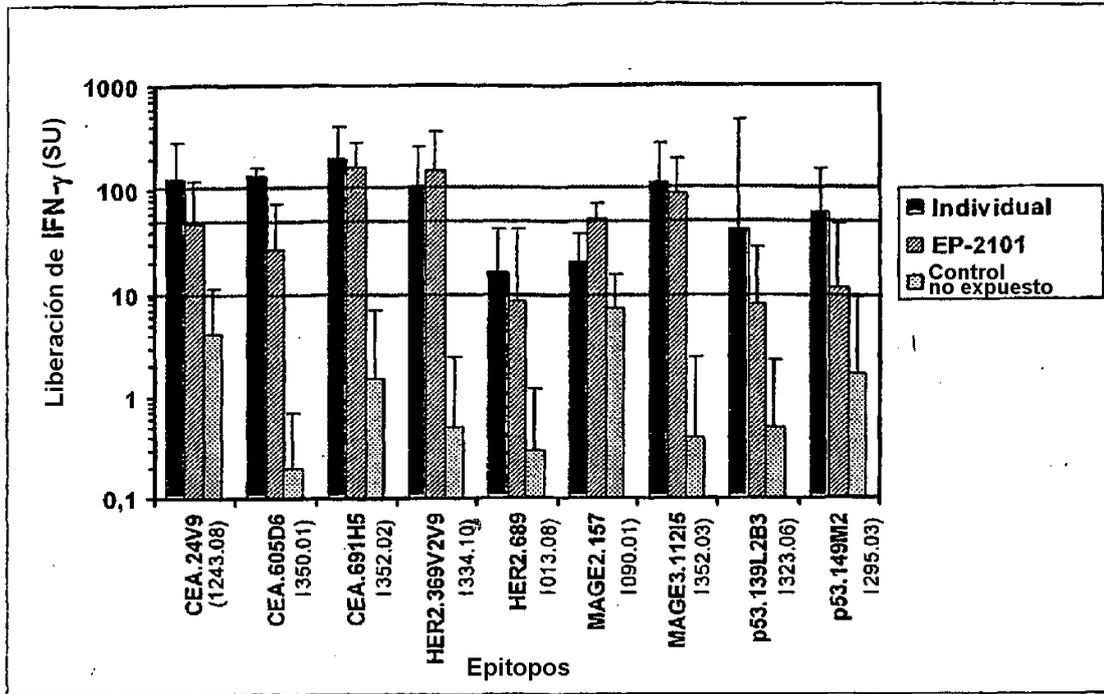


Fig. 3B