

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 919**

51 Int. Cl.:

C07K 7/04 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2007 E 07825358 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2041160**

54 Título: **Identificación, optimización y utilización de epítomos crípticos HLA-B7 para inmunoterapia**

30 Prioridad:

12.07.2006 WO PCT/IB2006/002937

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

15.07.2014

73 Titular/es:

**VAXON BIOTECH (100.0%)
GENOPOLE 2 RUE GASTON CRÉMIEUX
91057 EVRY CEDEX, FR**

72 Inventor/es:

**KOSMATOPOULOS, KOSTANTINOS (KOSTAS);
GRAFF-DUBOIS, STÉPHANIE y
MENEZ-JAMET, JEANNE**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 476 919 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

Identificación, optimización y utilización de epítomos crípticos HLA-B7 para inmunoterapia

5 La presente invención se refiere al sector de la inmunoterapia de péptidos. En particular, la presente invención da a conocer nuevos procedimientos y materiales para tratar eficazmente pacientes que tienen un fenotipo HLA-B*0702.

10 La inmunoterapia es un enfoque terapéutico que actualmente es objeto de un gran interés en el contexto del tratamiento del cáncer. El principio de la misma se basa en la inmunización con péptidos que reproducen epítomos de células T de antígenos tumorales reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) que juegan un papel importante en la eliminación de las células tumorales.

15 Cabe recordar que los CTL no reconocen antígenos proteicos enteros, sino fragmentos peptídicos de los mismos, que comprenden en general de 8 a 11 aminoácidos, que presentan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) expresadas en la superficie de las células. La presentación de estos péptidos es el resultado del procesamiento de antígenos que consta de tres etapas:

- degradación citosólica del antígeno por un complejo multienzimático denominado proteosoma
- translocación de los péptidos derivados de esta degradación en el retículo endoplasmático (ER) por los transportadores TAP
- asociación de estos péptidos con las moléculas del MHC I y la exportación de los complejos péptido/MHC I a la superficie celular

25 Los complejos péptido/MHC I interactúan con el receptor específico de células T (TCR) en los CTL induciendo la estimulación y la amplificación de estos CTL que se vuelven capaces de atacar a las células diana que expresan el antígeno del que se deriva el péptido.

30 Durante el procesamiento de los antígenos, se lleva a cabo una selección de péptidos, lo que da como resultado una jerarquía de presentación de péptidos. Los péptidos que las moléculas del MHC I presentan preferentemente son denominados inmunodominantes mientras que los péptidos que presentan débilmente se denominan crípticos. Los péptidos inmunodominantes exhiben una elevada afinidad por el MHC I y son inmunogénicos, mientras que los péptidos crípticos muestran una baja afinidad por el MHC I y son no inmunogénicos.

35 Los péptidos inmunodominantes han sido determinados ampliamente como el objetivo de vacunas contra el cáncer en estudios preclínicos y clínicos con resultados decepcionantes (Bowne y otros, 1999; Colella y otros, 2000; Gross y otros, 2004; Hawkins y otros, 2000; Naftzger y otros, 1996; Overwijk y otros, 1998; Vierboom y otros, 1997; Weber y otros, 1998).

40 Los antígenos tumorales frecuentemente son proteínas propias sobreexpresadas por los tumores y expresadas a niveles más bajos por las células y tejidos normales. El sistema inmunológico es incapaz de reaccionar contra estos antígenos propios debido al proceso de la autotolerancia. La autotolerancia concierne principalmente a los péptidos inmunodominantes (Cibotti y otros, 1992; Gross y otros, 2004; Hernández y otros, 2000; Theobald y otros, 1997) explicando de este modo la incapacidad de estos péptidos para inducir una inmunidad tumoral.

45 Los péptidos crípticos están mucho menos involucrados en el proceso de la autotolerancia (Anderton y otros, 2002; Boisgérault y otros, 2000; Cibotti y otros, 1992; Friedman y otros, 2004; Gross y otros, 2004; Moudgil y otros, 1999; Overwijk y otros, 2003; Sinha y otros, 2004) y, por lo tanto, pueden inducir una inmunidad tumoral eficiente siempre que se mejore su inmunogenicidad (Disis y otros, 2002; Dyall y otros, 1998; Engelhorn y otros, 2006; Gross y otros, 2004; Grossmann y otros, 2001; Lally y otros, 2001; Moudgil y Sercarz, 1994a; Moudgil y Sercarz, 1994b; Palomba y otros, 2005).

55 La estrategia habitual para potenciar la inmunogenicidad de péptidos crípticos, que debido a su baja afinidad por MHC I son no inmunogénicos, comprende el aumento de su afinidad por las moléculas del MHC I a través de sustituciones de aminoácidos. La afinidad de los péptidos por las moléculas del MHC I depende principalmente de la presencia en posiciones bien definidas (posiciones de anclaje primario) de residuos llamados "residuos de anclaje primario". Estos residuos son específicos de alelo de MHC I. Aunque a menudo necesaria, la presencia de residuos de anclaje primarios no es suficiente para asegurar una elevada afinidad por el MHC I. Se ha demostrado que los residuos situados fuera de las posiciones de anclaje primarias (residuos de anclaje secundario) pueden ejercer un efecto favorable o desfavorable sobre la afinidad del péptido por el MHC I. La presencia de estos residuos de anclaje secundarios hace que sea posible explicar la existencia de una gran variabilidad en la afinidad de unión, dentro de los péptidos que tienen los motivos de anclaje primarios.

65 Las sustituciones de aminoácidos dirigidas a la mejora de la afinidad por las moléculas del MHC I deberían conservar la antigenicidad de estos péptidos optimizados. Los CTL generados por péptidos optimizados deben reaccionar de forma cruzada con los correspondientes péptidos nativos.

Muchos equipos de investigación han tenido éxito en mejorar adicionalmente la inmunogenicidad de péptidos ya inmunogénicos mediante el aumento de su afinidad por HLA-A*0201 (Bakker y otros, 1997; Parkhurst y otros, 1996; Sarobe y otros, 1998; Valmori y otros, 1998). Los presentes inventores han descrito anteriormente una estrategia general para mejorar la afinidad y la inmunogenicidad de péptidos crípticos restringidos por HLA-A*0201 (Scardino y otros, 2002; Tourdot y otros, 2000).

HLA-B*0702 es una molécula expresada frecuentemente (25% de la población). Por lo tanto, la identificación y optimización de péptidos crípticos tumorales restringidos por HLA-B*0702, deben ser necesarias a efectos de desarrollar vacunas eficientes contra el cáncer para pacientes que expresan HLA-B*0702.

Hasta la fecha, se han descrito pocos péptidos tumorales presentados por HLA-B*0702. Dos péptidos derivados de los antígenos CEA (CEA₆₃₂) (Lu y otros 2000) y TERT (TERT₁₁₂₃) (Cortez-Gonzales y otros, 2006) han sido identificados; estos péptidos mostraron una fuerte afinidad de unión por HLA-B*0702 y fueron inmunogénicos tanto en HLA-B*0702 de ratones transgénicos como en pruebas *in vitro* con células humanas. Estos resultados experimentales muestran que estos péptidos son péptidos inmunodominantes.

Dos péptidos adicionales derivados de MAGE-A1 (MAGE-A1289) (Luiten y otros, 2000) y RU2 (un nuevo antígeno expresado por el carcinoma de células renales) (Van den Eynde y otros, 1999) se han identificado como objetivos de CTL de HLA-B*0702 que habían sido aislados a partir de pacientes con cáncer. Aunque no existe información acerca de la afinidad por HLA-B*0702 de estos dos péptidos, podemos considerarlos inmunodominantes porque los CTL desarrollados en pacientes con cáncer están siempre dirigidos contra péptidos inmunodominantes.

Tal como se describe a continuación en la parte experimental, los presentes inventores han encontrado ahora una estrategia general para aumentar la afinidad y la inmunogenicidad de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702.

La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702, que comprende una etapa de sustitución de un residuo del extremo N terminal de dicho epítipo con una alanina (A), o de sustitución del residuo del extremo C terminal con una leucina (L).

A continuación, la frase "epítipo críptico restringido por HLA-B*0702" se utilizará para designar un péptido que tiene de 8 a 11 aminoácidos, más preferentemente 9 ó 10 aminoácidos, que muestra una baja afinidad por HLA-B*0702, es no inmunogénico y tiene la secuencia de X₁PX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (ID. SEC. No. 58), en la que P es prolina, X₃ es R (arginina) o K (lisina) o H (histidina) o M (metionina), X₁ y X₄ a X₇ son independientemente cualquier aminoácido, X₈ a X₁₀ son independientemente cualquier aminoácido o ninguno, y el aminoácido X₁₁ del extremo C terminal es cualquier aminoácido con la condición de que si el aminoácido del extremo N terminal X₁ es A (alanina) entonces, X₁₁ no es ni L (leucina) ni A, ni I (isoleucina), ni V (valina), y no es M, y si X₁ es un aminoácido distinto de A, entonces X₁₁ es L o A o I o V o M.

En la presente memoria descriptiva, el término "péptido" designa no sólo a moléculas en las que residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también a pseudopéptidos sintéticos o peptidomiméticos en los que se modifica el enlace peptídico, especialmente para hacerlos más resistentes a la proteólisis, y siempre que su inmunogenicidad no se vea afectada por esta modificación.

En la presente memoria descriptiva, los residuos de aminoácidos se designan por sus códigos de letras.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la palabra "sustitución" se debe entender como la obtención de un péptido cuya secuencia se deriva de la secuencia de dicho epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 mediante la sustitución mencionada, cuando la secuencia de aminoácidos de dicho epítipo críptico restringido no contiene el aminoácido apropiado, cualquiera que sea el procedimiento técnico utilizado para obtener dicho péptido. Por ejemplo, el péptido se puede producir mediante síntesis artificial de péptidos o mediante expresión recombinante.

La afinidad de un péptido por el HLA-B*0702 se puede determinar por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el ensayo descrito por Rohrlch y otros, 2003. Los resultados se expresan como la afinidad relativa (AR) cuando se compara con un péptido de referencia. Según este procedimiento, se dice que un péptido tiene una baja afinidad por HLA-B*30702 cuando AR es mayor que 10. Por lo tanto, se considera que péptidos con AR mayor que 10 son péptidos crípticos (o epítipos):

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "no inmunogénico" se refiere a un péptido incapaz de iniciar una respuesta inmune de CTL restringidos por HLA-B*0702 cuando se administra a un sujeto que expresa HLA-B*0702 (incluyendo un animal transgénico HLA-B*0702).

En otra realización, la inmunogenicidad de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 en el que el segundo y tercer residuo de aminoácido es PR o PK o PH o PM y el último residuo es L o A o I o V o M, se puede aumentar

mediante la sustitución de su primer aminoácido por una A (alanina). De hecho, cuando la secuencia del epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 seleccionado es X₁PX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (ID. SEC. No. 59), en la que el aminoácido X₁ del extremo N terminal es cualquier aminoácido excepto A, X₃ es R o K o H o M, el aminoácido X₁₁ del extremo C terminal es L o A o I o V o M, X₄ a X₇ son, independientemente, cualquier aminoácido, y X₈ a X₁₀ son independientemente cualquier aminoácido o ninguno, la sustitución de X₁ por A es suficiente para aumentar su inmunogenicidad.

En otra realización adicional, la inmunogenicidad de epítopos crípticos restringidos por HLA-B*0702 en los que los tres primeros residuos de aminoácidos son APX₃ (en el que X₃ es R o K o H o M) se puede incrementar mediante la sustitución de su último aminoácido por una L (o mediante la adición de una leucina en su extremo C terminal, siempre que la secuencia de aminoácidos de dicho epítipo después de haber añadido la leucina no sea más larga que 11 aminoácidos). De hecho, cuando la secuencia del epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 seleccionado es APX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (ID. SEC. No. 60), en la que X₃ es R o K o H o M, X₄ a X₇ son independientemente, cualquier aminoácido, X₈ a X₁₀ son independientemente cualquier aminoácido o ninguno, y el aminoácido X₁₁ del extremo C terminal es un aminoácido distinto a L o A o I o V o M, la sustitución de X₁₁ por L es suficiente para aumentar su inmunogenicidad.

A continuación, la expresión "péptido optimizado" designa un péptido inmunogénico derivado de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702, mediante los procedimientos anteriores, y que tiene la secuencia general APX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (ID. SEC. No. 61), en la que X₃ es R o K o H o M, X₄ a X₇ son independientemente cualquier aminoácido, X₈ a X₁₀ son independientemente cualquier aminoácido o ninguno, y el aminoácido X₁₁ del extremo C terminal es L o A o I o V o M.

Los presentes inventores han identificado una serie de epítopos crípticos restringidos por HLA-B*0702, algunos de ellos se dan a conocer en la Tabla 1 siguiente. En consecuencia, un aspecto de la presente invención es un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702, seleccionado de entre los péptidos de ID. SEC. No. 2 a 4, que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. péptidos crípticos restringidos por HLA-B*0702 seleccionados

Antígeno	Péptido	ID. SEC. No.
TEXT ₄₄₄	DPRRLVQLL	1
HER-2/neu	APRSPLAPS	2
	SPKANKEIL	3
	GPKHSCDLA	4

Entre los ejemplos de epítopos inmunogénicos restringidos por HLA-B*0702 obtenidos según la presente invención están los derivados de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 de la ID. SEC. No. 3 o 4, mediante la sustitución de su aminoácido del extremo N terminal con una A (alanina) y los derivados del epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 de ID. SEC. No. 2 mediante la sustitución de su aminoácido del extremo C terminal con una L (leucina).

Por lo tanto, la presente invención se refiere además a péptidos optimizados derivados de los péptidos crípticos de ID. SEC. No. 2 a 4, mediante un procedimiento tal como el que se ha descrito anteriormente. Los ejemplos preferentes de péptidos optimizados son APRSPLAPL (ID. SEC. No. 6), APKANKEIL (ID. SEC. No. 7) y APKHSCDLA (ID. SEC. No. 8).

La presente invención se refiere además a un polipéptido quimérico, que comprende dos, tres o más epítopos crípticos restringidos por HLA-B*0702 seleccionados del grupo que comprende las ID. SEC. No. 1 a 4, o dos, tres o más epítopos inmunogénicos restringidos por HLA-B*0702 seleccionados del grupo que comprende APRRLVQLL (ID. SEC. No. 5) y las ID. SEC. No. 6 a 8, tal como se ha descrito anteriormente. En un polipéptido quimérico según la presente invención, los epítopos pueden ser diferentes unos de otros, o el mismo epítipo se puede repetir varias veces (dos, tres o más veces). El técnico en la materia puede elegir cualquier técnica conocida para producir estos polipéptidos. Por ejemplo, el polipéptido puede obtenerse por síntesis química, o mediante la utilización de la tecnología de la ingeniería genética.

Otro objetivo de la presente invención es una molécula de ácido nucleico aislada diseñada para causar la expresión de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 seleccionado del grupo que comprende las ID. SEC. No. 2 a 4 o un epítipo inmunogénico seleccionado del grupo que comprende las ID. SEC. No. 6 a 8, o un polipéptido quimérico tal como el que se ha descrito anteriormente. En la presente memoria descriptiva, por "diseñado para causar la expresión de un péptido" se entiende que dicho péptido se expresa como tal, aislado de todo el antígeno del que se ha seleccionado su secuencia (y en los casos apropiados, optimizado tal como se ha descrito anteriormente), cuando el ácido nucleico se introduce en una célula apropiada. La región que codifica el epítipo o polipéptido quimérico se encuentra normalmente en el polinucleótido bajo el control de un promotor adecuado. Son preferentes los promotores bacterianos para la expresión en bacterias, que pueden producir el polipéptido ya sea *in vitro* o, en circunstancias particulares, *in vivo*. Un ejemplo de bacteria que se puede utilizar para producir un péptido o

polipéptido según la presente invención, directamente *in vivo*, es *Listeria monocytogenes*, que es una bacteria intracelular facultativa que entra en las células presentadoras de antígeno profesionales mediante fagocitosis activa (Paterson y Maciag, 2005). Alternativamente, un ácido nucleico según la presente invención se puede administrar directamente, utilizando un vector apropiado. En este caso, se puede utilizar un promotor específico de tejido, uno constitutivo fuerte o uno endógeno para controlar la expresión del péptido. Entre los sistemas de vectores adecuados se incluyen plásmidos de ADN desnudo, composiciones de liposomas para mejorar la liberación, y vectores virales que provocan la expresión transitoria. Son ejemplos los adenovirus o vectores de virus vacuna y vectores de la familia de los herpes, especialmente en una forma no replicativa.

Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende, como mínimo, como un principio activo, un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 seleccionado del grupo que comprende las ID. SEC. No. 2 a 4, o un polipéptido epítipo inmunogénico derivado de las mismas tal como se ha mencionado anteriormente, o un polipéptido quimérico según la presente invención, o un ácido nucleico que codifica cualquiera de estos y/o un vector que porta dicho ácido nucleico. La formulación de las composiciones farmacéuticas será conforme a las normas y técnicas actuales. Medicamentos destinados para la administración humana se pueden preparar adecuadamente en condiciones estériles, en los que el ingrediente o ingredientes activos se combinan con una solución isotónica u otro vehículo farmacéutico apropiado para la utilización terapéutica recomendada. De forma general, se describen formulaciones y técnicas adecuadas en la última edición de "Ciencias farmacéuticas de Remington" ("Remington's Pharmaceutical Sciences") (Maack Publishing Co, Easton PA).

En particular, un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702, o un polipéptido epítipo inmunogénico derivado del mismo, o un polipéptido quimérico que porta varios de estos epítipos inmunogénicos o crípticos, o un ácido nucleico que codifica cualquiera de estos, incluido o no en un vector, se puede utilizar para la preparación de una composición para inmunoterapia preventiva o curativa, especialmente, para inmunoterapia antiviral o contra el cáncer.

En una realización particular, una composición farmacéutica según la presente invención es una vacuna. En este último caso, las composiciones de la presente invención se pueden combinar con un adyuvante para potenciar la respuesta inmune. Entre los adyuvantes clásicos se incluyen emulsiones de aceite, tal como Adyuvante Incompleto de Freund, y las superficies adherentes tales como el alumbre. Son especialmente útiles los adyuvantes que seleccionan y activan las células dendríticas, en particular, a través de TLR (tales como ADN bacteriano o proteínas derivadas de membrana bacteriana) o ayudan a obtener células T citotóxicas. Se pueden incluir además en la composición otros factores que refuerzan la respuesta inmune de otro modo o promueven la apoptosis o la eliminación de las células cancerosas.

Se pueden empaquetar para su distribución por separado o juntas dosis múltiples y/o diferentes combinaciones de las composiciones inmunogénicas de la presente invención. Cada composición o conjunto de composiciones, tales como los kits de partes que se describen a continuación, se pueden acompañar con las instrucciones escritas (en forma de material promocional o prospecto) con respecto a la utilización de la composición o combinación en la provocación de una respuesta inmune y/o el tratamiento del cáncer.

En una solicitud de patente anterior (documento PCT/EP2006/005325), el presente solicitante ha descrito un protocolo de vacunación que permite el inicio y mantenimiento de una respuesta de células T dirigida hacia epítipos crípticos. Los resultados dados a conocer en el documento PCT/EP2006/005325 demuestran que la inyección de un péptido nativo correspondiente a un epítipo críptico, seguida de la vacunación con su péptido cognado optimizado, puede mantener la respuesta inmune iniciada por dicho péptido optimizado.

Por lo tanto, según la presente invención, un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 se puede utilizar para la preparación de una composición medicinal para mantener la respuesta inmune de CTL iniciada por su péptido cognado optimizado. Un péptido inmunogénico que tiene una secuencia de epítipo restringido por HLA-B*0702 optimizada derivado de un gen de epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 se puede utilizar además, para la preparación de una composición medicinal para iniciar una respuesta inmune de CTL contra dicho epítipo críptico restringido por HLA-B*0702. La presente invención abarca además un procedimiento para vacunar a un paciente contra un antígeno tumoral o viral, en el que dicho procedimiento comprende una primera etapa de vacunación con un péptido cognado optimizado a un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 nativo de dicho antígeno, seguido de una segunda etapa de vacunación con dicho péptido nativo. En este procedimiento, la primera etapa y/o la segunda etapa se pueden realizar mediante la utilización de un polipéptido quimérico que comprende dos, tres o más péptidos optimizados o crípticos tal como los que se han descrito anteriormente, en lugar de péptidos de un solo epítipo.

La presente invención también se refiere a un kit de partes que comprende, en formulaciones separadas, un primer péptido que tiene la secuencia de un gen de un epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 seleccionado del grupo que comprende las ID. SEC. No. 2 a 4, y un segundo péptido derivado de dicho primer péptido mediante un procedimiento para aumentar su inmunogenicidad, tal como se ha descrito anteriormente.

Otros kits de partes según la presente invención comprenden, como mínimo, un polipéptido quimérico. Se contemplan varias variantes de estos kits: en una primera realización, el kit comprende, en formulaciones separadas, un primer polipéptido quimérico que comprende dos, tres o más epítomos crípticos restringidos por HLA-B*0702 y un segundo polipéptido quimérico que corresponde a su polipéptido quimérico cognado inmunogénico restringido por HLA-B*0702 (lo que significa que comprende epítomos inmunogénicos restringidos por HLAB*0702 cognados optimizados a los epítomos crípticos comprendidos en el primer polipéptido quimérico). En una segunda realización, el kit comprende un primer polipéptido quimérico que comprende dos, tres o más epítomos crípticos restringidos por HLA-B*0702 y en una o varias otras formulaciones separadas, péptidos cognados correspondientes a los epítomos inmunogénicos restringidos por HLA-B*0702 optimizados para los epítomos crípticos comprendidos en el primer polipéptido quimérico. En una tercera realización, el kit comprende dos, tres o más péptidos que corresponden epítomos crípticos restringidos por HLA-B*0702 diferentes, en el que dichos péptidos se mezclan bien en una sola formulación, o bien se separan en varias formulaciones y, en formulaciones separadas, un polipéptido quimérico que comprende el gen de epítomos cognados inmunogénicos restringidos por HLA-B*0702 optimizados para dichos péptidos crípticos.

En la siguiente descripción de los kits según la presente invención, se hará mención sólo de los péptidos (nativos u optimizados), entendiéndose que los polipéptidos quiméricos (que comprenden epítomos crípticos nativos o epítomos optimizados) quedan incluidos dentro de los kits en lugar de los péptidos de epítomo único.

En una realización particular de la presente invención, el kit es un kit de vacunación, en el que dichos primer (nativo) y segundo (cognado optimizado) péptido están en dosis de vacunación separadas. En una realización preferente, el kit de vacunación comprende 2 ó 3 dosis de péptido optimizado y 3, 4, 5 ó 6 dosis de péptido nativo. Un kit de vacunación particular según la presente invención está adaptado para una primera secuencia de vacunación de 6 inyecciones y comprende 2 ó 3 dosis de péptido optimizado y 4 ó 3 dosis de péptido nativo. En caso de enfermedades prolongadas, es preferente mantener el nivel de inmunidad obtenido después de esta primera vacunación, mediante dosis de recuerdo regulares. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante inyecciones realizadas cada 1,5 a 6 meses. Por lo tanto, los kits complementarios, que comprenden al menos 2 dosis, y hasta 40 o 50 dosis de péptido nativo, son también parte de la presente invención. Alternativamente, el kit de vacunación puede comprender de 2 a 3 dosis de péptido optimizado y 3 a 40 o hasta 50 dosis de péptido nativo. Por supuesto, dichos péptidos nativo y optimizado presentes en el kit son tal como los que se han descrito anteriormente.

Cada dosis comprende entre 0,5 y 10 mg de péptido, preferentemente de 1 a 5 mg, o entre 1 y 20 mg de polipéptido. En una realización preferente, cada dosis se formula para inyección subcutánea. Por ejemplo, cada dosis se puede formular en 0,3 a 1,5 ml de una emulsión de solución acuosa emulsionada con Montanide, utilizado como un adyuvante. El técnico en la materia puede elegir cualquier otro adyuvante o adyuvantes en lugar del Montanide o además del mismo. En una realización particular, las dosis están en forma de una solución acuosa. Alternativamente, las dosis pueden estar en forma de un péptido liofilizado, para preparación al momento de la solución líquida para inyección. Otros componentes posibles de dichos kits son uno o varios adyuvantes, que se añaden a las composiciones de péptidos antes de la administración, y un prospecto que describe cómo utilizar dichos kits.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1: Inmunogenicidad de péptidos restringidos por HLA-B*0702. Se ensayaron CTL contra objetivos de RMA-B7 cargados con péptido tal como se indica.

Figura 2: Inmunogenicidad de péptidos crípticos HLA-B*0702 optimizados. Se ensayaron CTL contra objetivos de RMA-B7 cargados con péptido tal como se indica.

Figura 3: Inmunogenicidad *in vivo* de péptidos optimizados HLA-B*0702 Her2/neu_{1069L9} (A) y Her2/neu₁₀₆₉ (B) en ratones transgénicos HLA-B*0702. Se ensayaron CTL contra objetivos de RMA-B7 cargados con péptido tal como se indica. La población de CTL inducida se diluyó 3 (1), 10 (2), 30 (3) y 100 (4) veces.

Figura 4: TERT₄ induce CTL específicos de TERT en ratones HLA-B7 y en donantes sanos. (A) Inmunogenicidad TERT₄ en ratones transgénicos HLA-B*0702. Se ensayaron CTL contra objetivos RMA-B7 cargados con dosis decrecientes de péptido TERT₄. **(B) Reconocimiento de TERT endógeno por CTL murinos específicos de TERT₄.** Se ensayaron CTL frente a células COS transfectadas con HLA-B*0702 y TERT tal como se indica. **(C) Inducción de CTL humanos específicos de TERT₄.** Se ensayaron CTL contra objetivos T2-B7 cargados con TERT₄ (■) o un péptido irrelevante (●) utilizando la relación efector/diana tal como se indica (gráfico de la izquierda), y contra líneas de células tumorales humanas HLA-B*0702 positivo TERT positivo SK-MES-1 (■), HBL-100 (●) y HLA-B*0702 negativo TERT positivo SW-480 (□), HSS (○) (gráfico derecho).

Figura 5: Reconocimiento de TERT endógeno mediante CTL murinos específicos TERT₄₄₄. **(A)** Se ensayaron CTL contra objetivos RMA-B7 cargados con dosis decrecientes de péptidos TERT₄₄₄ o TERT_{444A1} tal como se indica. **(B)** Se ensayaron CTL frente a células COS transfectadas con HLA-B*0702 y/o TERT tal como se indica.

Figura 6: Inducción de CTL humanos específicos de TERT_{444A1}. Se ensayaron CTL contra objetivos T2-B7 cargados con péptidos tal como se indica. La activación máxima de CTL se obtiene mediante tratamiento con PMA/ionomicina.

5 EJEMPLOS

Los ejemplos se han realizado utilizando los siguientes materiales y procedimientos:

Ratones transgénicos. Los ratones knockout HLA-B7 H-2 de clase I se han descrito anteriormente (Rohrlich y otros, *Cells* 2003). Las células murinas RMA-B7 y humanas T2-B7 transfectadas con HLA-B*0702 se han descrito anteriormente (Rohrlich y otros, 2003). Las células COS-7 y clon 13 de WEHI-164 fueron proporcionadas por F. Jotereau (INSERM 463, Nantes, Francia). Se utilizaron las líneas celulares SK-MES-1 (cáncer de pulmón), HBL-100 (cáncer de mama) HLA-B*0702 positivas y las SW-480 (cáncer de colon) y HSS (mieloma) HLA-B*0702 negativas líneas como objetivos de los CTL humanos. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%.

Péptidos y plásmidos. Los péptidos fueron sintetizados por Epytop (Nimes, Francia). El plásmido HLA-B*0702 fue proporcionado por el Dr. Lemonnier (Institut Pasteur, París, Francia) (Rohrlich y otros, 2003) y el plásmido TERT fue proporcionado por el Dr. Weinberg (MIT, Boston, MA) (Meyerson y otros, 1997).

Medición de la afinidad relativa de péptidos frente a HLA-B*0702. El protocolo utilizado se ha descrito anteriormente (Rohrlich y otros, 2003). En resumen, las células T2- B7 se incubaron a 37°C durante 16 horas con las concentraciones de péptidos que van desde 100 µM a 0,1 µM, y a continuación se tiñeron con el anticuerpo monoclonal (mAb) ME-1 para cuantificar la expresión de HLA-B*0702 en superficie. Para cada concentración de péptido, la tinción específica de HLA-B*0702 se calculó como el porcentaje de tinción obtenido con 100 µM del péptido de referencia CMV₂₆₅₋₂₇₄ (R10V; RIPHERNGFTV, ID. SEC. No. 9). La afinidad relativa (AR) se determinó tal como:

AR = (concentración de cada péptido que induce el 20% de expresión de HLA-B*0702/Concentración del péptido de referencia que induce el 20% de expresión de HLA-B*0702).

Inducción de CTL *in vivo* en ratones transgénicos HLA-B*0702. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con 100 µg de péptido emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) en presencia de 150 µg de epítipo T auxiliar HBVcore₁₂₈ I-A^b limitado (TPPAYRPPNAPIL, ID. SEC. No. 10). Después de 11 días, se estimularon 5x10⁷ células de bazo *in vitro* con péptido (10 µM). El 6º día de cultivo, las poblaciones de respuesta masiva fueron ensayadas respecto a la citotoxicidad específica.

Ensayo de procesamiento de péptidos en células COS-7 transfectadas. Se sembraron 2,2x10⁴ células COS-7 de simio en placas de 96 pocillos de fondo plano en DMEM + 10% de FCS, por triplicado para cada condición. Dieciocho horas después, las células se transfectaron con 100 ng de cada plásmido de ADN con DEAE dextrano. Después de 4 horas, se añadió PBS + 10% de DMSO durante 2 minutos. Las células COS transfectadas se incubaron en DMEM+10% de FCS durante 40 horas y posteriormente se utilizaron para estimular CTL murinos en un ensayo de secreción de TNFα.

Ensayo de secreción TNFα. En el 4º día, se suspendieron células COS-7 transfectadas en 50 µl de RPMI + 10% de FCS y se utilizaron como células estimulantes. A continuación se añadieron 5x10⁴ de células T murinas en 50 µl de RPMI 10% de FCS y se incubaron durante 6 horas. Cada condición se ensayó por triplicado. Se recogieron 50 µl del sobrenadante para medir el TNFα. Se prepararon diluciones estándar en 50 ml con dosis finales de TNFα que van desde 104 hasta 0 µg/ml. Tanto a los sobrenadantes como a las diluciones estándar, se añadieron 3x10⁴ células WEHI-164c13 sensibles a TNFα en 50 µl. Estas se incubaron durante 16 horas a 37°C. La inhibición de la proliferación celular se evaluó por el procedimiento colorimétrico MTT (Espevik y Nissen-Meyer, 1986).

Generación de CTL a partir de PBMC humano. Se recogió PBMC mediante leucofóresis de voluntarios HLA-B*0702 sanos. Las células dendríticas (CD) se produjeron a partir de células adherentes cultivadas durante siete días (2x10⁶ células/ml) en presencia de 500 UI/ml de GM-CSF y 500 UI/ml de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) en medio completo (RPMI-1640 suplementado con 10% de suero AB humano inactivado por calor, 2 µM de L-glutamina y antibióticos). En el 7º día, se pulsaron CD con 10 µM de péptidos durante 2 horas; se añadieron en el cultivo agentes de maduración Poly I:C (Sigma, Oakville, Canadá) a 100 ng/ml y anti-CD40 (clon G28-5, ATCC, Manassas, Virginia) a 2 µg/ml y los CD se incubaron a 37°C durante la noche o hasta 48 horas. A continuación, se irradiaron CD maduras (3.500 rads). Se purificaron células CD8+ mediante selección positiva con microperlas CD8 (Miltenyi Biotec, Auburn, California) según las instrucciones del fabricante. Se estimularon 2x10⁵ células CD8⁺ + 6x10⁴ células CD8⁻ con 2x10⁴ de CD pulsadas con péptido en medio de cultivo completo suplementado con 1000 UI/ml de IL-6 y 5 UI/ml de IL-12 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) en placas de 96 pocillos de fondo redondo. A partir del 7º día, los cultivos se volvieron a estimular semanalmente con CD cargadas con péptido en presencia de 20 UI/ml de IL-2 (Proleukin, Chiron Corp., Emeryville, California) y 10 ng/ml de IL-7 (R&D Systems, Minneapolis,

Minnesota). Después de la tercera reestimulación *in vitro*, se evaluó la citotoxicidad de los cultivos celulares en masa (frente a TERT₄) y la tinción intracelular de IFN γ (frente a TERT_{444A1}).

Ensayo citotóxico. Los objetivos se marcaron con 100 μ Ci de Cr⁵¹ durante 60 min, se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en V (3x10³ células/pocillo en 100 μ l de medio RPMI 1640) y, cuando fue necesario, se pulsaron con péptidos (1 μ M) a 37°C durante 2 horas. A continuación se añadieron efectores en los pocillos y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Se determinó el porcentaje de lisis específica como: % de Lisis = (liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea) x 100

Tinción intracelular de IFN γ . Las células T (10⁵) se incubaron con 2x10⁵ células T2 cargadas con péptido estimulante en presencia de 20 μ g/ml de Brefeldina A (Sigma, Oakville, Canadá). Seis horas más tarde, se lavaron, se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 conjugado con r-ficoeritrina (Caltag Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.) en PBS durante 25 min a 4°C, se lavaron de nuevo, y se fijaron con PFA al 4%. Posteriormente las células se permeabilizaron con PBS, 0,5% de BSA, 0,2% de saponina (Sigma, Oakville, Canadá), y se marcaron con un mAb anti-IFN γ conjugado con alofococianina (Pharmingen, Mississauga, Canadá) durante 25 min a 4°C antes del análisis con un citómetro de flujo FACSCalibur®.

Ejemplo 1: Afinidad de péptidos

Se ensayaron ocho péptidos con los motivos de anclaje específicos por HLA-B*0702, es decir, P2 y preferentemente L/V en la posición del extremo C terminal (Sidney y otros, 1996) que pertenecen a los antígenos Hsp70 (Hsp70₁₁₅, Hsp70₁₃₇, Hsp70₃₉₇), TERT (TERT₄ y TERT₄₄₄) y MAGE-A (MAGE-A_{121.1}, MAGE-A_{121.2} y MAGE-A_{121.4}) respecto a su unión a la molécula HLA-B*0702. Sólo TERT₄ se unió a HLA-B*0702 con una elevada afinidad, los siete péptidos restantes fueron muy débiles o no enlazantes (Tabla II). Esto demuestra que la presencia de motivos de anclaje no es suficiente para asegurar una elevada afinidad de unión frente por HLA-B*0702. Dada su baja afinidad, los péptidos Hsp70₁₁₅, Hsp70₁₃₇, Hsp70₃₉₇, TERT₄₄₄, MAGE-A_{121.1}, MAGE-A_{121.2}, A_{121.4} MAGE-, **se consideran péptidos crípticos.**

Tabla II: Afinidad de péptidos por HLA-B*0702

	Péptido	Secuencia	AR	ID: SEC: No.
1	Hsp70 115	YPEEISSMVL	>10	11
	Hsp70 115A1	APEEISSMVL	>10	12
2	Hsp70 137 (10)	YPVTNAVITV	>10	13
3	Hsp70 397	APLSLGLET	>10	14
4	TERT4	APRCRAVRSL	0,74	15
5	TERT444	DPRRLVQLL	>10	1
	TERT 444A1	APRRLVQLL	1,4	5
6	MAGE-A121.1	EPVTKAEML	>10	16
	MAGE-121.1 A1	APVTKAEML	>10	17
7	MAGE-A121.2	EPFTKAEML	>10	18
8	MAGE-A121.4	EPITKAEIL	>10	19

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de péptidos seleccionados

Los péptidos de baja afinidad Hsp₁₃₇, Hsp₁₁₅, HSP₃₉₇, TERT₄₄₄ y de alta afinidad TERT₄ se han ensayado respecto a su capacidad de inducir una respuesta inmune específica de CTL en ratones transgénicos HLA-B*0702. Sólo la elevada afinidad TERT₄ era inmunogénica, lo que confirma que la inmunogenicidad de los péptidos está fuertemente relacionada con su afinidad respecto por HLA (Figura 1).

Ejemplo 3: Aumento de la afinidad de los péptidos de baja afinidad

Dado que todos estos péptidos crípticos tenían motivos favorables de anclaje primario, el aumento de su afinidad es un prerrequisito para que sean inmunogénicos. Se requiere la identificación de los motivos de anclaje secundarios desfavorables y su sustitución con motivos favorables. Sin embargo, estas sustituciones deben preservar la conformación del segmento de péptido que interactúa con el TCR (posición 4 a la posición 8). El interés, por lo tanto, estuvo centrado en las posiciones de anclaje secundarias 1 y 3: los aminoácidos alifáticos son motivos favorables en la posición 1 (Sidney, Southwood y otros, 1996). Sin embargo, los péptidos Hsp70₁₁₅ y Hsp70₁₃₇ que tienen una Y (tirosina) en la posición 1 son no enlazantes. Por otra parte, la sustitución del aminoácido en la posición 1 por una A (alanina), que también es favorable en esta posición (Parker y otros 1994) aumenta la afinidad de la TERT₄₄₄ pero no de la Hsp70₁₁₅ y los péptidos de MAGE-A_{121.1} (Tabla II). Esto indica que la presencia de aminoácidos favorables en la posición 1 y las posiciones de anclaje 2 y 9/10 no puede asegurar por sí misma una elevada afinidad de unión de todos los péptidos. Por otra parte, se han descrito que los péptidos cargados positivamente (R/H/K) son favorables en la posición 3 (Sidney y otros, 1996) y diez de 26 péptidos inmunogénicos identificados derivados de tumores y del VIH tienen un R/K/H en la posición 3 (Tabla III).

Tabla III: Epítomos restringidos por HLA-B*0702 derivados de tumores y del VIH

Antígeno	Secuencia	ID. SEC. No.	Referencia
NY-ESO-1	APRGVMAV	20	Slager y otros, 2004
ICE	SPRWWPTCL	21	Ronsin y otros, 1999
RAGE-1	SPSSNRIRNT	22	Gaugler y otros, 1996
RU2AS	LPRWPPPQL	23	Van Den Eynde y otros, 1999
RBAF500	RPHVPESAF	24	Lennerz y otros, 2005
Proteína de fusión SSX2	QPRYGVDQIM	25	Worley y otros, 2001
HIVp17	RPGGKKRYKL	26	Bases de datos de Inmunología Molecular de HIV (Gestionada por Los Alamos National Security, LLC, para el U.S. Department of Energy's National Nuclear Security Administration) http://hivweb.lanl.gov/content/immunology/tables/ctl_summary.html
HIVp24	SPRTLNAWV	27	
HIVp24	HPVHAGPIA	28	
HIVp24	PPIPVGIEY	29	
HIVp24	GPGHKARVL	30	
HIV-RT	GPKVKQWPLT	32	
HIV-RT	SPAIFQSSM	33	
HIV-RT	IPLTEEAEL	34	
HIV-RT	QPDKSESELV	35	
HIV-Vif	HPRISSEVHI	36	
HIV-Vif	KPPLPSVKKL	37	
HIV-Vif	FPRTWLHGL	38	
HIVgp 160	KPCVKLTPLC	39	
HIVgp160	KVVSTQLLL	40	
HIVgp160	RPWNNTRKSI	41	
HIVgp160	IPRRIRQGL	42	
HIVnef	FPVTPQVPL	43	
HIVnef	TPQVPLRPM	44	

5 Según todas estas observaciones, todos los péptidos con la secuencia de APX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ (Id. Sec. No. 61) deben tener una elevada afinidad por HLA-B*0702. Esto se confirma por los resultados mostrados en la Tabla IV. Todos los dieciocho péptidos con la secuencia citada anteriormente tenían una elevada afinidad y/o fueron inmunogénicas en ratones transgénicos HLA-B*0702.

Tabla IV. Afinidad e inmunogenicidad de péptidos restringidos por HLA-B*0702 APX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁.

- = AR > 10, + = 1 < AR < 10, ++ = AR < 1. La inmunogenicidad se ensayó tal como se describe en el ejemplo 2.

10 + : significa que se generó una inmunorrespuesta en , como mínimo, un ratón transgénico HLA-B*0702, ND : No determinado

Secuencia	ID: SEC: No.	AR	Inmunogenicidad
APRRLVQLL	5	+	+
APRSPLAPL	6	++	+
APKANKEIL	7	ND	+
APKHSDCLA	8	ND	+
APRCRAVRSL	15	+	+
APRMHCAVDL	45	++	+
APRVSIRLPL	46	++	ND
APREYVNAL	47	+	+
APRGVPQIEL	48	ND	+
APRALVETL	49	+	+
APRMPEAAL	50	ND	+
APRRRLGCEL	51	+	+
APRPWTPCL	52	+	+
APRASSPLL	53	ND	+
APRQLGREL	54	ND	+
APREISSMVL	55	+	+
APRSLGLEL	56	++	+
APRTKAEML	57	+	+

Ejemplo 4: Inmunogenicidad *in vivo* de péptidos con afinidad aumentada y reconocimiento de la contraparte nativa

15 Ratones transgénicos HLA-B7 fueron vacunados con los péptidos seleccionados, y once días después, sus células de bazo se estimularon *in vitro* con el péptido.

En este contexto por lo tanto, Hsp70₁₁₅, Hsp70₃₉₇ y TERT₄₄₄ fueron modificados en la posición 1 (sustitución del aminoácido por una A) y/o la posición 3 (sustitución del aminoácido por una R). Para el péptido Hsp70₃₉₇ se ha introducido una modificación adicional en la posición del extremo C terminal (sustitución de T por una L). Péptidos modificados, es decir, Hsp70_{115A1R3} (ID. SEC. No. 55), Hsp70_{397R3L9} (ID. SEC. No. 56), TERT_{444A1} (ID. SEC. No. 5) mostraron una fuerte afinidad por HLA-B*0702 (Tabla IV) y se indujo una respuesta inmune en la mayoría de los ratones vacunados (Figura 2). Sin embargo, para todos los péptidos excepto el TERT_{444A1}, los CTL generados reconocieron el péptido optimizado, pero no el péptido nativo (Figura 2) correspondiente. Esto sugiere fuertemente que la sustitución del aminoácido en la posición 3 por una R puede cambiar la conformación del segmento de péptido que interactúa con el TCR y garantiza el reconocimiento cruzado con TCR.

Dado que a) todos los péptidos ensayados con APX₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁ tienen una elevada afinidad y son inmunogénicos (Tabla IV y la Figura 1, 2) y b) la sustitución del aminoácido en la posición 3 por un R puede impedir el reconocimiento mutuo del péptido nativo, los presentes inventores seleccionaron péptidos nativos que tienen una P y una R en las posiciones 2 y 3, respectivamente, y sustituyeron el aminoácido en la posición 1 por una A si el último aminoácido era favorable (L, A, I, V o M). Dada la gran importancia de la posición 3, tanto en la afinidad como en el reconocimiento de CTL de péptidos restringidos por HLA-B*0702, los presentes inventores seleccionaron péptidos con la secuencia X₁PX₃ (en los que X₁ es cualquier aminoácido y X₃ es K, R, H o M; estos aminoácidos se han descrito como residuos favorables en la posición 3) y un aminoácido favorable (A/I/L/V) en la posición del extremo C terminal. Los péptidos con esta secuencia y baja afinidad por HLA-B*0702 se han modificado por sustitución del primer residuo por una A. Este es el caso de TERT₄₄₄, Her-2/neu₇₆₀ y Her-2/neu₂₄₆. Los presentes inventores también seleccionaron péptidos con la secuencia de APX₃ (en los que X₃ es K, R, H o M) y un residuo no favorable en la posición del extremo C terminal (es decir, un aminoácido distinto de L, A, I, V o M). Los péptidos con esta secuencia y baja afinidad por HLA-B*0702 se han modificado mediante la sustitución del residuo en la posición del extremo C terminal con una L. Este es el caso de Her-2/neu₁₀₆₉. Todos estos péptidos modificados tenían una fuerte afinidad por HLA-B*0702.

Ejemplo 5: Inmunogenicidad de péptidos optimizados y reconocimiento mutuo de la contraparte nativa

Los péptidos nativos Her2/neu₂₄₆, Her2/neu₇₆₀, Her2/neu₁₀₆₉ y TERT₄₄₄ no fueron inmunogénicos, mientras que los péptidos optimizados fueron inmunogénicos en ratones transgénicos HLA-B*0702. Por otra parte, los CTL inducidos por todos estos péptidos optimizados fueron capaces de producir reconocimiento mutuo con el correspondiente péptido nativo (Figura 3 y Tabla V).

Péptido	Secuencia	ID: SEC: No.	Inmunogenicidad	Reconocimiento mutuo del péptido nativo correspondiente
TERT ₄₄₄	DPRRLVQLL	1	-	
TERT _{444A1}	APRRLVQLL	5	+	+
Her2/neu ₇₆₀	APKANKEIL	3	-	
Her2/neu _{760A1}	APKANKEIL	7	+	+
Her2/neu ₂₄₆	GPKHSDCLA	4	-	
Her2/neu _{246A1}	APKHSDCLA	8	+	+
Her2/neu ₁₀₆₉	APRSPLAPS	2	-	
Her2/neu _{1069L9}	APRSPLAPL	6	+	+

Tabla V: La inmunogenicidad de péptidos restringidos por HLA-B*0702 nativos y optimizados. + para la inmunogenicidad o reconocimiento mutuo del péptido nativo significa que el péptido indujo una respuesta específica en, como mínimo, un ratón transgénico HLA-B*0702, capaz de reconocer el péptido nativo correspondiente.

En conclusión, los presentes inventores han descrito un procedimiento para optimizar la inmunogenicidad (y también la afinidad) de péptidos crípticos restringidos por HLAB*0702. Este comprende a) sustituir el residuo en la posición 1 con una A en todos los péptidos que comprenden la secuencia X₁PX₃ (en la que X₁ es cualquier aminoácido excepto A y X₃ es R o K o H o M), un aminoácido favorable en la posición del extremo C terminal (es decir, L o A o I o V o M), y una baja afinidad por HLA-B*0702, o b) sustituir el residuo en la posición C terminal con una L en péptidos que comprenden la secuencia de APX₃ (X₃ se define tal como anteriormente), un residuo no favorable en la posición C terminal (es decir, un aminoácido diferente que L o A o I o V o M), y una baja afinidad por HLA-B*0702.

Ejemplo 6: El péptido inmunodominante TERT₄ induce CTL específicos de TERT

Ratones transgénicos HLA-B7 se inmunizaron a continuación con TERT₄ (ID. SEC. No. 15) y once días más tarde se estimularon sus células de bazo *in vitro* con el péptido. Los CTL generados mataron a los objetivos RMA-B7 cargados con concentraciones decrecientes de péptido TERT₄ (Figura 4A). El 50% de lisis máxima de los objetivos cargados con TERT₄ se obtuvo con 1,5 nM (Figura 4A). Se ensayaron a continuación CTL respecto a su capacidad para reconocer células COS-7 que expresan HLA-B*0702 y TERT endógeno. Los resultados presentados en la Figura 4B demuestran que los CTL reconocieron células COS-7 transfectadas tanto con HLA-B*0702 como con

TERT pero no células COS-7 transfectadas bien con HLA-B*0702 o bien con TERT, lo que demuestra que el péptido dominante TERT₄ es un epítipo restringido por HLA-B*0702 procesado de forma natural a partir de TERT endógeno.

5 Por otra parte, se estimularon *in vitro* células CD8 de donantes sanos con células dendríticas autólogas cargadas con el péptido TERT₄. Después de cuatro estimulaciones, se ensayaron CTL para determinar la citotoxicidad contra objetivos T2-B7 cargados con TERT₄. Se ensayaron tres donantes y se indujeron CTL en dos de ellos. Los resultados de un donante que responde se presentan en la Figura 4C. Los CTL mataron a los objetivos T2-B7 que presentan TERT₄ pero no a las células T2-B7 que presentan el péptido Nef irrelevante (gráfico de la izquierda). Curiosamente, los CTL mataron a las líneas de células tumorales humanas HLA-B*0702 TERT + SK-MES-1 y HBL-100, pero no a las de HLA-B*0702-TERT + SW-480 y HSS, confirmando la presentación restringida de HLA-B*0702 y el procesamiento endógeno del epítipo TERT₄ (gráfico de la derecha).

Ejemplo 7: Los CTL inducidos por péptidos TERT_{444A1} reconocen el TERT endógeno

15 Se ensayó TERT_{444A1} (ID. SEC. No. 5) respecto a su capacidad para inducir CTL capaces de reconocer de TERT endógeno y para inducir CTL en donantes sanos (Ejemplo 6). Se inmunizaron ratones transgénicos HLA-B*0702 con TERT_{444A1} y once días más tarde se estimularon sus células de bazo *in vitro* con el péptido TERT₄₄₄ nativo (ID. SEC. No. 1). Los CTL generados mataron a los objetivos RMA-B7 cargados con concentraciones decrecientes de péptidos TERT_{444A1} y TERT₄₄₄. El 50% lisis máxima de los objetivos cargados con TERT₄₄₄ y cargados con TERT_{444A1} se obtuvo con 5,5 nM y 1 nM, respectivamente (Figura 5A). Los CTL se ensayaron a continuación respecto a su capacidad para reconocer células COS-7 que expresan HLA-B*0702 y TERT endógeno. Los resultados presentados en la Figura 5B muestran que los CTL reconocieron células COS-7 transfectadas tanto con HLA-B*0702 como con TERT pero no células COS-7 transfectadas bien con HLA-B*0702 o TERT lo que demuestra que TERT₄₄₄ es una epítipo críptico restringido por HLA-B*0702 procesado de forma natural a partir de TERT endógeno.

25 **Ejemplo 8: TERT_{444A1} Estimula CTL de donantes sanos**

Se estimularon células CD8 de donantes sanos *in vitro* con células dendríticas autólogas cargadas con el péptido TERT_{444A1}. Después de cuatro estimulaciones, las células proliferantes fueron divididas en 4 grupos. A continuación, cada grupo se ensayó respecto a la producción de IFN γ intracelular tras la estimulación con células T2-B7 cargadas con TERT_{444A1} optimizado o TERT₄₄₄ nativo. Los resultados del donante D5609 que responde se presentan en la Figura 6. Los CTL que producen IFN γ se detectaron en los grupos 2 y 4 después de la estimulación con células T2B7 cargadas bien con TERT₄₄₄ o bien con TERT_{444A1} (Figura 6).

REFERENCIAS

- Anderton, S. M., Viner, N. J., Matharu, P., Lowrey, P. A., y Wraith, C. D. (2002). Influencia de un epítipo críptico dominante en la tolerancia de células T autoinmunes. *Nat. Immunol* 3, 175-181.
- 40 Bakker, A.B., van der Burg, S. H., Huijbens, R. J., Drijfhout, J. W., Melief, C. J., Adema, G. J., y Figdor, C. G. (1997). Los análogos de epítopos de CTL con la capacidad de unión mejorada a MHC de clase I suscitan epítipo anti-melanoma de tipo salvaje que reconoce CTL. *Int J Cancer* 70, 302-309.
- Boisgérault, F., Anosova, N. G., Tam, R. C., Illigens, B. M., Fedoseyeva, E. V. y Benjún, G. (2000). La inducción de la respuesta de células T a determinantes crípticos de MHC durante el rechazo de aloinjertos. *Hum Immunol* 61, 1352-1362.
- 45 Bowne, W. B., Srinivasan, R., Wolchok, J. D., Hawkins, W. G., Blachere, N. E., Dyal, R. Lewis, J. J., y Houghton, A. N. (1999). Acoplamiento y desacoplamiento de la inmunidad y autoinmunidad tumoral. *J Exp Med* 190, 1717-1722.
- Cibotti, R., Kanellopoulos, J. M., Cabaniols, J. P., Halle-Panenko, O., Kosmatopoulos, K., Sercarz, E. y Kourilsky, P. (1992). La tolerancia a una proteína propia implica sus determinantes inmunodominantes pero no implica a sus subdominantes. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 89, 416-420.
- 50 Colella, T. A., Bullock, T.N., Russell, L.B., Mullins, D.W., Overwijk, W.W., Luckey, C.J. Pierce, R.A, Restifo, N.P., y Engelhard, V.H. (2000). Autotolerancia al homólogo murino de melanoma antígeno tirosinasa derivados: implicaciones para la inmunoterapia tumoral. *J Exp Med* 191, 1221-1232.
- Cortez-Gonzalez, X., Sidney, J., Adotevi, O., Sette, A., Millard, F., Lemonnier, F., Langlade-Demoyen, P., Zanetti, M. (2006). Péptidos de hTRT inmunogénicos restringidos por HLA-B7. *Int Immunol* 18, 1707-1718.
- 55 Disis, M. L., Gooley, T. A., Rinn, K., Davis, D., Piepkorn, M., Cheever, M. A., Knutson, K. L. y Schiffman, K. (2002). Generación de inmunidad a células T a la proteína de HER-2/neu después de la inmunización activa con vacunas de HER-2/neu basadas en péptidos. *J Clin Oncol* 20, 2624-2632.
- Dyal, R., Bowne, W. B., Weber, L. W., LeMaout, J., Szabo, P., Moroi, Y., Piskun, G., Lewis, J. J., Houghton, A. N. y Nikolic-Zugic, J. (1998). La inmunización heteróclita induce inmunidad tumoral. *J Exp Med* 188, 1553-1561.
- 60 Engelhom, M. E., Guevara-Patino, J. A., Noffz, G., Hooper, A. T., Lou, O., Gold, J. S., Kappel, B. J. y Houghton, A. N. (2006). Autoinmunidad e inmunidad tumoral inducidas por respuestas inmunitarias a mutaciones en uno mismo. *Nat Med* 12, 198-206.
- Espevik, T. y Nissen-Meyer, J. (1986). Una línea celular altamente sensible, WEHI 164 clon 13, para medir el factor de necrosis/factor citotóxico tumoral de monocitos humanos. *J Immunol Methods* 95, 99-105.

- Friedman, R. S., Spies, A. G. y Kalos, M. (2004). Identificación de epítomos de células T CD8 de proteína procesados naturalmente, un candidato a vacuna específica de tejido de la próstata. *Eur J Immunol* 34, 1091-1101.
- Gaugler, B., Brouwenstijn, N., Vantomme, V., Szikora, J. P., Van der Spek, C. W., Patard, J. J., Boon, T., Schrier, P., Van den Eynde, B. J. Un nuevo gen que codifica un antígeno reconocido por los linfocitos T citotóxicos autólogos en un carcinoma renal humano. (1996) *Immunogenetics* 44, 323-30
- Gross, D. A., Graff-Dubois, S., Opolon, P., Comet, S., Alves, P., Bennaceur-Griscelli, A., Faure, O., Guillaume, P., Firat, H., Chouaib, S., et al. (2004). Alta eficacia de vacunación de epítomos de baja afinidad en la inmunoterapia antitumoral. *J Clin Invest* 113, 425-433.
- Grossmann, M. E., Davila, E. y Celis, E. (2001). Evitar la tolerancia contra antígenos prostáticos con epítomos peptídicos subdominantes. *J Immunother* 24, 237-241.
- Hawkins, W. G., Gold, J. S., Dyal, R., Wolchok, J. D., Hoos, A., Bowne, W. B., Srinivasan, R., Houghton, A. N. y Lewis, J. J. (2000). La inmunización con ADN que codifica gp100 da como resultado inmunidad antitumoral independiente de células T CD4. *Surgery* 128, 273-280.
- Hernandez, J., Lee, P. P., Davis, M. M. y Sherman, L. A. (2000). La utilización de tetrámeros peptídicos HLA A2.1/p53 para visualizar el impacto de la autotolerancia en el repertorio TCR. *J Immunol* 164, 596-602.
- Lally, K. M., Mocellin, S., Ohnmacht, G. A., Nielsen, M. B., Bettinotti, M., Panelli, M. C., Monsurro, V. y Marincola, F. M. (2001). Desenmascarando epítomos crípticos después de la pérdida de la expresión del antígeno tumoral inmunodominante a través de la difusión de epítomo. *Int J Cancer* 93, 841-847.
- Lennerz V., Fatho M., Gentilini C., Frye R. A., Lifke A., Ferel D., Wölfel C., Huber C., Wölfel T. (2005). La respuesta de las células T autólogas a un melanoma humano está dominada por neoantígenos mutados. *PNAS U.S.A.* 102, 16013-8
- Lu, J., Celis, E. (2000). El uso de dos algoritmos de predicción de internet para la identificación de epítomos de células T reactivas tumorales. *Cancer Res.* 60, 5223-5227.
- Luiten, R., van der Bruggen, P. (2000). Un péptido MAGE-A1 se reconoce en los tumores humanos HLA-B7 por los linfocitos T citotóxicos. *Tissue antigens* 55, 149-152.
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., y otros (1997). hEST2, el gen putativo de la subunidad catalítica de la telomerasa humana, está regulado positivamente en las células tumorales y durante la inmortalización. *Cell* 90, 785-795.
- Moudgil, K. D. y Sercarz, E. E. (1994a). ¿Pueden las respuestas inmunes antitumorales discriminar entre uno mismo y el exterior? *Immunol Today* 15, 353-355.
- Moudgil, K. D. y Sercarz, E. E. (1994b). El repertorio de células T contra autodeterminantes crípticos y su implicación en la autoinmunidad y cáncer. *Clin Immunol Immunopathol* 73, 283-289.
- Moudgil, K. D., Southwood, S., Ametani, A., Kim, K., Sette, A. y Sercarz, E. E. (1999). El repertorio de células T autodirigidas contra lisozima de ratón refleja la influencia de la jerarquía de sus propios determinantes y puede ser acoplada por una lisozima ajena. *J Immunol* 163, 4232-4237.
- Naftzger, C., Takechi, Y., Kohda, H., Hara, I., Vijayasaradhi, S. y Houghton, A. N. (1996). La respuesta inmune a un antígeno de diferenciación inducida por el antígeno alterado: un estudio de rechazo tumoral y autoinmunidad. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14809-14814.
- Overwijk, W. W., Theoret, M. R., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., de Jong, L. A., Vyth-Dreese, F. A., DelleMijn, T. A., Antony, P. A., Spiess, P. J., Palmer, D. C., et al. (2003). Regresión tumoral y autoinmunidad después de la inversión de un estado funcionalmente tolerante de las células autorreactivas T CD8+. *J Exp Med* 198, 569-580.
- Overwijk, W. W., Tsung, A., Irvine, K. R., Parkhurst, M. R., Goletz, T. J., Tsung, K., Carroll, M. W., Liu, C., Moss, B., Rosenberg, S. A. y Restifo, N. P. (1998). Gp100/pm17 es un antígeno murino de rechazo de tumores: inducción de células T "autorreactivas" tumoricidas utilizando un ligando peptídico alterado de alta afinidad. *J Exp Med* 188, 277-286.
- Palomba, M. L., Roberts, W. K., Dao, T., Manukian, G., Guevara-Patino, J. A., Wolchok, J. D., Scheinberg, D. A. y Houghton, A. N. (2005). Inmunidad dependiente de células T CD8+ de la después de la inmunización con ADN xenogénico contra CD20 en un modelo de desafío tumoral de linfoma de células B. *Clin Cancer Res* 11, 370-379.
- Parker, K.C., Bednarek, M.A., Coligan J.E. (1994). Esquema para la clasificación de los péptidos de unión por HLA-A2 potenciales basados en la unión independiente de las cadenas laterales individuales de los péptidos. *J Immunol* 152, 163-175.
- Parkhurst, M. R., Salgaller, M. L., Southwood, S., Robbins, P. F., Sette, A., Rosenberg, S. A. y Kawakami, Y. (1996). Mejora de la inducción de CTL reactivos de melanoma con péptidos a partir del antígeno de melanoma gp100 modificado en los residuos de unión por HLA-A*0201. *J Immunol* 157, 2539-2548.
- Paterson, Y. y Maciag, P. C. (2005). Vacunas a base de Listeria para el tratamiento del cáncer. *Curr Opin Mol Ther* 7, 454-460.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O.A., Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: base de datos para los ligandos y motivos peptídicos del MHC. *Immunogenetics.* 50, 213-219.
- Rohrlich, P. S., Cardinaud, S., Firat, H., Lamari, M., Briand, P., Escriou, N. y Lemonnier, F. A. (2003). Ratones H-2KbDb doble knockout, HLAB* 0702 transgénicos: caracterización fenotípica y funcional en respuesta al virus de la gripe. *Int Immunol* 15, 765-772.
- Ronsin, C., Chung-Scott, V., Poullion, I., Aknouche, N., Gaudin, C., Triebel, F. (1999). Un marco de lectura abierto definido no-AUG alternativo del ARNm de la carboxil-esterasa intestinal genera in situ un epítomo reconocido por los linfocitos infiltrantes reactivos tumorales a células de carcinoma renal. *J Immunol* 163, 483-90.
- Sarobe, P., Pendleton, C. D., Akatsuka, T., Lau, D., Engelhard, V. H., Feinstone, S. M. y Berzofsky, J. A. (1998). Potencia *in vitro* e inmunogenicidad *in vivo* mejoradas de un epítomo de CTL de la proteína del núcleo del virus de la

hepatitis C después de la sustitución de aminoácidos en las posiciones secundarias de unión por HLA-A2.1. *J Clin Invest* 102, 1239-1248.

Scardino, A., Gross, D. A., Alves, P., Schultze, J. L., Graff-Dubois, S., Faure, O., Tourdot, S., Chouaib, S., Nadler, L. M., Lemonnier, F. A., y otros (2002). Epítomos crípticos HER-2/neu y hTERT como nuevos objetivos para la inmunoterapia tumoral de amplio espectro. *J Immunol* 168, 5900-5906.

5 Sidney, J., Southwood, S., del Guercio, M. F., Grey, H. M., Chesnut, R. W., Kubo, R. T. y Sette, A. (1996). La especificidad y la degeneración en la unión de péptidos a moléculas de tipo HLA-B7 de clase I. *J Immunol* 157, 3480-3490.

Sinha, P., Chi, H. H., Kim, H. R., Clausen, B. E., Pederson, B., Sercarz, E. E., Forster, I. y Moudgil, K. D. (2004). La lisozima de ratón de ratones knockout M revela cómo la jerarquía de autodeterminantes conforma el repertorio de células T contra este autoantígeno circulante en ratones de tipo salvaje. *J Immunol* 173, 1763-1771.

10 Slager, E.H., van der Minne, C.E., Goudsmit, J., van Oers J., M., Kostense, S., Havenga, M.J., Osanta, S. y Griffioen, M. (2004). Inducción de células T CD8+ específicas de CAMEL/NY-ESO-ORF2 tras la estimulación con células dendríticas infectadas con un vector Ad5 modificado que expresa una fibra Ad5/35 quimérica. *Cancer Gene Ther* 11, 227-236.

15 Theobald, M., Biggs, J., Hernandez, J., Lustgarten, J., Labadie, C. y Sherman, L. A. (1997). Tolerancia a la p53 por los linfocitos T citotóxicos restringidos por A2.1. *J Exp Med* 185, 833-841.

Tourdot, S., Scardino, A., Saloustrou, E., Gross, D. A., Pascolo, S., Cordopatis, P., Lemonnier, F. A. y Kosmatopoulos, K. (2000). Una estrategia general para mejorar la inmunogenicidad de péptidos asociados por HLA-A2.1 de baja afinidad: implicación en la identificación de epítomos tumorales crípticos. *Eur J Immunol* 30, 3411-3421.

20 Valmori, D., Fonteneau, J. F., Lizana, C. M., Gervois, N., Lienard, D., Rimoldi, D., Jongeneel, V., Jotereau, F., Cerottini, J. C. y Romero, P. (1998). Generación *in vitro* mejorada de CTL específicos reactivos a tumor mediante selección de análogos de péptidos inmunodominantes Melan-A/MART-1. *J Immunol* 160, 1750-1758.

Van Den Eynde, B. J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P., Boon, T. (1999). Un nuevo antígeno reconocido por linfocitos T citotóxicos en un tumor de riñón humano como resultado de la transcripción de cadena inversa. *J. Exp. Med* 190, 1793-1800.

25 Vierboom, M. P., Nijman, H. W., Offringa, R., van der Voort, E. I., van Hall, T., van den Broek, L., Fleuren, G. J., Kenemans, P., Kast, W. M. y Melief, C. J. (1997). Erradicación de tumores por linfocitos T citotóxicos específico de p53 de tipo salvaje. *J Exp Med* 186, 695-704.

30 Weber, L. W., Bowne, W. B., Wolchok, J. D., Srinivasan, R., Qin, J., Moroi, Y., Clynes, R., Song, P., Lewis, J. J. y Houghton, A. N. (1998). La inmunidad y la autoinmunidad tumoral inducida por la inmunización con ADN homólogo. *J Clin Invest* 102, 1258-1264.

Worley, B.S., van den Broeke, L.T., Goletz, T.J., Pendleton C.D., Daschbach, E.M., Thomas E.K., Marincola, F.M., Helman L.J. y Berzofsky, J.A. (2001). Antigenicidad de proteínas de fusión de translocaciones cromosómicas asociadas al sarcoma. *Cancer Res* 61, 6868-6875.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> VAXON BIOTECH KOSMATOPOULOS, Kostantinos (Kostas) GRAFF-DUBOIS, Stéphanie MENEZ-JAMET
- <120> IDENTIFICACIÓN, OPTIMIZACIÓN Y UTILIZACIÓN DE EPITOPOS CRÍPTICOS HLA-B7 PARA INMUNOTERAPIA
- 45 <130> VMA/bv-F1788/3PCT
- <150> PCT/IB2006/002937
- <151> 2006-07-12
- 50 <160> 61
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 9
- 55 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> TERT
- 60 <400> 1

Asp Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
1 5

ES 2 476 919 T3

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> HER-2/neu
 <400> 2
 10
 Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Epítopo críptico HLA-B7 HER-2/neu
 20
 <400> 3
 Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 1 5
 25
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Epítopo críptico HLA-B7 HER-2/neu
 <400> 4
 Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
 1 5
 35
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> TERT
 45
 <400> 5
 Ala Pro Arg Arg Leu Val Gln Leu Leu
 1 5
 50
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Her-2/neu
 <400> 6
 Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Leu
 1 5
 60

ES 2 476 919 T3

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> Epítopo inmunogénico derivado de Her-2/neu
<400> 7
10 Ala Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
1 5
<210> 8
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Epítopo inmunogénico derivado de Her-2/neu
20 <400> 8
Ala Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala
1 5
25 <210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> Péptido
<400> 9
35 Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val
1 5 10
<210> 10
<211> 13
<212> PRT
40 <213> Artificial
<220>
<223> Péptido
45 <400> 10
Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu
1 5 10
50 <210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
55 <223> Hsp70_115
<400> 11
Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu
1 5 10
60

ES 2 476 919 T3

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> 115A1
 <400> 12
 10
 Ala Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Hsp70 137 (10)
 20
 <400> 13
 Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile Thr Val
 1 5 10
 25
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> HSP70 397
 <400> 14
 35
 Ala Pro Leu Ser Leu Gly Leu Glu Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> TERT4
 45
 <400> 15
 50
 Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu
 1 5 10
 55
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> MAGE-A121.1
 <400> 16
 60
 Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu
 1 5

ES 2 476 919 T3

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> 121.A1

10 <400> 17

Ala Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu
1 5

<210> 18
15 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> MAGE-A121.2

<400> 18

Glu Pro Phe Thr Lys Ala Glu Met Leu
1 5

25 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> MAGE-A121.4

<400> 19

35 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
40 <220>
<223> NY-ESO-1
45 <400> 20
50 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
55 <220>
<223> ICE
60 <400> 21

Glu Pro Ile Thr Lys Ala Glu Ile Leu
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
40 <220>
<223> NY-ESO-1
45 <400> 20

Ala Pro Arg Gly Val Arg Met Ala Asn
1 5

50 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> ICE

60 <400> 21

ES 2 476 919 T3

Ser Pro Arg Trp Trp Pro Thr Cys Leu
1 5

5 <210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> RAGE-1
<400> 22

Ser Pro Ser Ser Asn Arg Ile Arg Asn Thr
1 5 10

15 <210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> RU2AS
<400> 23

Leu Pro Arg Trp Pro Pro Pro Gln Leu
1 5

25 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> RBAF500
35 <400> 24

Arg Pro His Val Pro Glu Ser Ala Phe
1 5

40 <210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Proteína de fusión SSX2
<400> 25

Gln Pro Arg Tyr Gly Tyr Asp Gln Ile Met

50 1 5 10

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

55 <220>
<223> HIVp17

ES 2 476 919 T3

<400> 26

Arg Pro Gly Gly Lys Lys Arg Tyr Lys Leu
1 5 10

5 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> HIVp24

<400> 27

Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val
1 5

15 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> HIVp24

25 <400> 28

His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
1 5

30 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> HIVp24

<400> 29

Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr
1 5

40 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> HIVp24

50 <400> 30

Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu
1 5

55 <210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
60 <223> HIV-RT

ES 2 476 919 T3

<400> 31

5 Ser Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu
1 5 10

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

<220>
<223> HIV-RT

15 <400> 32

Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr
1 5 10

<210> 33
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> HIV-RT

<400> 33

Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met
1 5

30 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> HIV-RT

<400> 34

40 Ile Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu
1 5

<210> 35
<211> 10
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> HIV-RT

50 <400> 35

Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu Val
1 5 10

55 <210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>

ES 2 476 919 T3

<223> HIV-Vif
 <400> 36

5 His Pro Arg Ile Ser Ser Glu Val His Ile
 1 5 10

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> HIV-Vif

15 <400> 37

Lys Pro Pro Leu Pro Ser Val Lys Lys Leu
 1 5 10

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 25 <223> HIV-Vif

<400> 38

Phe Pro Arg Thr Trp Leu His Gly Leu
 1 5

30 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> HIVgp160

<400> 39

40 Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys
 1 5 10

<210> 40
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> HIVgp160

50 <400> 40

Lys Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu
 1 5

55 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 476 919 T3

<220>
 <223> HIVgp160
 <400> 41
 5 Arg Pro Trp Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> HIVgp160
 15 <400> 42
 Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu
 1 5
 20 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> HIVnef
 <400> 43
 Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Leu
 1 5
 30 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> HIVnef
 40 <400> 44
 Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met
 1 5
 45 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> EphA2
 <400> 45
 Ala Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Leu
 1 5 10
 55 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>

ES 2 476 919 T3

<223> EphA2

<400> 46

5 Ala Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro Leu
1 5 10

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Her-2/neu

15 <400> 47

Ala Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Leu
1 5

<210> 48

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido artificial

<400> 48

Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Leu
1 5 10

30

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> MAGE-A

<400> 49

40

Ala Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Leu
1 5

<210> 50

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> Péptido artificial

<400> 50

Ala Pro Arg Met Pro Glu Ala Ala Leu
1 5

55

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

60

<220>

ES 2 476 919 T3

<223> TERT
 <400> 51

5 Ala Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Leu
 1 5 10

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido artificial

15 <400> 52

Ala Pro Arg Pro Trp Thr Pro Cys Leu
 1 5

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

<220>
 25 <223> Péptido artificial

<400> 53

Ala Pro Arg Gln Leu Gly Arg Glu Leu
 1 5

30 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido artificial

<400> 54

40 Ala Pro Arg Gln Leu Gly Arg Glu Leu
 1 5

<210> 55
 <211> 10
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 115A1R3

50 <400> 55

Ala Pro Arg Glu Ile Ser Ser Met Val Leu
 1 5 10

55 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>

ES 2 476 919 T3

<223> 397R3L9

<400> 56

5 Ala Pro Arg Ser Leu Gly Leu Glu Leu
1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> 121.1 A1R3

15 <400> 57

Ala Pro Arg Thr Lys Ala Glu Met Leu
1 5

<210> 58

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Epítipo críptico restringido por HLA-B*0702

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (1)..(1)

30 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (3)..(3)

35 <223> Xaa es Arg o Lys o His o Met

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (4)..(7)

40 <223> Xaa es independientemente cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (8)..(10)

45 <223> Xaa es independientemente cualquier aminoácido de origen natural o ninguno

<220>

<221> CARACTERÍSTICAS VARIAS

<222> (11)..(11)

50 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural con la condición de que si Xaa (1)..(1) es Ala entonces Xaa (11)..(11) no es ni Leu ni Ala ni Ile ni Val ni Met; y si Xaa (1)..(1) no es Ala entonces Xaa (11)..(11) es Leu o Ala o Ile o Val o Met

<400> 58

55

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 59

<211> 11

60 <212> PRT

<213> Artificial

ES 2 476 919 T3

- <220>
 <223> Epítipo críptico restringido por HLA-B*0702
- 5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural excepto Ala
- 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222>(3)..(3)
 <223> Xaa es Arg o Lyso His o Met
- 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (4)..(7)
 <223> Xaa es independientemente cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (8)..(10)
 <223> Xaa es independientemente cualquier aminoácido de origen natural o ninguno
- 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Leu o Ala o Ile o Val o Met
- 30 <400> 59
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Pro | Xaa |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | |
- 35 <210> 60
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> Epítipo críptico restringido por HLA-B*0702
- 45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es Arg o Lys o His o Met
- 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (4)..(7)
 <223> Xaa es independientemente cualquier aminoácido de origen natural
- 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (8)..(10)
 <223> Xaa es independientemente cualquier aminoácido de origen natural o ninguno
- 60 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS VARIAS
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido de origen natural diferente de Leu o Ala o Ile o Val o Met
- <400> 61
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Xaa |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Epítopo críptico restringido por HLA-B*0702, que es un péptido seleccionado del grupo que comprende APRSPLAPS (ID. SEC. No. 2), SPKANKEIL (ID. SEC. No. 3), GPKHSDCLA (ID. SEC. No. 4).
2. Epítopo inmunogénico restringido por HLA-B*0702, que es un péptido optimizado derivado de un péptido críptico, según la reivindicación 1, en el que dicho epítopo inmunogénico se selecciona del grupo que comprende APRSPLAPL (ID. SEC. No. 6), APKANKEIL (ID. SEC. No. 7), APKHSDCLA (ID. SEC. No. 8).
- 10 3. Polipéptido quimérico, que comprende dos, tres o más epítomos crípticos restringidos por HLA-B*0702 seleccionados del grupo que comprende APRSPLAPS (ID. SEC. No. 2), SPKANKEIL (ID. SEC. No. 3), GPKHSDCLA (ID. SEC. No. 4), DPRRLVQLL (ID. SEC. No. 1).
- 15 4. Polipéptido quimérico, que comprende dos, tres o más epítomos inmunogénicos restringidos por HLA-B*0702 seleccionados del grupo que comprende APRSPLAPL (ID. SEC. No. 6), APKANKEIL (ID. SEC. No. 7), APKHSDCLA (ID. SEC. No. 8) y APRRLVQLL (ID. SEC. No. 5).
- 20 5. Molécula de ácido nucleico aislada diseñada para causar la expresión de un epítopo críptico restringido por HLA-B*0702, según la reivindicación 1, un epítopo inmunogénico, según la reivindicación 2, o un polipéptido quimérico, según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 25 6. Composición farmacéutica que comprende, como mínimo, como un principio activo, un epítopo críptico restringido por HLA-B*0702 según la reivindicación 1, o un polipéptido epítopo inmunogénico, según la reivindicación 2, o un polipéptido quimérico, según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o un ácido nucleico según la reivindicación 5.
- 30 7. Composición farmacéutica, según la reivindicación 5, que es una vacuna.
8. Kit de partes que comprende, en formulaciones separadas, un primer péptido que tiene la secuencia de un epítopo críptico restringido por HLA-B*0702, y un segundo péptido que corresponde a su epítopo inmunogénico restringido por HLA-B*0702 cognado, en el que dicho primer péptido es un epítopo críptico, según la reivindicación 1, y dicho segundo péptido es un péptido inmunogénico, según la reivindicación 2.
- 35 9. Kit de partes que comprende, en formulaciones separadas, un primer polipéptido quimérico que comprende dos, tres o más epítomos crípticos restringidos por HLAB *0702, y un segundo polipéptido quimérico que comprende los epítomos inmunogénicos restringidos por HLA-B*0702 cognados a los epítomos crípticos restringidos por HLA-B*0702 comprendidos en el primer polipéptido quimérico, en el que dicho primer polipéptido quimérico es un polipéptido quimérico, según la reivindicación 3, y dicho segundo polipéptido quimérico es un polipéptido quimérico, según la reivindicación 4.
- 40 10. Kit, según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que es un kit de vacunación, en el que dichos primer y segundo péptidos o polipéptidos quiméricos están en dosis de vacunación separadas.
- 45 11. Kit de vacunación, según la reivindicación 10, que comprende 2 ó 3 dosis de segundo péptido o polipéptido quimérico, y 3, 4, 5, 6 o hasta 50 dosis de primer péptido o polipéptido quimérico.
- 50 12. Vacuna, según la reivindicación 7, o kit de vacunación, según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que cada dosis comprende de 1 a 5 mg de péptido o de 1 a 20 mg de polipéptido quimérico.
- 55 13. Vacuna, según la reivindicación 7 o la reivindicación 12, o kit de vacunación según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en la que las dosis de vacunación se formulan para inyección subcutánea.
- 60 14. Epítopo críptico restringido por HLA-B*0702, según la reivindicación 1, o un polipéptido epítopo inmunogénico según la reivindicación 2, o un polipéptido quimérico según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o un ácido nucleico según la reivindicación 5, para su utilización en inmunoterapia preventiva o curativa contra el cáncer.
- 65 15. Péptido, según la reivindicación 1, para su utilización para el mantenimiento de la respuesta inmune de CTL iniciado por su péptido cognado optimizado, o por un polipéptido que contiene el mismo.
16. Polipéptido quimérico, según la reivindicación 3, para su utilización para mantener la respuesta inmune iniciada por CTL ya sea por su polipéptido quimérico optimizado cognado, o por péptidos optimizados cognados a dicho epítomos crípticos.
17. Péptido inmunogénico, según la reivindicación 2, para su utilización para iniciar una respuesta inmune de CTL contra su epítopo críptico restringido por HLA-B*0702 cognado.

18. Polipéptido quimérico, según la reivindicación 4, para su utilización para iniciar una respuesta inmune de CTL contra los epítomos crípticos restringidos por HLA-B*0702 cognados a los epítomos presentes en dicho polipéptido quimérico.

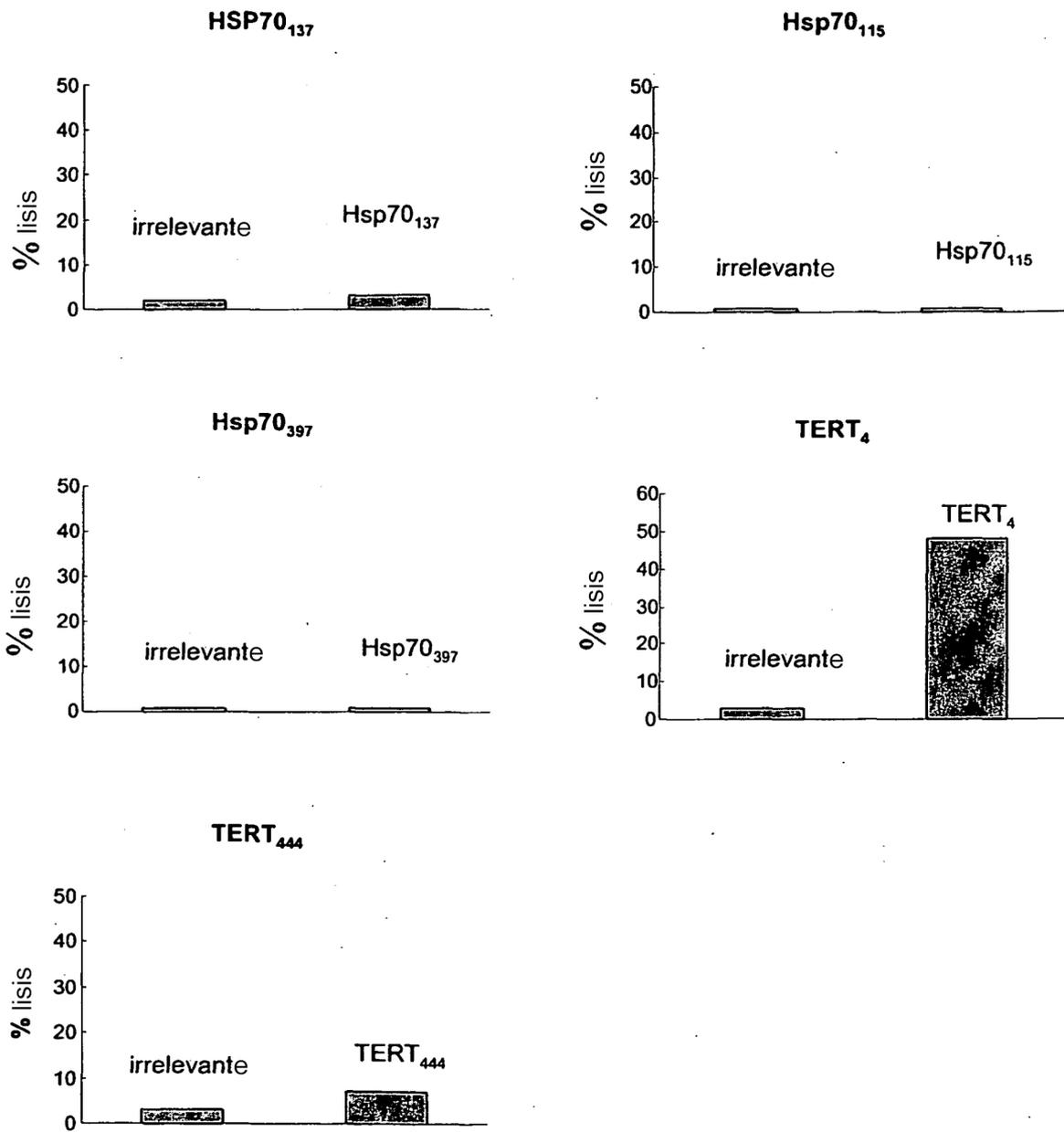


Figura 1

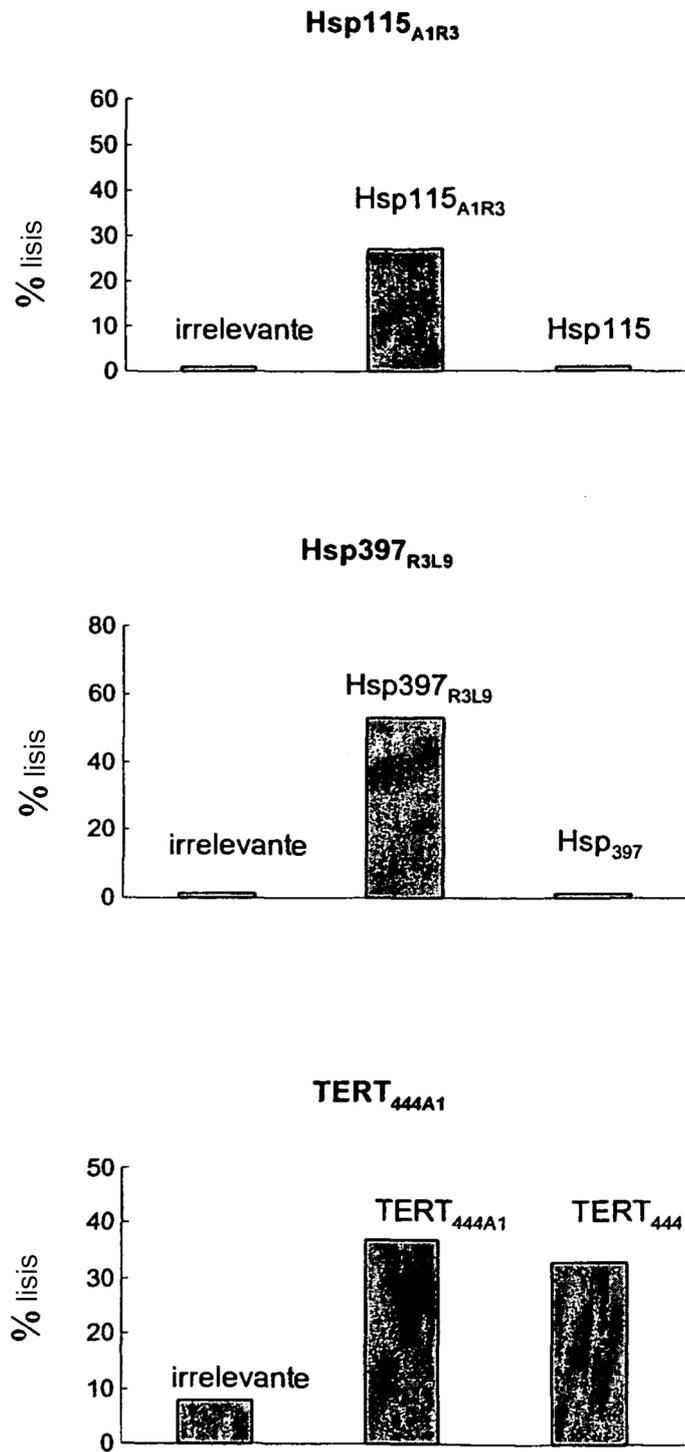


Figura 2

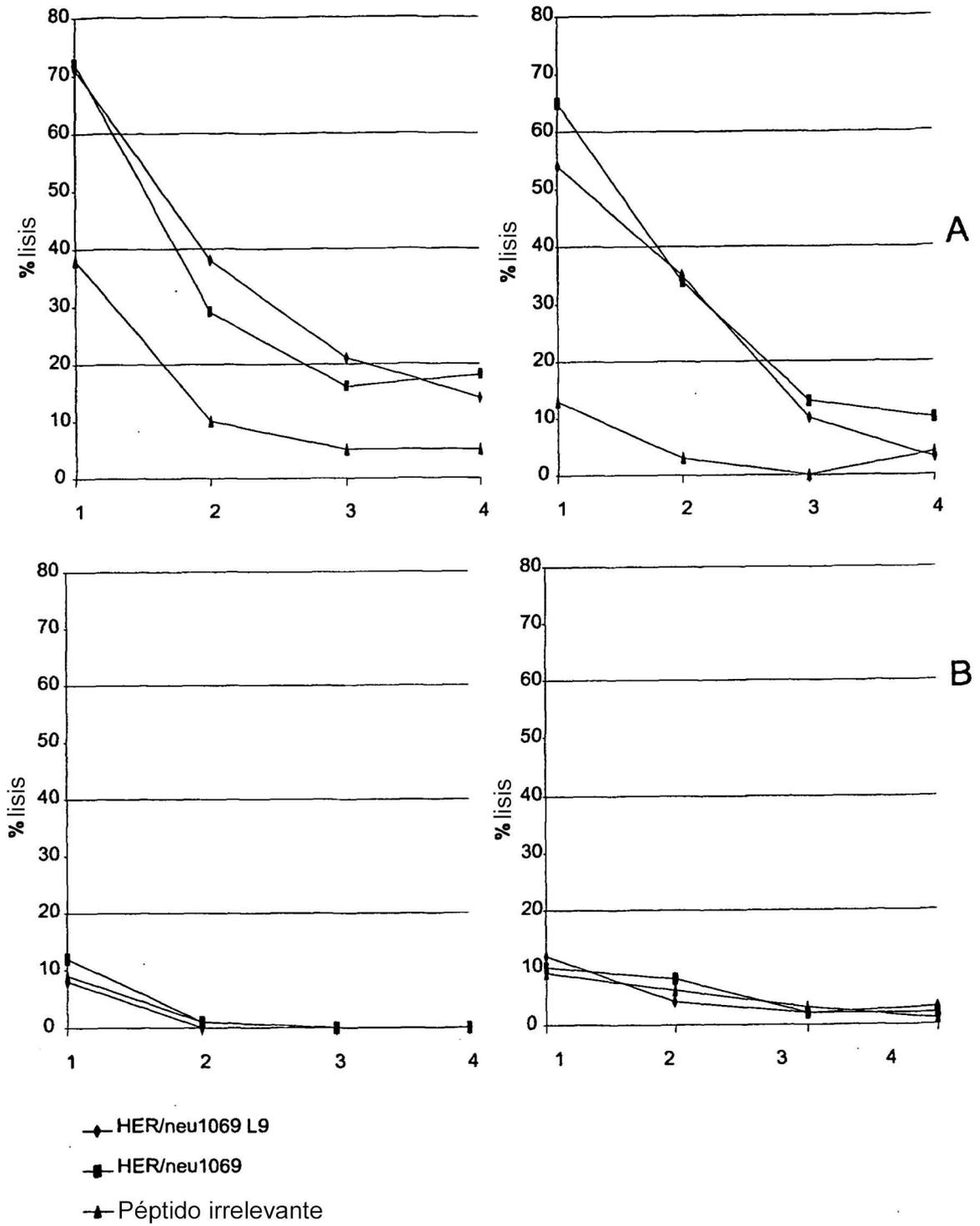


Figura 3

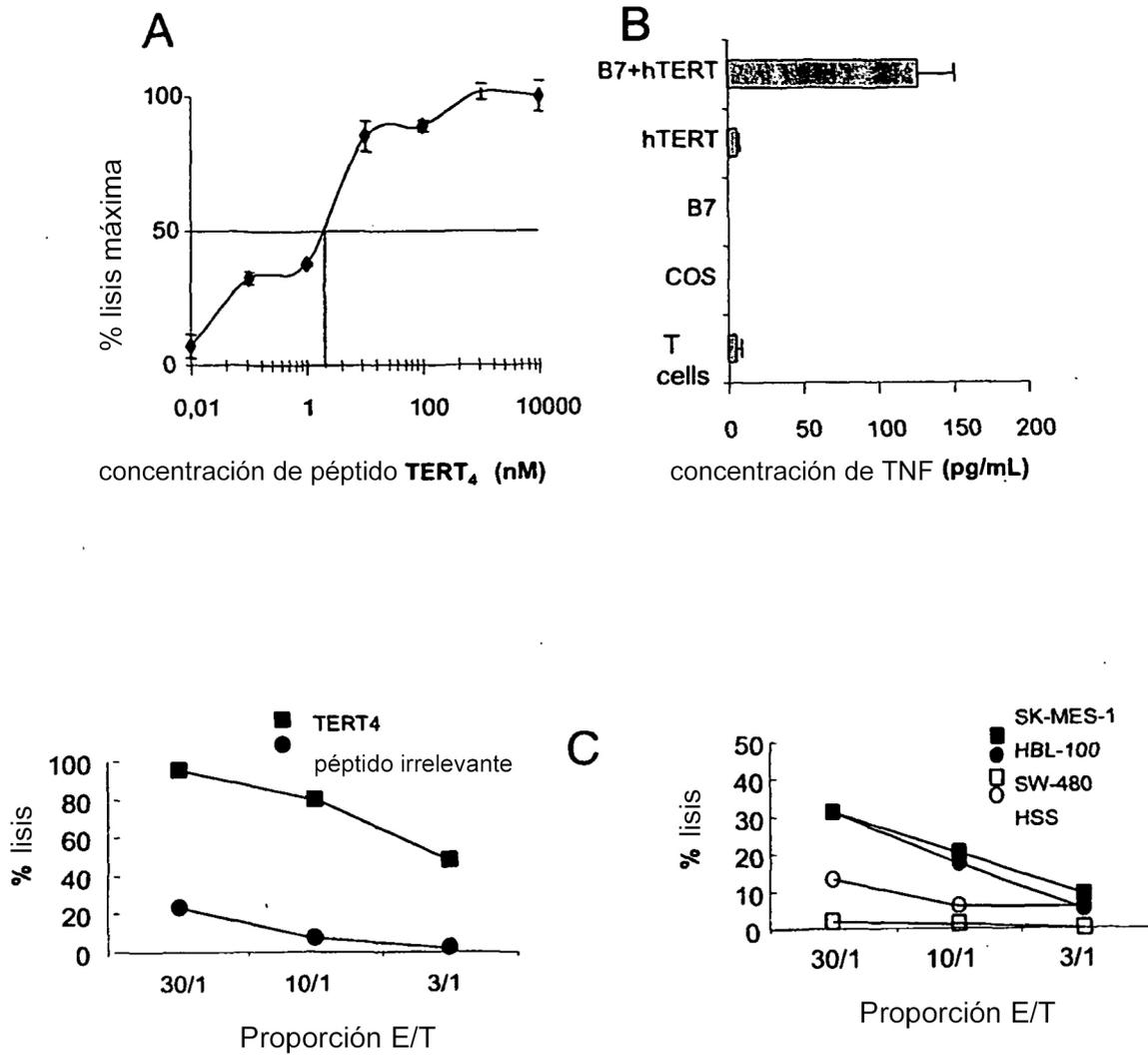
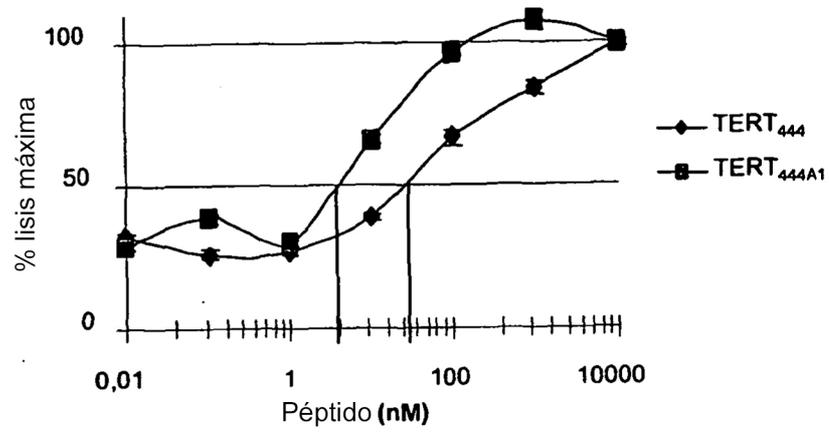


Figura 4

A



B

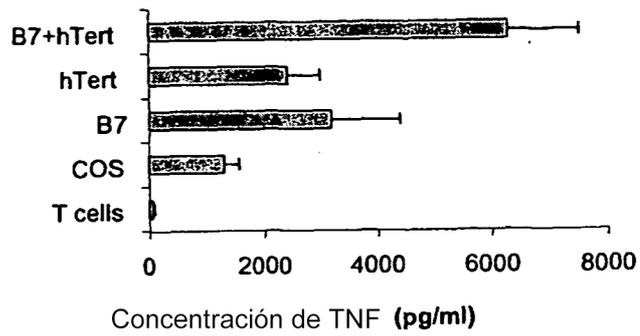


Figura 5

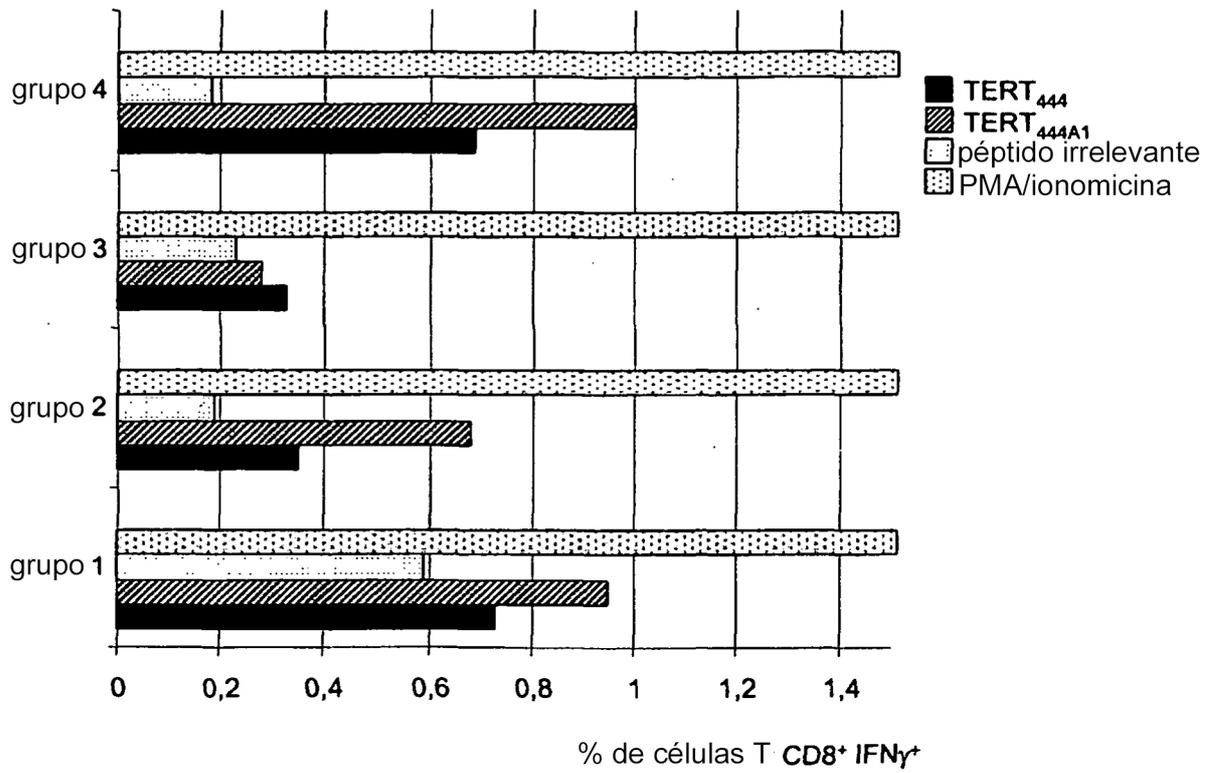


Figura 6