

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 483**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2006 E 06785065 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 1912680**

54 Título: **Péptidos HER-2**

30 Prioridad:

15.06.2005 US 690574 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2015

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION (100.0%)
1524 North High Street
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

KAUMAYA, PRAVIN, T., P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 531 483 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 HER-2

5 **Apoyo gubernamental**

El trabajo descrito en la presente solicitud fue apoyado, al menos en parte, por subvenciones NIH 5ROI CA 84356 del Instituto Nacional de Salud. El gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos en la presente invención.

10 **Antecedentes**

En la actualidad, las metodologías más comunes para el tratamiento del cáncer de mama consisten en cirugía, intervención química y/o radioterapia. A menos que el cáncer se limite a una zona definida, no se puede eliminar solo con cirugía. Por consiguiente, tras la cirugía, a menudo se administra un tratamiento de radiación para destruir las células cancerosas que se encuentran cerca de la zona quirúrgica y que han evadido la cirugía. Los efectos secundarios de dicho tratamiento incluyen sensibilidad cutánea o picazón, interferencia con el sistema inmunológico, a veces náuseas y, rara vez, fibrosis por radiación en la que una parte afectada del pulmón se vuelve fibrosa. Tras la cirugía, también se puede emplear la quimioterapia. La quimioterapia utiliza fármacos que son tóxicos para las células cancerosas. Dado que no se trata de un sistema perfectamente selectivo, también se ven afectadas las células normales. Los efectos secundarios negativos incluyen náuseas, cansancio, pérdida de apetito, pérdida de cabello y diarrea.

En vista de dichas terapias actuales, se han hecho intentos por encontrar metodologías adicionales para el tratamiento del cáncer de mama. Una de dichas metodologías es la inmunoterapia. Una de las dianas para una metodología inmunoterapéutica es la proteína HER-2. La proteína HER-2, un producto del oncogén HER-2, se sobreexpresa en varios cánceres. Se encuentra en el 50-60 % de los carcinomas ductales *in situ* y en el 20-40 % de todos los cánceres de mama, así como en una fracción sustancial de los adenocarcinomas que aparecen en los ovarios, la próstata, el colon y los pulmones. La sobreexpresión de la proteína HER-2 se relaciona con la transformación maligna en los seres humanos. La sobreexpresión de la proteína HER-2 también está íntimamente ligada a la agresividad del tumor maligno, encontrándose en una cuarta parte de todos los cánceres de mama invasivos. La sobreexpresión de la proteína HER-2 se correlaciona con un mal pronóstico del cáncer de mama y de ovario.

En estudios recientes, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra el dominio de unión extracelular (ECD) de HER-2 confieren efectos inhibidores sobre el crecimiento tumoral *in vitro* y en modelos animales (Hudziak, R. M., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:11-65-72, 1989; Tagliabue, E., *et al.*, *Int. J. Cancer* 47:933-7, 1991; Drebin, J. A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83:9129-33, 1986; Drebin, J. A., *et al.*, *Oncogene*, 2:273-7, 1988; Drebin, J. A., *et al.*, *Oncogene*, 2:387-94, 1988y Katsumata, M., *et al.*, *Nat. Med.* 1:644-8, 1995). Además, en ensayos clínicos en Fase II y III de un anticuerpo monoclonal anti-HER-2 humanizado recombinante, trastuzumab, en pacientes con metástasis, los cánceres de mama que sobreexpresaban HER-2 produjeron una tasa de respuesta global del 15 % como agente único. También se ha demostrado que el anticuerpo trastuzumab mejora la supervivencia cuando se combina con agentes quimioterapéuticos citotóxicos (Baselga, J., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-44, 1996; Pegram, M. D., *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 16:2659-71, 1988). También se ha evaluado una serie de metodologías de vacunación dirigidas a una proteína HER-2 recombinante, el ECD de HER-2 o el ECD de *neu* de rata, que es el homólogo en ratas de HER-2. Por ejemplo, la cepa de ratones NFS inmunizados con un virus *vaccinia* recombinante que expresa el ECD de *neu* de rata desarrolló una respuesta de anticuerpos protectora contra la estimulación subsiguiente con células NIH 3T3 transformadas por *neu* (Bernards, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 84: 6854-8, 1987). La inmunización de las ratas BDIX con el mismo inmunógeno, sin embargo, no dio lugar a la respuesta de los anticuerpos ni tampoco inhibió el crecimiento de células singénicas de neuroblastoma B 104 que expresaban *neu*, lo que sugiere que esta estrategia fue insuficiente para inducir respuestas inmunes en la rata. Una vacuna de complejo de polisacáridos y oncoproteínas, que consiste en los 147 aminoácidos amino-terminales del ECD de HER-2 formando un complejo con manano y pululano portadores de grupos colesterilo, indujo respuestas inmunes celulares y humorales que mediaron el rechazo de sarcomas de expresión de HER-2 en ratones BALB/c (Gu, X. G., *et al.*, *Cancer Res.*, 58: 3385-90, 1998). Se demostró la protección parcial en ratones transgénicos con *neu* de rata destinados a desarrollar tumores mamarios mediante la inmunización, bien con ECD de *neu* de rata purificada (Esserman, L. J., *Cancer Immunol. Immunother.*, 47:337-42, 1999) o fibroblastos murinos alogénicos transfectados con *neu* (Cefai, D., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 83:393-400, 1999).

A pesar de los resultados de los estudios descritos anteriormente, todavía no está claro si se pueden generar respuestas inmunes eficaces en los seres humanos usando estrategias de vacunación basadas en células o en proteínas dirigidas a HER-2 o al ECD de HER-2, pues HER-2 es un auto-antígeno no mutado. Por consiguiente, es deseable tener metodologías inmunoterapéuticas adicionales para tratar o prevenir el cáncer de mama y otros tumores malignos vinculados con la sobreexpresión de la proteína HER-2.

El documento WO2001/08636 desvela composiciones para la estimulación del sistema inmune y para el tratamiento de tumores malignos asociados con la sobreexpresión de la proteína HER-2. Las composiciones desveladas

incluyen epítomos inmunogénicos de las proteínas HER-2, y péptidos quiméricos y multivalentes que comprenden dichos epítomos.

Sumario

De acuerdo con realizaciones, se proporciona un epítomo B de HER-2. El epítomo tiene una secuencia de LHCPALVYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV.

Las realizaciones de la invención se describen con más detalle en el presente documento.

Breve descripción de las diversas vistas de las figuras

La siguiente descripción detallada se puede comprender mejor si se lee junto con las siguientes figuras, en las que las estructuras similares se indican con números de referencia similares, y en las que:

La Figura 1 ilustra la secuencia de la proteína HER-2.

La Figura 2 muestra la estrategia sintética para 3 enlaces disulfuro. Se usaron protección de cisteína diferencial, y eliminación y oxidación selectivas para generar los enlaces disulfuro correctos como se ilustra.

La Figura 3 muestra la respuesta inmune en ratones FVB/n. Se inmunizaron grupos de cuatro a diez ratones FVB/n con las construcciones peptídicas lineales (NC) o de enlace disulfuro (SS) (A) MVF563-598, (B) MVF585-598, (C) MVF597-626 o el péptido lineal (D) MVF613-626. Cada ratón se representa como una barra individual. Cabe señalar que la escala de A es diferente de la de B-D.

La Figura 4 muestra que trastuzumab reconoce específicamente epítomos de péptidos diseñados para imitar el sitio de unión a trastuzumab de HER-2. Las secuencias peptídicas se dan en el eje X. MVF316-339 es un péptido de control irrelevante Her-2.

La Figura 5 muestra la citometría de flujo de anticuerpos específicos del péptido con células de cáncer de mama humanas que sobreexpresan HER-2. La citometría de flujo se usó para evaluar si los anticuerpos de los ratones FVB/n inducidos por diversas construcciones reconocían la HER-2 nativa. Se trataron células de cáncer de mama humanas BT-474 (HER-2high) con 10 µg/ml de Ig de ratón normal (control negativo), Ab-2 monoclonal de ratón (control positivo) o anticuerpos peptídicos generados en ratones FVB/n.

La Figura 6 muestra los sitios de unión a trastuzumab con HER-2.

La Figura 7 muestra la estructura tridimensional de epítomos peptídicos de herceptina.

La Figura 8 muestra la estructura de HER-2 unida a Omnitarg™ (Pertuzumab).

La Figura 9 muestra el sitio de unión a trastuzumab de HER-2. (A) Diagrama de cintas de HER-2 y la cadena pesada y ligera del complejo de trastuzumab. (B) Sitio de unión a trastuzumab de HER-2. Esta región es rica en disulfuro. Se indican las secuencias de los tres bucles que interactúan con trastuzumab.

La Figura 10 muestra la unión de trastuzumab a péptidos. Se recubrieron pocillos de microtitulación durante una noche con 2 µg/ml de diversos péptidos y luego se bloquearon con BSA al 1 % durante una hora. A continuación, se añadió trastuzumab a las placas a una concentración de 2.000 µg/ml y se diluyeron en serie a 1:2 con PBT. Se detectó el trastuzumab unido con IgG anti-humana conjugada con HRP y luego con sustrato. (A) Valor de DO_{415} para los péptidos de la Tabla I y un péptido de control irrelevante (MVF316-339) usando 2.000 µg/ml de trastuzumab. Los valores mostrados son la media de las muestras por duplicado. Los ETM se indican mediante barras de error. (B) Titulación de trastuzumab con las formas de enlace disulfuro (CYC) y lineal (NC) de MVF563-598 junto con el péptido de control irrelevante (MVF316-339).

La Figura 11 muestra la proliferación celular mediante el ensayo de MTT. Se sembraron células BT474 en placas de microtitulación de 96 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se añadió PBS que contenía trastuzumab o IgG humana normal (100 µg/ml) con o sin péptido a las concentraciones indicadas a los pocillos. Se incubaron las placas durante tres días a 37 °C. Se midió el número de células viables con MTT mediante la lectura de DO_{570} . Se calculó el porcentaje de inhibición usando la fórmula $(DO_{IgG\ humana\ normal} - DO_{trastuzumab + péptido}) / DO_{IgG\ humana\ normal} \times 100$. Los valores mostrados son la media de las muestras por triplicado. Los ETM se indican mediante barras de error.

La Figura 12 muestra la respuesta de los anticuerpos contra péptidos en ratones transgénicos FVB/n (A) y Neu-N (B). Se realizaron ELISA directos en los sueros de ratones inmunizados con las construcciones ciclada (CYC) y lineal (NC) para determinar las diferencias en la inmunogenicidad. Los títulos de los anticuerpos contra el inmunógeno correspondiente se definieron como el recíproco de la dilución más alta con absorbancia $\geq 0,2$. Cada barra representa un ratón individual. La designación del eje X representa el momento en el que se tomaron las muestras de los sueros, por ejemplo, 1y+3 corresponde a un suero recogido tres semanas después de la primera inmunización. Los ratones Neu-N tienen un fondo de FVB/n y expresan el proto-oncogén *neu* de rata normal bajo el control de un promotor mamario específico. Estos ratones muestran tolerancia a *neu* en relación con los ratones no transgénicos (*Cancer Research* 60, 3569). B demuestra que aunque estos ratones son tolerantes a *neu* de rata, son capaces de generar una respuesta inmune contra los inmunógenos del péptido.

La Figura 13 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos peptídicos contra HER-2. Se ensayó la reactividad de los anticuerpos purificados de sueros murinos inmunizados con líneas celulares de cáncer de mama (A) BT474 y (B) SKBR-3 usando el análisis de citometría de flujo. Se detectó la unión de los anticuerpos con anticuerpos murinos anti-cabra conjugados con FITC. El eje X representa la intensidad de fluorescencia y el

eje Y representa el número relativo de células. Cada histograma contiene una superposición de pre IgG murina, anticuerpos de péptidos y AB2, un anticuerpo monoclonal murino que se une a HER-2. Ambas líneas celulares demuestran que los anticuerpos de los epítomos 563-598 y 585-598 no reconocen a HER-2, mientras que los anticuerpos de los epítomos 597-626 y 613-626 reconocen a HER-2.

La Figura 14 muestra una representación esquemática de la construcción de vacuna de péptido quimérico que consiste en epítomo derivado de MVF de linfocitos Th "promiscuo" sintetizado colinealmente con el epítomo de linfocitos B a través de un enlazador flexible (GPSL), lo que permite el plegamiento independiente de MVF y el epítomo de linfocitos B. Esta combinación puede ayudar a producir anticuerpos óptimos mediante la activación tanto de brazos humorales como innatos del sistema inmune.

La Figura 15 muestra que se usó la oxidación del yodo para formar el enlace disulfuro de origen natural entre Cys268 y Cys295.

La Figura 16 muestra la inmunogenicidad en conejos NZW inmunizados con péptidos no ciclados (NC) y ciclados (CYC) MVFHER2 (266-296). Se recoge suero semanalmente y se purifican los anticuerpos para su uso en estudios de diagnóstico. Los títulos de los anticuerpos se determinan mediante ELISA directo.

La Figura 17 muestra A) inmunogenicidad en ratones FVB/n de tipo silvestre inmunizados bien con péptido ciclado (CYC) o no ciclado (NC) MVFHER2 (266-296) (8 ratones/grupo). B) inmunogenicidad en 3 ratones que sobreexpresan Neu con fondo de FVB/n. Los títulos de anticuerpos se determinan mediante ELISA directo.

La Figura 18 muestra la estructura de cinta del dominio extracelular de HER-2 que interactúa con herceptina. Las flechas muestran los tres bucles donde HER-2 entra en contacto con la herceptina.

La Figura 19 muestra las medidas de espectroscopia de CD que se realizaron usando solución 100 μ M de Her-2 563-598 CYC y Her-2 563-598 NC en agua. El epítomo HER-2 563-598 CYC, que está delimitado por tres enlaces disulfuro muestra mínimos de elipticidad por CD a 193 nm, mientras que el péptido exento del epítomo HER-2 563-598 NC muestra mínimos de elipticidad por CD a 204 nm, lo que demostró diferencias significativas en la estructura secundaria.

La Figura 20 muestra el epítomo HER-2 563-598, y la estrategia para la oxidación selectiva, la reducción y el análisis de los enlaces disulfuro usando un agente de biotilación, que ataca a los grupos sulfhidrilo libres, pudiéndose usar, por tanto, para determinar la finalización del enlace disulfuro.

La Figura 21 muestra la formación regioselectiva de disulfuros. La protección de la cadena lateral para los restos 315 y 331 era tritilo, que se eliminó convenientemente tras la escisión de la resina. La cadena lateral de los restos de cisteína en 299 y 311 se protegió con Acm, que se puede eliminar selectivamente y ciclarse por oxidación (12) tras la primera ciclación.

La Figura 22 muestra la respuesta de los anticuerpos contra péptidos en conejos NZW exogámicos (A) y ratones FVB/n endogámicos (B). Se realizaron ELISA directos en sueros de animales inmunizados con las construcciones ciclada (CYC) y lineal (NC) para determinar las diferencias en la inmunogenicidad. Los títulos de los anticuerpos contra el inmunógeno correspondiente se definieron como el recíproco de la dilución más alta con absorbancia $\geq 0,2$. Cada barra representa un animal individual. La designación del eje X representa el momento en el que se tomaron las muestras de los sueros, por ejemplo, 1y+3w corresponde a un suero recogido tres semanas después de la primera inmunización.

La Figura 23 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos peptídicos contra HER-2. Se ensayó la reactividad de los anticuerpos purificados de sueros de conejo inmunizados con líneas celulares de cáncer de mama (A) BT474 (HER-2high) y (B) MDA468 (HER-2low) usando el análisis de citometría de flujo. Se detectó la unión de los anticuerpos con anticuerpos de conejo anti-cabra conjugados con FITC. El eje X representa la intensidad de fluorescencia y el eje Y representa el número relativo de células. Cada histograma contiene una superposición de pre IgG de conejo, anticuerpos de péptidos y herceptina, un anticuerpo monoclonal humano que se une a HER-2.

La Figura 24 muestra que los anticuerpos peptídicos inducen ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) contra células de cáncer de mama BT474 *in vitro*. Se incubó la línea de células diana BT474 con anticuerpos peptídicos de conejos, IgG de conejo normal o herceptina en presencia de Na_5CrO_4 durante una hora. Tras tres lavados, se cultivaron las células diana con células efectoras PBMc humanas para dar una proporción de células efectoras:diana de 100:1, 20:1 y 4:1 durante cuatro horas a 37 $^{\circ}$ C. Seguidamente, se recogió el sobrenadante y se determinó la radiactividad usando un contador γ . La citotoxicidad se calculó a partir de la fórmula $100 \times (A-B)/(C-B)$, en la que A representa ^{51}Cr (cpm) del sobrenadante de ensayo, B representa ^{51}Cr (cpm) solo de la diana en cultivo (espontánea) y C representa la liberación máxima de ^{51}Cr de las células lisadas con SDS al 5 %. Los resultados representan la media (\pm ETM) de las muestras por triplicado.

La Figura 25 muestra una representación esquemática de la construcción de vacuna de péptido quimérico que consiste en el epítomo de linfocitos Th "promiscuo" derivado de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF, restos 288-302) sintetizado colinealmente con el epítomo de linfocitos B (HER 2 (266-296)) a través de un enlazador flexible (GPSL), lo que permite el plegamiento independiente de MVF y el epítomo de linfocitos B.

La Figura 26 muestra que se realizó la síntesis de péptidos en fase sólida usando resina ácida de Fmoc-Val-CLEAR precargada. Se escindieron los péptidos usando Reactivo B (TFA:fenol:H₂O:TIS, 90:4:4:1) y se purificó el péptido en bruto mediante RP-HPLC. Se usó la oxidación de yodo para formar el enlace disulfuro de origen natural entre Cys268 y Cys295;

La Figura 27 muestra A) los títulos de anticuerpos de conejos NZW inmunizados con péptidos no ciclados y ciclados MVF-HER-2 (266-296). B) Los títulos de anticuerpos de ratones FVB/n de tipo silvestre inmunizados con péptidos no ciclados y ciclados MVF-HER-2 (266-296). C) Los títulos de anticuerpos de ratones FVB/n que

sobreexpresan Neu inmunizados con MVF-HER-2 (266-296). Se recogió el suero semanalmente y los títulos se determinaron mediante ELISA directo.

La Figura 28 muestra los anticuerpos ciclados y no ciclados MVF-HER-2(266-296) purificados ensayados para determinar su capacidad para unirse a la proteína nativa en células tumorales que sobreexpresan HER-2 BT474 humanas (A) y células tumorales que sobreexpresan neu NT2.5 de ratón (B). Ambos anticuerpos se cambiaron en comparación con el control normal de isotipo IgG y tuvieron una unión similar en comparación con los controles positivos (Herceptina para BT474 y anti-c-ErbB2/c-Neu (Ab-4) para NT2.5).

La Figura 29 muestra la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos determinada mediante la incubación de células BT474 con anticuerpos ciclados y no ciclados MVF-HER-2(266-296) purificados y ⁵¹Cr, y la posterior exposición de las células unidas a anticuerpos a PBMC humanas, que realizan la lisis inmunológica en las células BT474.

La Figura 30 muestra los ratones FVB/n de tipo silvestre de la Fig. 3B expuestos por vía subcutánea a 3×10^6 células NT2.5 y el crecimiento tumoral monitorizado durante 24 días. Los ratones tratados con MVF-HER-2 (266-296) ciclados y no ciclados experimentaron el retraso del desarrollo tumoral (A) y el crecimiento (B) en comparación con los ratones inmunizados con MVF solo.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

La presente invención se describirá haciendo, en ocasiones, referencia a las realizaciones específicas de la invención. No obstante, la presente invención se puede realizar en diferentes formas, como se define en las reivindicaciones. Las realizaciones se proporcionan para que la presente divulgación sea minuciosa y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la materia.

A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que la presente invención pertenece. La terminología usada en la descripción de la invención del presente documento sirve para describir solamente realizaciones concretas y no está destinada a limitar la invención. Como se usa en la descripción de la invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" pretenden incluir las formas en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Todas las publicaciones, las solicitudes de patente, las patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

En el presente documento, se describen polipéptidos aislados de la proteína HER-2 que, de aquí en adelante, se denominan epítomos B de HER-2. En algunas realizaciones, los epítomos B de HER-2 son inmunogénicos. También se describen composiciones que incluyen uno o más péptidos quiméricos, y los péptidos quiméricos incluyen los epítomos B de HER-2. Además, se proporcionan composiciones que tienen uno o más péptidos multivalentes. Estos péptidos multivalentes incluyen dos o más de los epítomos B de HER-2. Además, se proporcionan métodos de estimulación de una respuesta inmune y métodos de tratamiento del cáncer en un sujeto. También se proporcionan vacunas para su uso terapéutico y profiláctico. Los epítomos B de HER-2, bien solos o en el contexto de los péptidos quiméricos, como se describen en el presente documento, pueden ser capaces de generar una respuesta humoral que produzca anticuerpos que sean inmunorreactivos con el dominio extracelular de la proteína HER-2. De acuerdo con algunas realizaciones, los epítomos B de HER-2 o los péptidos quiméricos confieren un efecto protector.

La proteína HER-2, y su homólogo de rata neu, son proteínas transmembrana con una masa molecular relativa de 185 kd que es de aproximadamente 1.255 aminoácidos (aa) de longitud. La proteína HER-2/neu tiene un dominio de unión extracelular (ECD) de aproximadamente 645 aa, con un 40 % de homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un dominio de anclaje transmembrana altamente hidrófobo (TMD) y un dominio citoplasmático carboxiterminal (CD) de aproximadamente 580 aa con una homología del 80 % con el EGFR. La secuencia de aminoácidos de la proteína HER-2 y una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos se muestran en el N° de acceso del GenBank M11730. La Fig. 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína HER-2 (SEC ID N° 1).

Los epítomos B de HER-2 son péptidos que tienen una de las secuencias, denominadas de aquí en adelante las "secuencias de referencia", y las secuencias son:

CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPFVCVA, SEC ID N° 2;
 VACAHYKDPFVCVA, SEC ID N° 3;
 VARCPGKVPDLSYMPIWKFPDEEGACQPL, SEC ID N° 4;
 IWKFPDEEGACQPL, SEC ID N° 5;
 LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV, SEC ID N° 6;
 ACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNLNQEVTAEEDGTQRCEK, SEC ID N° 7;
 CPLHNQEVTAEEDGTQRCEK, SEC ID N° 8; o
 CPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRAS, SEC ID N° 9.

Los epítomos B de HER-2 pueden ser ciclados o lineales. Cuando son ciclados, los epítomos se pueden haber ciclados de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se pueden formar enlaces disulfuro entre pares de cisteína

(Cys) seleccionados para proporcionar una configuración deseada. Se cree que la formación de epítomos ciclados puede proporcionar configuraciones que mejoran la respuesta humoral, mejorando así el efecto protector.

Los epítomos B de HER-2 identificados por las SEC ID N° 2-5 contienen al menos una región de las tres regiones que están en contacto con trastuzumab en la región de unión a trastuzumab del dominio extracelular de HER-2 (SEC ID N° 1). En 2003, se publicó la estructura cristalina de la región extracelular de HER-2 sola y formando un complejo con el fragmento Fab de trastuzumab. Se demostró que trastuzumab interactúa con tres bucles en el subdominio IV que comprende restos de SEC ID N° 1 en el bucle 1: 579-583 (2 enlaces disulfuro entre C563-C576 y entre C567-C584), bucle 2: 592-595 (enlace disulfuro entre las cisteínas C587-C596) y el bucle 3: 615-625 (disulfuro entre las cisteínas C600-C623). Los bucles 1 y 3 se estabilizan todavía más por la interacción con trastuzumab principalmente a través de interacciones electrostáticas, mientras que el bucle 2 participa en interacciones hidrófobas.

El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 2 representa las posiciones 563-598 de la proteína HER-2 (SEC ID N° 1). El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 2 se puede ciclar mediante la formación de enlaces disulfuro entre Cys-563 y Cys-576, Cys-567 y Cys-584 y/o Cys-587 y Cys-596. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 3 representa las posiciones 585-598. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 3 se puede ciclar mediante la formación de un enlace disulfuro entre Cys-587 y Cys-596. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 4 representa las posiciones 597-626, y el aminoácido leucina (Leu) subrayado fue mutado de Cys a Leu para no interferir con la formación de enlaces disulfuro. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 4 se puede ciclar mediante la formación de un enlace disulfuro entre Cys-600 y Cys-623. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 5 representa las posiciones 613-626, y el aminoácido Leu en negrita fue mutado de Cys a Leu para no interferir con la formación de enlaces disulfuro como se describirá en mayor detalle en el presente documento. Se entenderá que los aminoácidos Leu indicados en las SEC ID N° 4 y 5 pueden ser, como alternativa, Cys.

Los epítomos B de HER-2 identificados por las SEC ID N° 6-8 representan secuencias diseñadas para generar anticuerpo similar al sitio de unión a trastuzumab de HER-2 (SEC ID N° 1). El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 6 representa las posiciones 315-333 de la proteína HER-2 (SEC ID N° 1). El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 6 se puede ciclar mediante la formación de un enlace disulfuro entre Cys-315 y Cys-331. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 7 representa las posiciones 298-333. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 7 se puede ciclar mediante la formación de enlaces disulfuro entre Cys-299 y Cys-311 y/o Cys-315 y Cys-331. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 8 representa las posiciones 266-296. El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 8 se puede ciclar mediante la formación de un enlace disulfuro entre Cys-268 y Cys-295.

El epítomo B de HER-2 identificado por SEC ID N° 9 representa las posiciones 626-649. Esta secuencia puede tener enlaces disulfuro entre Cys-626 y Cys-634 y/o Cys-630 y Cys 634. Se entenderá que cada uno de los epítomos que tiene más de una Cys puede ser ciclado o lineal.

Como se describe en el presente documento, los epítomos B de HER-2 también engloban péptidos que son equivalentes funcionales de los péptidos identificados por las SEC ID N° 2-9. Dichos equivalentes funcionales tienen una secuencia modificada en la que uno o más de los aminoácidos de la secuencia del epítomo B de HER-2 correspondiente están sustituido o en la que uno o más aminoácidos se eliminan de o se añaden a la secuencia de referencia correspondiente. Por ejemplo, se pueden añadir 1 a 3 aminoácidos al extremo amino, al extremo carboxi o a ambos. En algunos ejemplos, los epítomos B de HER-2 están glicosilados.

En otros ejemplos, los epítomos B de HER-2 pueden ser los isómeros retroinversos de los epítomos B de HER-2. La modificación retroinversa comprende la inversión de todos los enlaces amida en la cadena principal del péptido. Esta inversión se puede realizar invirtiendo la dirección de la secuencia e invirtiendo la quiralidad de cada resto de aminoácido mediante el uso de D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos. Esta forma de isómero retroinverso puede conservar la restricción de la planaridad y la configuración de al menos algunos de los enlaces peptídicos. Por ejemplo, la forma no retroinversa de la SEC ID N° 5 se puede indicar como NH₂-L[IWKFPDEEGACQPL]-COOH. La forma retroinversa de SEC ID N° 5 se puede indicar como NH₂-D[LPQCA-GEEDPFKWI]-COOH.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos no conservadoras y/o conservadoras. Las sustituciones son sustituciones de aminoácidos conservadoras cuando el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares a las del aminoácido correspondiente de la secuencia de referencia. A modo de ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen la sustitución de un aminoácido alifático o hidrófobo, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina, con otro; la sustitución de un aminoácido que contiene hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina, con otro; la sustitución de un resto ácido, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico, con otro; la sustitución de un resto que contiene amida, por ejemplo, asparagina y glutamina, con otro; la sustitución de un resto aromático, por ejemplo, fenilalanina y tirosina, con otro; la sustitución de un resto básico, por ejemplo, lisina, arginina e histidina, con otro; y la sustitución de un aminoácido pequeño, por ejemplo, alanina, serina, treonina, metionina y glicina, con otro.

En algunos ejemplos, las eliminaciones y adiciones se encuentran en el extremo amino, en el extremo carboxi o en ambos, de una de las secuencias mostradas anteriormente. Por ejemplo, el equivalente de epítipo B de HER-2 tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 % idéntica, al menos un 80 % idéntica, al menos un 90 % idéntica o al menos un 95 % idéntica a las secuencias del epítipo B de HER-2 correspondientes. Las secuencias que son al menos 90 % idénticas tienen no más de 1 modificación, es decir, cualquier combinación de eliminaciones, adiciones o sustituciones, en 10 aminoácidos de la secuencia de referencia. El porcentaje de identidad se determina comparando la secuencia de aminoácidos de la variante con la secuencia de referencia usando el proyecto MEGALIGN del programa DNA STAR.

Por equivalentes funcionales que son más largos que una secuencia del epítipo B de HER-2 correspondiente, el equivalente funcional puede tener una secuencia que sea al menos 90 % idéntica a la secuencia del epítipo B HER-2 y las secuencias que flanquean las secuencias del epítipo B de HER-2 en la proteína HER-2 de tipo silvestre.

Los equivalentes funcionales de los epítipos B de HER-2 se pueden identificar mediante la modificación de la secuencia del epítipo y el posterior ensayo del polipéptido resultante para determinar la capacidad de estimular una respuesta inmune, por ejemplo, la producción de anticuerpos. Por ejemplo, dichos ensayos generalmente se pueden realizar mediante la preparación de un péptido quimérico que comprenda el polipéptido modificado y un epítipo Th, la inyección del péptido quimérico en un animal de ensayo y el ensayo de los anticuerpos. Dichos anticuerpos se pueden encontrar en varios fluidos corporales incluyendo sueros y ascitis. En resumen, se aísla una muestra de fluido corporal de un animal de sangre caliente, tal como un ser humano, para el que se desea determinar si están presentes los anticuerpos específicos del polipéptido HER-2/neu. Se incuba el fluido corporal con el polipéptido HER-2/neu en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos entre el polipéptido y los anticuerpos específicos de la proteína y luego se ensayan, preferentemente usando una técnica de ELISA. En dicha técnica, se mide el cambio colorimétrico a 490 nm. Los epítipos que inducen la producción de anticuerpos que presentan un título igual a 10.000 o superior para la proteína HER-2/neu, pueden ser útiles. Como se usa en el presente documento, un título de 10.000 se refiere a un valor de absorbancia de 0,2 por encima del fondo.

De acuerdo con otras realizaciones, se proporcionan péptidos quiméricos y composiciones que comprenden uno o más péptidos quiméricos. De acuerdo con diversas realizaciones, los péptidos quiméricos comprenden un epítipo B de HER-2, un epítipo auxiliar T (Th) y un enlazador que une el epítipo B de HER-2 con el epítipo Th. Se entenderá que se puede usar cualquier epítipo Th adecuado. Por ejemplo, se puede usar un epítipo Th promiscuo. Como se usa en el presente documento, un epítipo Th "promiscuo" es aquel que promueve la liberación de citocinas, ayudando a saltarse la restricción del MHC. Se entenderá además que se puede usar cualquier enlazador adecuado. Por ejemplo, dependiendo del epítipo Th usado, el epítipo B de HER-2 puede estar enlazado bien al extremo amino o al extremo carboxi del epítipo Th. La ubicación y la selección del epítipo Th depende de las características estructurales del epítipo B de HER-2, ya sea α helicoidal o giro β o hebra. En Kaumaya *et al.*, "DE NOVO" ENGINEERING OF PEPTIDE IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC DETERMINANTS AS POTENTIAL VACCINES, in Peptides, Design, Synthesis and Biological Activity (1994), pág. 133-164, se describen métodos de selección de los epítipos Th adecuados. En la revisión titulada "Synthetic Peptides: Dream or Reality" de Kaumaya *et al.*, y publicada en PEPTIDES IN IMMUNOLOGY, Wiley and Sons, Ltd. (1996), se presenta un resumen de las respuestas inmunes generadas por varios epítipos Th que contienen quimeras de epítipos de linfocitos B.

En algunos ejemplos, el epítipo Th puede ser de aproximadamente 14 a aproximadamente 22, de aproximadamente 15 a 21 o de 16 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones, los ejemplos de epítipos Th adecuados incluyen, pero sin limitación:

KLLSLIKGVIVHRLEGVE, SEC ID N° 10;
 NSVDDALINSTIYSYFPSV, SEC ID N° 11;
 PGINGKAIHLVNNQSSE, SEC ID N° 12;
 QYIKANSKFIGITEL, SEC ID N° 13;
 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE, SEC ID N° 14;
 LSEIKGVIVHRLEGV, SEC ID N° 15;
 FLLTRILTIPQSLN, SEC ID N° 16; o
 TCGVGVRVRSRVAANKKPE, SEC ID N° 17.

En otros ejemplos, el enlazador puede ser un péptido de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 aminoácidos o de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el enlazador puede ser un péptido que tenga la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Ser-Leu, SEC ID N° 18. Los péptidos quiméricos pueden ser lineales o ciclados. Además, los epítipos B de HER-2, los epítipos Th y/o el enlazador pueden estar en forma retroinversa. Así pues, el epítipo B de HER-2 podría estar en forma retroinversa. Como alternativa, el epítipo B de HER-2 y el epítipo Th podrían estar en forma retroinversa. En otro ejemplo, el epítipo B de HER-2, el epítipo Th y el enlazador podrían estar en forma retroinversa.

Los ejemplos de péptidos quiméricos adecuados incluyen, pero sin limitación:

- 5 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-CHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVA, SEC ID N° 19;
 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-VACAHYKDPPFCVA, SEC ID N° 20;
 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-VARCPGKVPKDLSPYMPIWKFPEDEEGACQPL, SEC ID N° 21;
 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-IWKFPDEEGACQPL, SEC ID N° 22;
 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV, SEC ID N° 23;
 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-ACPYNLSTDVGSC TLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEK, SEC ID N° 24;
 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-CPLHNQEVTAEDGTQRCEK, SEC ID N° 25; o
 10 KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL-CPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRAS, SEC ID N° 26.

Los péptidos de SEC ID N° 19-26 tienen un epítipo Th, un enlazador GPSL y un epítipo B de HER-2.

15 Los péptidos quiméricos y las composiciones que comprenden los péptidos pueden ser inmunógenos útiles para inducir la producción de anticuerpos que interactúen con y se unan al dominio extracelular de la proteína HER-2. Los péptidos quiméricos también pueden ser útiles como herramientas de laboratorio para la detección de anticuerpos contra la proteína HER-2 en el suero de un sujeto. Los péptidos quiméricos pueden generar una respuesta de anticuerpos en un sujeto y que dichos anticuerpos puedan (a) inmunoprecipitar la proteína HER-2; (b) unirse al receptor de HER 2 intacto en células que sobreexpresan ER-2 en cultivo; y (c) reducir la proliferación de células que sobreexpresan HER-2 *in vitro*. Los péptidos quiméricos también se pueden usar para inmunizar a un sujeto y retrasar o prevenir el desarrollo de tumores. Los péptidos quiméricos se pueden usar en vacunas para proporcionar un efecto protector.

25 De acuerdo con realizaciones adicionales de la presente invención, se proporcionan composiciones que comprenden una mezcla de dos o más de los péptidos quiméricos. En algunos ejemplos, el epítipo B de HER-2 de cada uno de los dos o más péptidos quiméricos es diferente. En otros ejemplos, uno de los epítipos B de HER-2 se selecciona entre las SEC ID N° 2-5 y el otro de los epítipos B de HER-2 se selecciona entre las SEC ID N° 6-8.

30 Los epítipos B de HER-2 y los péptidos quiméricos se pueden sintetizar usando sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado. Por ejemplo, se pueden usar los métodos químicos descritos en Kaumaya *et al.*, "DE NOVO" ENGINEERING OF PEPTIDE IMMUNOGENIC AND ANTIGENIC DETERMINANTS AS POTENTIAL VACCINES, en Peptides, Design, Synthesis and Biological Activity (1994), pág. 133-164.

35 Por ejemplo, los epítipos B de HER-2 se pueden sintetizar colinealmente con el epítipo Th para formar un péptido quimérico. La síntesis de péptidos se puede realizar usando la química de Fmoc/t-But. Los epítipos B de HER-2 y los péptidos quiméricos se pueden ciclar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, se pueden crear enlaces disulfuro usando restos de cisteína protegidos de forma diferencial, la oxidación de yodo, la adición de agua para impulsar la eliminación de Acm y la formación concomitante de un enlace disulfuro y/o el método de cloruro de sililo-sulfóxido.

40 Los epítipos B de HER-2 y los péptidos quiméricos también se pueden producir usando sistemas de traducción carentes de células y moléculas de ARN derivadas de construcciones de ADN que codifican el epítipo o el péptido. Como alternativa, los epítipos o péptidos quiméricos se crean mediante la transfección de células huésped con vectores de expresión que comprenden una secuencia de ADN que codifica el respectivo epítipo o péptido quimérico y luego la inducción de la expresión del polipéptido en las células huésped. Para la producción recombinante, se introducen construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias que codifican el epítipo, el péptido quimérico o una variante de los mismos en células huésped mediante métodos convencionales tales como transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por 50 legrado, introducción balística o infección.

55 El epítipo B de HER-2 y el péptido quimérico se pueden expresar en células huésped adecuadas tales como, por ejemplo, células de mamífero, levaduras, bacterias, células de insectos u otras células bajo el control de promotores apropiados usando técnicas convencionales. Los huéspedes adecuados incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, *P. pastoris*, células COS y células 293 HEK. Tras la transformación adecuada de la cepa huésped y el crecimiento de la cepa huésped hasta una densidad celular apropiada, se recogen las células por centrifugación, se rompen mediante medios físicos o químicos y se conserva el extracto bruto resultante para la posterior purificación del epítipo o péptido quimérico.

60 Para aislar el polipéptido recombinante, se pueden usar procedimientos convencionales para aislar proteínas recombinantes a partir de células huésped transformadas tales como el aislamiento por extracción inicial a partir de sedimentos de células o del medio de cultivo de células, seguido de la precipitación salina, y una o más etapas de cromatografía, incluyendo la cromatografía de intercambio iónico acuoso, etapas de cromatografía de exclusión por tamaño, y la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de afinidad.

65

Para producir epítomos glicosilados y péptidos quiméricos, se pueden usar técnicas recombinantes. Por ejemplo, se pueden emplear células de mamífero tales como células Cos-7 y Hep-G2 en las técnicas recombinantes. Como alternativa, los epítomos glicosilados y los péptidos quiméricos se pueden producir usando la síntesis de Fmoc/t-But convencional. Por ejemplo, se pueden añadir una o más unidades de azúcar a los péptidos usando una metodología quimioenzimática empleando *endo*- β -N-acetilglucosaminidasas como la enzima clave para la transferencia de oligosacáridos.

También se pueden aislar variantes naturales de los epítomos B de HER-2 mediante, por ejemplo, la exploración de un ADNc o una biblioteca genómica apropiada con una secuencia de ADN que codifique el polipéptido.

De acuerdo con realizaciones adicionales, se proporcionan péptidos multivalentes que comprenden una pluralidad, es decir, al menos dos de los epítomos B de HER-2 o equivalentes funcionales de los mismos y un epítomo Th. Los epítomos B de HER-2 y el epítomo Th están conectados a un molde. Por ejemplo, los epítomos B de HER-2 y el epítomo Th pueden estar conectados a un molde de lámina β del núcleo. En otro ejemplo, el molde puede ser dos hebras en las que se alternan restos de leucina y lisina, que están conectadas por un enlazador. El enlazador es un aminoácido o un péptido de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 aminoácidos o de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, el enlazador puede ser la secuencia de aminoácidos Gly-Pro-Ser-Leu, SEC ID N^o 18.

Los péptidos multivalentes se pueden sintetizar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, los péptidos multivalentes se pueden preparar empleando una estrategia combinatoria de Fmoc/t-Butilo, Fmoc/bencilo y Boc-bencilo, así como un cuarto nivel de estrategia de grupos protectores diferenciales (Npys). Los detalles de dicha metodología se presentan en Larimore *et al.* (1995) *Journal of Virology* 69: 6077-6089.

De acuerdo con otras realizaciones más de la presente invención, se proporcionan polinucleótidos aislados que codifican los epítomos B de HER-2 y los péptidos quiméricos descritos en el presente documento. Los presentes polinucleótidos también comprenden polinucleótidos que tienen secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos de los epítomos B de HER-2 o los péptidos quiméricos en condiciones rigurosas y/o en condiciones muy rigurosas. Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_f) del complejo de unión o de la sonda de ácido nucleico, como se describe en Berger y Kimmel (1987) "Guide to Molecular Cloning Techniques", *Methods in Enzymology*, vol 152, Academic Press. La expresión "condiciones rigurosas", como se usa en el presente documento, es la "rigurosidad" que se produce dentro de un intervalo de aproximadamente la T_f-5 (5 grados por debajo de la temperatura de fusión de la sonda) a aproximadamente 20 °C por debajo de la T_f. Como se usa en el presente documento, las condiciones "muy rigurosas" emplean al menos 0,2 x tampón SSC y al menos 65 °C. Como se reconoce en la técnica, las condiciones de rigurosidad se pueden alcanzar variando una serie de factores tales como la longitud y la naturaleza, es decir, el ADN o ARN, de la sonda; la longitud y la naturaleza de la secuencia diana, la concentración de las sales y de otros componentes tales como la formamida, el sulfato de dextrano y el polietilenglicol, de la solución de hibridación. Todos estos factores pueden variar para generar condiciones de rigurosidad que sean equivalentes a las condiciones mencionadas anteriormente.

Los polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un epítomo B de HER-2 o un péptido quimérico se pueden sintetizar en su totalidad o en parte usando métodos químicos o métodos recombinantes que sean adecuados. Los polinucleótidos que codifican un epítomo B de HER-2 se pueden obtener mediante la exploración de una biblioteca genómica o biblioteca de ADNc con anticuerpos inmunoespecíficos para la proteína HER-2 para identificar los clones que contengan dichos polinucleótidos.

Los polinucleótidos son útiles para producir un epítomo B de HER-2 o un péptido quimérico. Por ejemplo, una molécula de ARN que codifique un péptido quimérico multivalente se puede usar en un sistema de traducción carente de células para preparar dichos polipéptidos. Como alternativa, se puede introducir una molécula de ADN que codifique un epítomo B de HER-2 o un péptido quimérico en un vector de expresión y usarla para transformar células. Los vectores de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivadas de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos; plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral tal como *vaccinia*, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia, baculovirus y retrovirus. La secuencia de ADN se puede introducir en el vector de expresión mediante cualquier procedimiento adecuado.

De acuerdo con realizaciones adicionales, se proporcionan construcciones recombinantes que comprenden uno o más de los polinucleótidos que codifican uno o más epítomos B de HER-2 o péptidos quiméricos. Las construcciones adecuadas incluyen, por ejemplo, vectores tales como un vector de plásmido, fagémido o viral, en el que se ha insertado una secuencia que codifica el epítomo B de HER-2 o el péptido quimérico. En el vector de expresión, la secuencia de ADN que codifica el epítomo o el péptido quimérico está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión, es decir, un promotor que dirige la síntesis del ARNm. Los ejemplos representativos de dichos promotores incluyen el promotor LTR o SV40, *lac* o *trp* de *E. coli*, el promotor PL del fago λ y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariontas o eucariotas o en virus. El vector de expresión también puede contener un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. Por ejemplo, los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir un origen de

replicación y un marcador seleccionable tal como, por ejemplo, el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* para permitir la selección de las células transformadas, es decir, las células que están expresando las secuencias de ADN heterólogas. La secuencia de polinucleótido que codifica el epítipo B de HER-2 o el péptido quimérico se puede incorporar al vector en fase con las secuencias de inicio y de terminación de la traducción. Por ejemplo, el polinucleótido puede codificar además una secuencia señal que esté unida operativamente al extremo amino terminal del epítipo B de HER-2 o del péptido quimérico.

Los polinucleótidos que codifican el epítipo B de HER-2 o los péptidos quiméricos que comprenden dichos epítopos se pueden usar para expresar el péptido recombinante usando técnicas adecuadas. Dichas técnicas incluyen, pero sin limitación, las descritas en Sambrook, J. *et al.*, (1989) "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. y Ausubel, F. M. *et al.* (1989) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wile & Sons, Nueva York, NY. Los polinucleótidos que codifican el epítipo B de HER-2 o los péptidos quiméricos que comprenden dichos epítopos también se pueden usar para inmunizar sujetos.

De acuerdo con otras realizaciones más, se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer. Los métodos comprenden administrar una composición farmacéutica a un sujeto. En otras realizaciones, se proporcionan vacunas que comprenden al menos un péptido quimérico, péptido multivalente, o ambos, del polinucleótido que codifica el mismo. En el presente documento, se describe la composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un péptido quimérico, péptido multivalente, o ambos, o el polinucleótido que codifica el mismo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En general, estos vehículos no son tóxicos para los sujetos a las dosis y las concentraciones empleadas.

Además de los epítopos, los péptidos multivalentes y los péptidos quiméricos o el polinucleótido que codifica los mismos, en la composición farmacéutica, se incluyen otros componentes tales como un vehículo para la administración de antígenos y sustancias inmunoestimulantes destinadas para potenciar la inmunogenicidad de la proteína. Los ejemplos de vehículos para la administración de antígenos incluyen sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos de aceite biodegradables, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Para las vacunas que comprenden el péptido quimérico, un vehículo adecuado para la administración de antígenos es una microesfera biodegradable, que puede estar compuesta de poli (D,L-lactida-coglicolida) (PLGA).

Aunque se puede emplear cualquier vehículo adecuado en las composiciones farmacéuticas, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración y de si se desea una liberación sustancial. Para la administración parenteral, tal como inyección subcutánea, el vehículo puede ser agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. También se pueden emplear microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica) como vehículos para las composiciones farmacéuticas. De acuerdo con algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un adyuvante.

Los péptidos HER-2 quiméricos y multivalentes y los polinucleótidos que codifican los mismos pueden ser útiles para mejorar o generar, en un sujeto o una línea celular, una respuesta humoral y, preferentemente, una respuesta inmune celular (por ejemplo, la generación de linfocitos T citolíticos específicos del antígeno). En algunos ejemplos, el sujeto es un ser humano. Un sujeto puede padecer cáncer u otro cáncer en el que participe HER-2, tal como cáncer de mama, o puede ser normal (es decir, sin enfermedad ni infección detectables). Las composiciones farmacéuticas y las vacunas pueden ser útiles para el tratamiento de las mujeres que tienen antecedentes familiares de cáncer de mama o a quienes se les han extirpado tumores de mama. De acuerdo con algunas realizaciones, "tratar" significa inhibir o ralentizar o retrasar el crecimiento del tumor. Dichos cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, pulmón, ovario, vejiga y próstata. En algunos ejemplos, se usan múltiples inyecciones intramusculares, en intervalos de tres semanas, para administrar la composición farmacéutica.

Ejemplos

A continuación, se describen métodos ilustrativos, aunque, en la práctica o el ensayo de los presentes péptidos, composiciones y métodos, se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

Síntesis de péptidos y purificación por HPLC. Los péptidos se sintetizaron como se ha descrito previamente (Kaumaya, 1994). En resumen, los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos Milligen/Biosearch 9600, usando una resina de 4-metilbenzidrilamina como soporte sólido (sustitución de 0,54 mm/g). Se empleó el método sintético de Fmoc/t-butilo usando ácido 4-(hidroximetil)fenoxiacético como enlazador. Después de la etapa de desprotección final, se escindieron los grupos protectores y la resina peptídica unidos con TFA al 90 %, anisol al 5 %, tioanisol al 3 % y etanoditiol al 2 %. Se purificó el péptido en bruto mediante HPLC semipreparativa usando una columna C4 Vydac (10 mm x 25 cm) a 32,5 °C. Los tampones eran TFA al 0,1 % en H₂O y TFA al 0,1 % en acetonitrilo. Los péptidos incluyen los epítopos de células T "promiscuos" MVF 288-302 (Kaumaya, 1994): DW1MVF (HER-2 376-395), MVFDW4 (628-647), DW5MVF (115-136), DW6MVF (410-429).

Filtración en gel. Se cargaron 20 mg/ml de solución de péptido acidificada (1 mg/ml en DTT) en una columna G-25 Sephadex y se eluyeron fracciones de 5 ml con HOAc 0,1 M. Se midieron las muestras de péptido espectrofotométricamente a 235 nm y se representaron los valores de absorbancia frente al tiempo. Se combinaron las muestras con valores de absorbancia superiores a 0,1 y que se eluyeron antes del DTT, y se liofilizaron. La reacción se controló para comprobar el agotamiento del reactivo de Ellman a 410 nm.

Electroforesis capilar de zona. La CZE se realizó en un sistema Beckman P/ACE 2100 en interfaz con un ordenador IBM. Se separó la muestra por tensión (15 kV) en borato de sodio 100 mM usando un capilar de 50 cm durante 20 minutos. El eluyente se controló a 214 nm.

Dicroísmo circular y espectrometría de masas. Las mediciones se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-500 en interfaz con un ordenador IBM. El instrumento se calibró en solución de amonio-d-10-canforsulfonato al 0,06 % (p/v). Los espectros de CD de los péptidos (62,5-250 uM por dilución de las reservas de péptidos en agua) se midieron a temperatura ambiente en una cubeta de cuarzo cilíndrico de longitud de trayectoria de 0,1 cm (Hellma). La elipticidad media de los residuos (MDEG) se calculó usando la relación $[\theta] = 100 \theta/cnl$, donde θ es la elipticidad, c es la concentración de péptido (mM), n es el número de aminoácidos del péptido y l es la longitud de la trayectoria (cm). Se llevaron a cabo mediciones de espectrometría de masas de bombardeo de átomos rápidos (FAB) en un instrumento inneganMat-900.

Acetato mercúrico. Se disolvió el péptido en una cantidad mínima de agua y se añadieron 100 mg/mm de solución de S-tBu (exceso de 2-10 veces). Se dispuso el péptido al vacío y se precipitó mediante 2-mercaptoetanol en un baño de agua a 55 °C con agitación. Tras filtrar a través de Celite humedecido, se evaporó el filtrado por rotación, se acidificó con TFA al 0,1 % en agua y se liofilizó.

Procedimientos biológicos

Inmunizaciones y animales. Se adquirieron conejos blancos de Nueva Zelanda hembra del criadero Mohican Valley Rabbitry (Loudenville, OH). Se inmunizaron los conejos por vía subcutánea en múltiples sitios con un total de 1 mg de péptido emulsionado en CFA. Se administraron inyecciones de refuerzo posteriores (1 mg y 500 µg en PBS) tres y seis semanas después de la inmunización primaria. Se recogieron los sueros y se inactivaron por calentamiento a 56 °C durante 30 min. Se almacenaron alícuotas de suero a una temperatura de -5 a -15 °C. Los anticuerpos se purificaron mediante precipitación con sulfato de amonio: se preparó una solución madre de solución saturada de sulfato de amonio (SAS), se introdujo en un autoclave y se enfrió hasta 4 °C. Se dejó precipitar el anticuerpo mediante la adición lenta de SAS al 35 % v/v en agitación en la cámara fría. Se centrifugaron las muestras a 14.000 xg durante 20 min y el sobrenadante se almacenó a -20 °C. Se disolvió el sedimento con PBS 0,1 M en medio volumen original. A continuación, se dispusieron fracciones en casetes de Slide-A-Lyzer (Pierce) y se sometieron a diálisis frente a cambios frecuentes de > 200 volúmenes a pH 8, NaCl 0,15 M. Se llevó la solución salina a pH 8 con unas cuantas gotas de NaOH 0,1 M. La concentración de IgG se determinó mediante inmunodifusión radial (RID) (The Binding Site, RU). Los anticuerpos monoclonales se adquirieron en Oncogene Science.

ELISA directo. Se recubrieron placas de ensayo de plástico de cloruro de polivinilo con fondo en U con 100 µl de antígeno a 2 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica durante 1 hora con 200 µl de PBS-BSA al 1 % y se lavaron las placas con PBT (solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 % y suero de caballo al 1 %). Se añadió antisuero de conejo 1/500 o antisuero de ratón 1/50 en PBT a las placas recubiertas con antígeno, se diluyeron en serie 1:2 en PBT, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar las placas, se añadieron 50 µl de IgG anti-conejo de cabra o antimurina de cabra 1/500 conjugada con peroxidasa de rábano picante (Pierce Chemical Co.) a cada pocillo. Se retiró el conjugado de anticuerpo en exceso, y se detectó el anticuerpo unido usando 50 µl de H₂O₂ al 0,15 % en ácido cítrico 24 mM, tampón de fosfato sódico 5 mM, pH 5,2, con 0,5 mg/ml de ácido 2,2'-aminobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) como cromóforo. Se permitió que se desarrollara el color durante 10 min y se detuvo la reacción con 25 µl de dodecilsulfato de sodio al 1 %. Se determinó la absorbancia a 410 nm usando un lector de ELISA Dynatech MR700. Los resultados se expresan como la absorbancia media de los pocillos por duplicado tras restar el fondo.

Cultivo celular. Se mantuvieron cultivos madre a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Todos los medios de cultivo celular, FCS y los suplementos se adquirieron en GEBCO (Grand Island, NY). Las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano SKBR-3 y MCF-7 se obtuvieron en la colección americana de cultivos tipo y se subcultivaron en 5 A de McCoy o DMEM suplementado con FCS al 10 % y L-glutamina. Se mantuvo Cav-1 en RPMI 1640 con FCS al 10 % y L-glutamina. Cav-1 se derivó de una muestra de tumor de colon recién extraída que había sido criopreservada y posteriormente cultivada. Esta no expresa niveles detectables de HER-2/*neu*. SKBR3 es una línea celular de tumor de mama que sobreexpresa la proteína HER-2, mientras que MCF-7 expresa la concentración normal de proteína.

Inmunoprecipitación y transferencia Western. En el día cero, se sembraron $1,0 \times 10^7$ células SKBR3 en matraces de cultivo celular de 75 cm³ y se permitió que se adhirieran durante una noche. Se añadieron anticuerpos contra el

péptido (100 µg/ml) durante 4 horas. Se detuvo la reacción mediante la aspiración de los medios y añadiendo inmediatamente solución salina helada tamponada con fosfato 0,1 M (PBS). Se trataron las células con tripsina y se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hank (HBSS) fría. Se añadió tampón de lisis frío (NaCl 150 mM; Tris 50 mM, pH 8; EDTA 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM; NP-40 al 1 %, SDS al 0,1 %) que contenía Na₃VO₄ 3 mM, 10 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de leupeptina a las células resuspendidas en 100 µl de HBSS. La lisis se consiguió mediante la rotación suave a 4 °C durante 20 min. Tras la centrifugación (14,000 xg, 20 min) para eliminar los sedimentos celulares, se incubaron los lisados con 3-5 µg de anticuerpo y 30 µl de Proteína A/Proteína G (Oncogene Science) durante la noche. Se sedimentaron las perlas por centrifugación (14,000 xg, 30 segundos), se lavaron dos veces en tampón de lisis que contenía Na₃VO₄ 1 mM y se hirvieron en tampón de muestra de SDS durante 5 min.

Se resolvieron las proteínas mediante SDS al 7,5 %-PAGE, se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon con el anticuerpo. Se monitorizó la transferencia de proteínas con los patrones de masa molecular preteñidos (BioRad). Las bandas inmunorreactivas se detectaron usando inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas con peroxidasa de rábano picante mediante quimioluminiscencia mejorada (Amersham).

Ensayo de unión indirecta. Se sembraron células SKBR3 o células MCF-7 a 5.000 células/pocillo en placas de fondo en V (Linbro, McLean VA). Se incubaron las células con varias concentraciones de anticuerpos. Tras lavarlas con solución salina equilibrada de Hank (HBSS), las células se incubaron durante una hora con anticuerpo de cabra anti-ratón o anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), y se fijaron con formalina. Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón (Oncogene Science, Cambridge, MA) como control positivo y un anticuerpo anti-CD3 como control negativo. Las células se analizaron con un citómetro de flujo Coulter ELITE (Coulter, Hialeah, FL), que tiene un láser de argón para la excitación a 488 nm, y un filtro de paso de banda de 525 nm para la fluorescencia de FITC. Se contaron 5,0 x 10³ células por muestra y se realizó el procesamiento final. Se separaron por selección los residuos, los grupos de células y las células muertas mediante evaluación de la dispersión de la luz antes de elaborar los histogramas de parámetros individuales.

Efecto de los anticuerpos sobre la proliferación celular. Se sembraron células SKBR3, MCF7 y CAVI a 5.000 células/pocillo en placas de fondo en V junto con diversas concentraciones de anticuerpo en el día cero. En el día 3, se pulsaron las células con [³H]-timidina (1 µCi/pocillo), momento en el que se colocaron en un congelador a 20 °C durante 1 h. Tras descongelar a temperatura ambiente, se recogieron las células en un recolector de células PHD (Cambridge Tech, Inc.). Se incubaron las muestras en 5 ml de cóctel de centelleo líquido Ready Safe (Beckman) y se determinó la radiactividad con un contador β. Los resultados se expresan como la CPM media ± la desviación estándar (DE).

Ensayo de CTL: estimulación in vitro. Se extirparon los ganglios linfáticos inguinales y periaórticos (LN) 7-10 días después de la inmunización. A continuación, se estimularon las células LN (4 x 10⁶-5 x 10⁶) y luego se estimularon *in vitro* mediante el cultivo con 1,5 x 10⁵ células P815 irradiadas (10 000 rad) previamente pulsadas durante 1 h con 1 µM del péptido CTL apropiado. El medio de cultivo usado es cDMEM (DMEM suplementado con FCS al 10 %). El sobrenadante contenía 30 U/ml (final) de IL-2, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM y 5 x 10⁵ de M-2-mercaptoetanol.

Siete días después de la estimulación *in vitro*, se ensayó la actividad CTL en un ensayo de liberación de cromo convencional. Se marcaron células P815 (10⁶) con cromato de sodio [⁵¹Cr] 150 µCi durante 1 h a 37 °C en presencia o ausencia del péptido apropiado (1 µM) y se lavaron tres veces. Se incubaron las dianas marcadas (2 x 10³) junto con células LN estimuladas en proporciones predeterminadas en volúmenes de 200 µl en placas de 96 pocillos de fondo en V. Tras una incubación de 4 horas a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes (100 µl) para el recuento con contador γ. El % de lisis específica se calcula como 100 x [(liberación experimental-espontánea)/(liberación total-espontánea)] (Valmori, *et al.* 1994).

Efecto de los anticuerpos in vivo. Se suspendieron células HER2 (3 x 10⁶) en PBS 250 µl, se mezclaron con 250 µl de MATRIGEL (Beckton Dickinson) en hielo y se inyectaron por vía subcutánea en ratones. Se inyectaron anticuerpos policlonales a una concentración total de 2 mg/ratón i.p. en los días 9 y 11. Se midió el volumen tumoral dos veces a la semana con calibres y se calculó mediante la fórmula (longitud x anchura x altura).

Ejemplo 1 - Un epítipo de linfocitos B de HER-2 configuracional que incluye dos enlaces disulfuro nativos muestra una mejor unión a las células tumorales

Se han definido los enlaces disulfuro de EGFR humano. Basándose en la alta homología entre EGFR y HER-2, el epítipo 628-647 a 626-649 tiene dos enlaces disulfuro entre Cys-626 y Cys-634, y Cys-630 y Cys-642. La protección diferencial de la cadena lateral, y una desprotección y oxidación especializadas generaron con éxito el producto ciclado con características de estructura secundaria deseadas según lo determinado por las mediciones de CD. Las construcciones tanto lineales como cicladas resultaron ser altamente inmunogénicas (títulos > 200.000) en ratones exogámicos. El análisis de citometría de flujo mostró que los anticuerpos contra el epítipo ciclado se unieron a la proteína HER-2 con una afinidad mayor que el epítipo no ciclado (logaritmo de la fluorescencia media de 2,29 y 1,65 respectivamente). Los anticuerpos tanto contra los epítopos ciclados como contra los no ciclados fueron

capaces de causar una reducción del crecimiento de las células que sobreexpresaban HER-2 según lo medido en un ensayo de crecimiento independiente del anclaje (inhibición del 31 y 58 %, respectivamente). Los anticuerpos contra ambas construcciones fueron capaces de inducir la liberación de IFN- γ en presencia de células PBMC efectoras humanas, induciendo los anticuerpos ciclados niveles 25 % superiores de IFN- γ en comparación con los anticuerpos lineales. Los anticuerpos ciclados generaron dos veces el nivel de lisis específica en comparación con los anticuerpos no ciclados en un ensayo de ADCC (11 y 5,6 % respectivamente). Para examinar el efecto *in vivo* de estas vacunas de péptidos, se inmunizaron ratones FVB/N endogámicos con las construcciones. Ambas construcciones fueron inmunogénicas en estos ratones, generando la construcción ciclada títulos más altos. Estos ratones se expusieron a la línea celular tumoral NT2.5 que tiene un fondo de FVB/N. Los ratones inmunizados con la construcción configuracional ciclada tuvieron una reducción del volumen tumoral en comparación con los ratones inmunizados tanto con MVF lineal como de control. Los ratones vacunados con las construcciones cicladas resultaron tener el tiempo de duplicación más prolongado (6,63 días), lo que demuestra la mayor capacidad para impedir el crecimiento tumoral en comparación con el péptido lineal o de control MVF (4,31 y 4,48 días, respectivamente). Por lo tanto, estos resultados demuestran que los péptidos configuracionales para generar anticuerpos de alta afinidad tienen una aplicación inmediata para el diseño de vacunas de Her-2 eficaces.

Ejemplo 2 - Diseño y síntesis de nuevos epítomos de células B de HER-2

Se seleccionaron cuatro nuevas construcciones para la síntesis como se muestra en la Tabla 1. Las cuatro construcciones contienen al menos una región de las tres regiones que entran en contacto con trastuzumab. Se sintetizaron epítomos B de HER-2 colinealmente con el epítomo Th promiscuo de MVF. La síntesis de péptidos se realizó usando la química de Fmoc/t-But. La formación de tres enlaces disulfuro para el epítomo 563-598 se realizó usando los restos de cisteína protegidos de forma diferencial que se muestran en la Figura 2. El primer enlace disulfuro se forma usando la oxidación de yodo. La adición de agua aumenta la eliminación de Acm y la formación concomitante de un enlace disulfuro entre C567 y C584. El enlace disulfuro final entre C563 y C576 se formó usando el método de cloruro de sililo-sulfóxido.

| Designación | Péptido | Secuencia | PM (Da) |
|-------------|---|--|---------|
| MVF 563 SS | Péptido 536-598 con 3 enlaces disulfuro | H ₂ N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- CHPECQPNQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPFFCVA-COOH | 6181 |
| MVF 585 SS | Péptido 585-598 con un enlace disulfuro | H ₂ N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- VACAHYKDPFFCVA-COOH | 3858 |
| MVF 597 SS | Péptido 597-626 con un enlace disulfuro | H ₂ N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- VARQPSGVKPDLSYMPMKFPDEEGACQPL-COOH | 5872 |
| MVF 613 | Péptido 613-626 | H ₂ N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- IWKFPDEEGACQPL-COOH | 3977 |

La **Tabla 1** muestra las vacunas de péptidos candidatas de la estructura de HER-2/Herceptina. La secuencia del epítomo auxiliar T promiscuo, que se muestra en cursiva, está ligada al epítomo de linfocitos B a través de una secuencia de giro de cuatro restos (GPSL). Los aminoácidos subrayados se mutaron de Cys a Leu para no interferir con la formación de disulfuros natural.

Ejemplo 3 - Inmunogenicidad de los péptidos HER-2

Se determinó la inmunogenicidad de las 4 construcciones enumeradas en la Tabla 1 usando tanto las construcciones lineales como las de enlaces disulfuro mediante la inmunización de grupos de ratones FVB/n (n = 4-9) de 6-8 semanas de vida. Las construcciones 563-598 tanto cicladas como no cicladas resultaron ser altamente inmunogénicas (Fig. 3A). Tres semanas después de la tercera inmunización, todos los ratones tenían títulos superiores a 120.000 y dos ratones con la construcción ciclada (MVF563SS) tenían títulos superiores a 250.000. La construcción 585-598 demostró ser la menos inmunogénica (Fig. 3B), pues tres semanas después de la tercera inmunización solo un ratón tanto del grupo de construcción ciclada (SS) como del grupo de construcción lineal (NC) resultó tener un título superior a 120.000 con un título medio de aproximadamente 58.000. Las construcciones peptídicas 597-626 y 613-626 fueron altamente inmunogénicas (Fig. 3C, D). Tres ratones que recibieron la forma ciclada de 597-626 presentaron títulos superiores a 120.000, mientras que ningún ratón que recibió la forma lineal tuvo títulos superiores a 120.000.

En segundo lugar, se ha ensayado la inmunogenicidad de los epítomos de linfocitos B en ratones transgénicos *neu-N* desarrollados por Guy *et al.* Los ratones transgénicos *neu-N* generaron altos títulos de anticuerpos (datos no mostrados) contra las construcciones peptídicas similares a los observados en los ratones FVB/n, a pesar de que estos ratones tienen bajos niveles basales de IgG específica de neu tras la vacunación con una vacuna de células enteras específica de neu.

Ejemplo 4 - Reactividad cruzada de péptidos de unión a herceptina con herceptina (trastuzumab)

Se ensayó si los péptidos configuracionales de los sitios de unión a trastuzumab podían reconocer la herceptina mediante ELISA. Como se muestra en la Fig. 4, diversos péptidos de la región de unión de 563-626 se unieron a trastuzumab. La unión máxima se produjo con el epítomo ciclado 563-598 que posee los 3 enlaces disulfuro. Este resultado se opone a la unión de los anticuerpos con HER-2 debida a la glicosilación por FACS.

Ejemplo 5 - Reactividad cruzada de los anticuerpos peptídicos con la proteína HER-2

Para determinar si los anticuerpos generados por los epítomos de herceptina-péptido muestran diferencias en su capacidad para reconocer el receptor de HER-2, se ensayó la unión de anticuerpos purificados de FVB/n con la línea humana de células de cáncer de mama BT474 que sobreexpresa HER-2. La Figura 5C, D muestra que tanto la construcción 597-626 como la construcción 613-626 se desplazan con respecto a los anticuerpos murinos normales. Sin embargo, las construcciones 563-598 y 585-598 mostraron poco cambio en comparación con los anticuerpos murinos normales (Fig. 5A, B). La construcción 563-598 contiene dos de los tres contactos que HER-2 hace con trastuzumab. El epítomo 597-626, que contiene el último punto de contacto con trastuzumab consiste en 11 aminoácidos que reconocen la proteína nativa (Fig. 5C). La versión más corta de esta secuencia 613-626 también reconoce la proteína nativa de una manera similar (Fig. 5D). Una explicación plausible para la falta de reconocimiento del epítomo 563-598 y 585-598 es que hay un posible sitio de glicosilación en los restos 571-573 (NGS), con el resto de azúcar voluminoso de gran tamaño interfiriendo estéricamente, lo que evita la unión de ese epítomo.

Ejemplo 6 - Exposición tumoral

Para entender mejor el posible beneficio clínico asociado con la introducción de restricciones de configuración en vacunas de epítomos de linfocitos B, ratones transgénicos tanto FVB/N como *neu-N* se expusieron a la línea de células tumorales NT2.5 derivada de un tumor de mama espontáneo aislado de un ratón transgénico *neu-N*. Como consecuencia de la sobreexpresión de *neu*, estos ratones desarrollan adenocarcinomas de mama espontáneos de una manera similar a la observada en los pacientes de cáncer de mama humanos, por lo que son un modelo adecuado para estudiar el cáncer de mama en seres humanos. Se expusieron grupos de ratones FVB/n a 5×10^6 células NT2.5 s.c. (parte inferior del abdomen) dos semanas después de la inmunización final. Se tomaron medidas de los tumores dos veces a la semana hasta el día 55. Se calcularon los volúmenes tumorales con la fórmula (medición larga x medición corta²)/2. Cabe señalar, que tras el día 30, los tumores de los ratones FVB/n comenzaron a reducirse, indicando un rechazo del tumor. En estudios posteriores de los tumores usando ratones FVB/n, se midieron los tumores hasta el día 30. Los ratones inmunizados con las construcciones NC y SS 563-598 resultaron tener volúmenes tumorales medios en el día 30 de 166,517 y 173,7292 mm³, respectivamente, mientras que los ratones no inmunizados resultaron tener un volumen tumoral medio de 346,6563 mm³ (datos no mostrados). Hacia el día 33, los ratones inmunizados con 613-626 y 585-598CYC mostraron una reducción del volumen tumoral en comparación tanto con los ratones no inmunizados como con los inmunizados con MVF. Aunque parece haber un cierto éxito moderado en términos de reducción de la carga tumoral de los ratones inmunizados con los epítomos de linfocitos B de unión a trastuzumab, casi todos los ratones desarrollaron tumores.

Ejemplo 7 - Diseño y evaluación de nuevos epítomos de linfocitos B configuracionales de unión a pertuzumab

Se diseñaron las 3 secuencias peptídicas que aparecen en la Tabla 2 para definir con mayor precisión la secuencia mínima para generar un anticuerpo similar al del sitio de unión a pertuzumab. Estos complejos epítomos peptídicos configuracionales se han sintetizado, purificado con éxito y ciclado con los enlaces disulfuro correctos. El epítomo 266-296 (enlace SH entre Cys268 y Cys295), el epítomo 298-333 (enlace SH entre Cys 299 y Cys311) y el epítomo 315-333 (enlace SH entre Cys 315 y Cys 331) deberían permitir la delimitación del epítomo mínimo de unión a pertuzumab.

| Designación | Péptido | Secuencia |
|-------------|---------|---|
| MVF 266 CYC | 266-296 | H2N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- LHCPALVITYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV-COOH |
| MVF 298 CYC | 298-333 | H2N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- ACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVT AEDGTQRCEK-COOH |
| MVF 315 CYC | 315-333 | H2N-KLLSLIKGVIVHRLEGVE-GPSL- CPLHNQEVT AEDGTQRCEK-COOH |

La Tabla 2 muestra péptidos quiméricos B de HER-2 diseñados por ingeniería genética.

5 En las Fig. 6-30, se muestran resultados adicionales.

Será evidente para los expertos en la materia que se pueden realizar varios cambios sin apartarse del alcance de la invención, según lo definido por las reivindicaciones.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Ohio State University Research Foundation

<120> PÉPTIDOS HER-2

15

<130> CMD/FP6520217

<140> EP 06785065.1

<141> 15-06-2006

20

<150> PCT/US2006/023672

<151> 15-06-2006

<150> 11/424.526

25

<151> 15-06-2006

<150> 60/690.574

<151> 15-06-2005

30

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

35

<211> 1255

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 1

ES 2 531 483 T3

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430
 Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445
 Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

ES 2 531 483 T3

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480
 Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495
 Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525
 Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540
 Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560
 Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575
 Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Val Ser
 645 650 655
 Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670
 Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg

ES 2 531 483 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 770 | | | | | | 775 | | | | | | 780 | | | |
| Leu | Leu | Gly | Ile | Cys | Leu | Thr | Ser | Thr | Val | Gln | Leu | Val | Thr | Gln | Leu |
| 785 | | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 |
| Met | Pro | Tyr | Gly | Cys | Leu | Leu | Asp | His | Val | Arg | Glu | Asn | Arg | Gly | Arg |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | |
| Leu | Gly | Ser | Gln | Asp | Leu | Leu | Asn | Trp | Cys | Met | Gln | Ile | Ala | Lys | Gly |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | |
| Met | Ser | Tyr | Leu | Glu | Asp | Val | Arg | Leu | Val | His | Arg | Asp | Leu | Ala | Ala |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | |
| Arg | Asn | Val | Leu | Val | Lys | Ser | Pro | Asn | His | Val | Lys | Ile | Thr | Asp | Phe |
| | 850 | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | |
| Gly | Leu | Ala | Arg | Leu | Leu | Asp | Ile | Asp | Glu | Thr | Glu | Tyr | His | Ala | Asp |
| 865 | | | | | 870 | | | | | 875 | | | | | 880 |
| Gly | Gly | Lys | Val | Pro | Ile | Lys | Trp | Met | Ala | Leu | Glu | Ser | Ile | Leu | Arg |
| | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | 895 | |
| Arg | Arg | Phe | Thr | His | Gln | Ser | Asp | Val | Trp | Ser | Tyr | Gly | Val | Thr | Val |
| | | | 900 | | | | | 905 | | | | | 910 | | |
| Trp | Glu | Leu | Met | Thr | Phe | Gly | Ala | Lys | Pro | Tyr | Asp | Gly | Ile | Pro | Ala |
| | | 915 | | | | | 920 | | | | | 925 | | | |
| Arg | Glu | Ile | Pro | Asp | Leu | Leu | Glu | Lys | Gly | Glu | Arg | Leu | Pro | Gln | Pro |
| | 930 | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | |
| Pro | Ile | Cys | Thr | Ile | Asp | Val | Tyr | Met | Ile | Met | Val | Lys | Cys | Trp | Met |
| 945 | | | | | 950 | | | | | 955 | | | | | 960 |
| Ile | Asp | Ser | Glu | Cys | Arg | Pro | Arg | Phe | Arg | Glu | Leu | Val | Ser | Glu | Phe |
| | | | | 965 | | | | | 970 | | | | | 975 | |
| Ser | Arg | Met | Ala | Arg | Asp | Pro | Gln | Arg | Phe | Val | Val | Ile | Gln | Asn | Glu |
| | | | 980 | | | | | 985 | | | | | 990 | | |
| Asp | Leu | Gly | Pro | Ala | Ser | Pro | Leu | Asp | Ser | Thr | Phe | Tyr | Arg | Ser | Leu |
| | | 995 | | | | 1000 | | | | | | 1005 | | | |
| Leu | Glu | Asp | Asp | Asp | Met | Gly | Asp | Leu | Val | Asp | Ala | Glu | Glu | Tyr | Leu |
| 1010 | | | | | | 1015 | | | | | 1020 | | | | |
| Val | Pro | Gln | Gln | Gly | Phe | Phe | Cys | Pro | Asp | Pro | Ala | Pro | Gly | Ala | Gly |
| 1025 | | | | | 1030 | | | | | 1035 | | | | | 1040 |
| Gly | Met | Val | His | His | Arg | His | Arg | Ser | Ser | Ser | Thr | Arg | Ser | Gly | Gly |
| | | | | 1045 | | | | | 1050 | | | | | 1055 | |
| Gly | Asp | Leu | Thr | Leu | Gly | Leu | Glu | Pro | Ser | Glu | Glu | Glu | Ala | Pro | Arg |
| | | | 1060 | | | | | 1065 | | | | | 1070 | | |
| Ser | Pro | Leu | Ala | Pro | Ser | Glu | Gly | Ala | Gly | Ser | Asp | Val | Phe | Asp | Gly |
| | | 1075 | | | | | 1080 | | | | | 1085 | | | |

ES 2 531 483 T3

Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu Gln Ser Leu Pro Thr His
 1090 1095 1100

Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
 1105 1110 1115 1120

Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln
 1125 1130 1135

Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro
 1140 1145 1150

Arg Glu Gly Pro Leu Pro Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu
 1155 1160 1165

Arg Ala Lys Thr Leu Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val
 1170 1175 1180

Phe Ala Phe Gly Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln
 1185 1190 1195 1200

Gly Gly Ala Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala
 1205 1210 1215

Phe Asp Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala
 1220 1225 1230

Pro Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
 1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

5 <210> 2
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro
 20 25 30

Phe Cys Val Ala
 35

10

15 <210> 3
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala
 1 5 10

ES 2 531 483 T3

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro
 1 5 10 15
 Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Leu
 20 25 30

10

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 5

Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Leu
 1 5 10

20

<210> 6
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 6

Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser
 1 5 10 15
 Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val
 20 25 30

30

<210> 7
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu
 1 5 10 15
 Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln
 20 25 30
 Arg Cys Glu Lys
 35

35

40

<210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 531 483 T3

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

Cys Glu Lys

5 <210> 9
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly
 1 5 10 15

Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser
 20

10
 15 <210> 10
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1 5 10 15

Val Glu

20
 25 <210> 11
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

Asn Ser Val Asp Asp Ala Leu Ile Asn Ser Thr Ile Tyr Ser Tyr Phe
 1 5 10 15

Pro Ser Val

30
 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 12

Pro Gly Ile Asn Gly Lys Ala Ile His Leu Val Asn Asn Gln Ser Ser
 1 5 10 15

Glu

40
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 13

ES 2 531 483 T3

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

5 <210> 14
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

10 Ala Ser His Leu Glu
 20

15 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Leu Ser Glu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly Val
 1 5 10 15

20 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 16

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asn
 1 5 10 15

30 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 17

Thr Cys Gly Val Gly Val Arg Val Arg Ser Arg Val Asn Ala Ala Asn
 1 5 10 15

Lys Lys Pro Glu
 20

40 <210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido enlazador sintético

<400> 18

ES 2 531 483 T3

Gly Pro Ser Leu
1

5 <210> 19
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético
<400> 19

```

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
  1                               5                               10                               15
Val Glu Gly Pro Ser Leu Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly
                               20                               25                               30
Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala
                               35                               40                               45
His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala
                               50                               55
    
```

15 <210> 20
<211> 36
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético
<400> 20

```

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
  1                               5                               10                               15
Val Glu Gly Pro Ser Leu Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro
                               20                               25                               30
Phe Cys Val Ala
                               35
    
```

25 <210> 21
<211> 52
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético
35 <400> 21

ES 2 531 483 T3

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Gly Pro Ser Leu Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro
 20 25 30
 Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
 35 40 45
 Cys Gln Pro Leu
 50

5 <210> 22
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético
 <400> 22

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Gly Pro Ser Leu Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
 20 25 30
 Cys Gln Pro Leu
 35

15 <210> 23
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético
 <400> 23

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Glu Gly Pro Ser Leu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn
 20 25 30
 Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Gly Ala Ser Cys Val
 50

25 <210> 24
 <211> 58
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético

ES 2 531 483 T3

<400> 24

```

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1           5           10           15
Val Glu Gly Pro Ser Leu Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
           20           25           30
Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr
           35           40           45
Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys
 50           55
    
```

5 <210> 25
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético

<400> 25

```

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1           5           10           15
Val Glu Gly Pro Ser Leu Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala
           20           25           30
Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys
           35           40
    
```

15 <210> 26
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido quimérico sintético

<400> 26

```

Lys Leu Leu Ser Leu Ile Lys Gly Val Ile Val His Arg Leu Glu Gly
 1           5           10           15
Val Glu Gly Pro Ser Leu Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val
           20           25           30
Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser
           35           40           45
    
```

30 <210> 27
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 27

ES 2 531 483 T3

His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro
 1 5 10 15

Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe
 20 25 30

Cys Val Ala
 35

5 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 28

His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met
 1 5 10 15

Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val
 20 25 30

15 <210> 29
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 29

Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro
 20 25 30

25 Phe Cys Val Ala
 35

30 <210> 30
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 30

ES 2 531 483 T3

Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val
1 5 10 15

Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg
20 25 30

Cys Glu Lys
35

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un péptido quimérico, en la que el péptido quimérico comprende un epítipo B de HER-2, un epítipo auxiliar T (Th) y un enlazador que une el epítipo B de HER-2 al epítipo Th, en la que:
- 5 la secuencia del epítipo B de HER-2 es
 LHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCV (SEC ID N° 6);
 el epítipo Th comprende una secuencia seleccionada entre: KLLSLIKGVIVHRLEGVE (SEC ID N° 10);
 NSVDDALINSTIYSYFPSV (SEC ID N° 11); PGINGKAIHLVNNQSSE (SEC ID N° 12); QYIKANSKFIGITEL (SEC
 10 ID N° 13); FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID N° 14); LSEIKGVIVHRLEGV (SEC ID N° 15);
 FLLTRILTIPQSLN (SEC ID N° 16); o TCGVGVRVRSRVNAANKKPE (SEC ID N° 17);
 y
 el enlazador es de 1 a 15 aminoácidos.
- 15 2. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que al menos uno entre el epítipo B de HER-2, el epítipo Th o el enlazador está en forma retroinversa.
3. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el enlazador comprende de 2 a 15 aminoácidos.
- 20 4. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el enlazador comprende GPSL (SEC ID N° 18).
5. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de NSVDDALINSTIYSYFPSV (SEC ID N° 11).
- 25 6. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de PGINGKAIHLVNNQSSE (SEC ID N° 12).
7. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de QYIKANSKFIGITEL (SEC ID N° 13).
- 30 8. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEC ID N° 14).
- 35 9. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de LSEIKGVIVHRLEGV (SEC ID N° 15).
10. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de FLLTRILTIPQSLN (SEC ID N° 16).
- 40 11. La composición según lo reivindicado en la reivindicación 1, en la que el epítipo Th tiene una secuencia de TCGVGVRVRSRVNAANKKPE (SEC ID N° 17).
- 45 12. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método de estimulación de una respuesta inmune.

```

1 melaalcrwg lllallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly qgcqvvggnl
61 eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvplqrlr ivrgtqlfed nyalavldng
121 dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggvligrnpq lcyqdtilk difhknnqla
181 ltlidtnrsr achpcspmck gsrcwgesse dcqsltrtvc aggcarrckgp lptdccheqc
241 aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvtyntdtfe smpnpegryt fgascvtacp
301 ynylstdvgs ctlvcpnlng evtaedgtqr cekcskpcar vcyglgmehl revravtsan
361 iqefagckki fgslafipes fdgdpasnta plqpeqlqvf etleeitgyl yisawpdsip
421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysllqglgi swlglrsre lgsglalihh nthlcfvhtv
481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wpggptqcvn csqflrgqec
541 veecrvlqgl preyvnrhc lpchpecqpg ngsvtcfgpe adqcvacahy kdppfcvarc
601 psgvkdlsy mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvdlddk gcpaeqrasp ltsivsavgv
661 illvvvlgvv fgilikrrqg kirkytmrll lqetelvepl tpsgampnqa qmrilketel
721 rkvkvlgsa fgtvykigi pdgenvkipv aikvlrents pkankeilde ayvmagvgsp
781 yvsrllgicl tstvqlvtql mpygcldhv renrgrlgsq dllnwcmgia kgmsyledvr
841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarll dideteyhad ggkvpikwma lesilrrrft
901 hqsdvwsygv tvwelmtfga kpydgipare ipdlekger lpqppictid vymimvkcwm
961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlgpaspl dstfyrslle dddmgdlvda
1021 eeylvpqqgf fcpdpapgag gmvhhrhrss strsgggdlt lglepseee prsplapseg
1081 agsdvfdgd gmgaakqls lpthdpsplq rysedptvpl psetdgyvap ltcsppqeyv
1141 nqpdvrpqqp spreglpaa rpagatlera ktlspgkngv vkdvfafgga venpeyltpq
1201 ggaapqphpp pafspafdnl yywdqpper gappstfkgp ptaenpeylg ldvpv

```

FIGURA 1

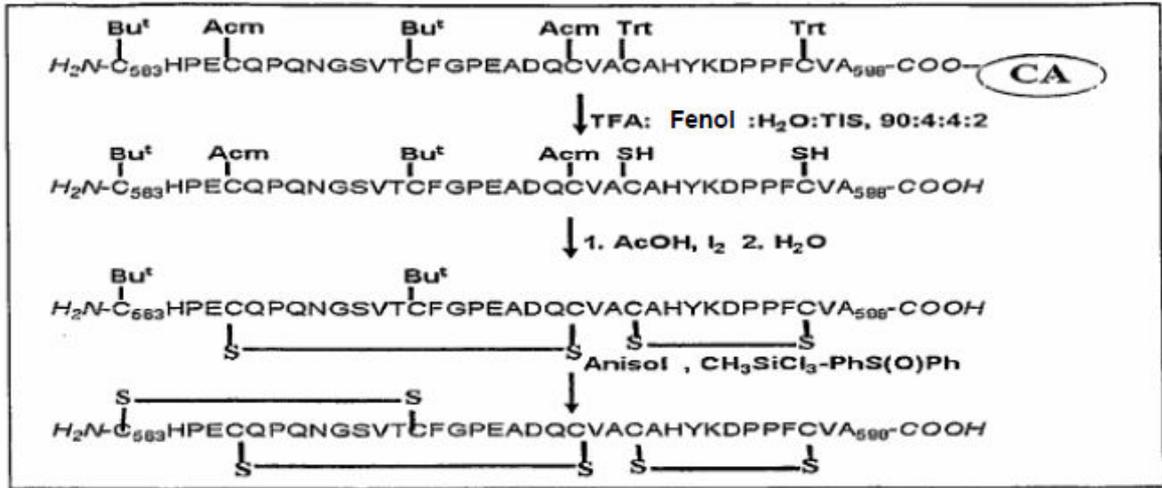


FIGURA 2

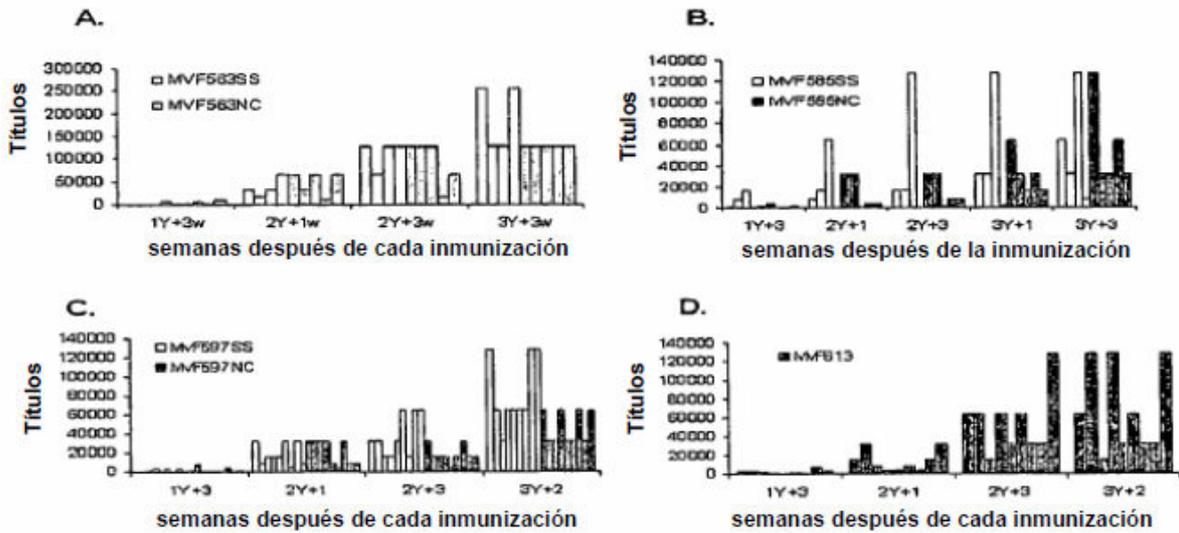


FIGURA 3

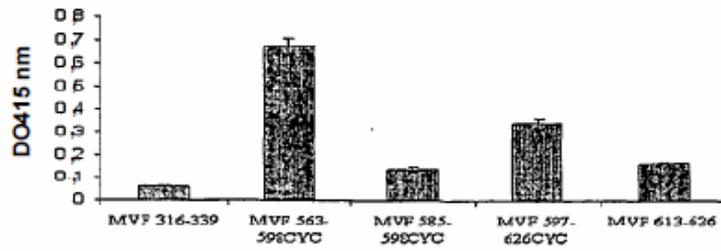


FIGURA 4

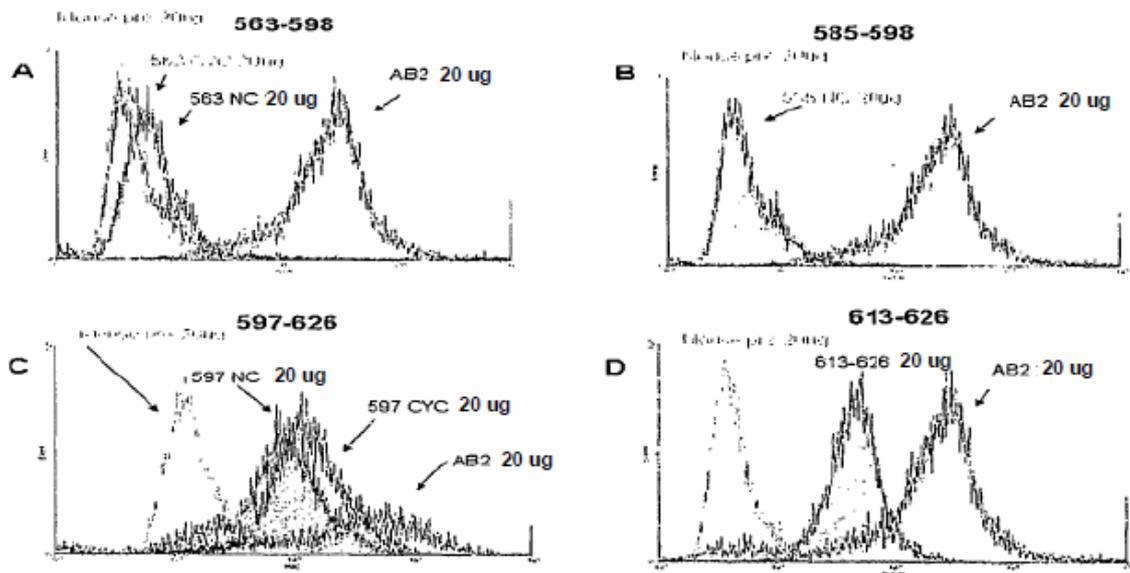


FIGURA 5

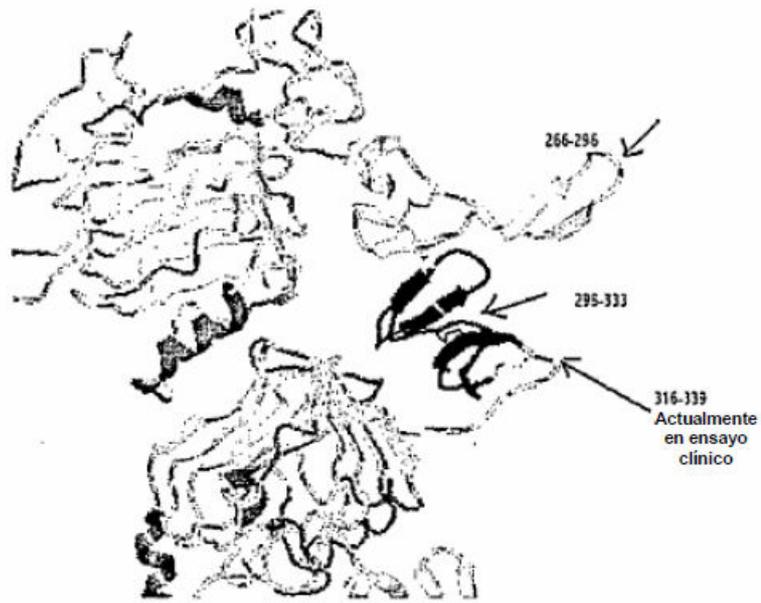


FIGURA 6



FIGURA 7

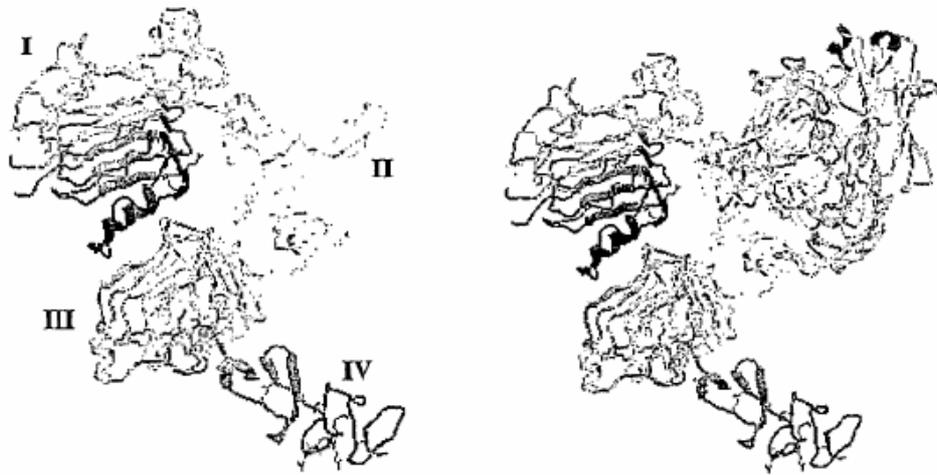


FIGURA 8

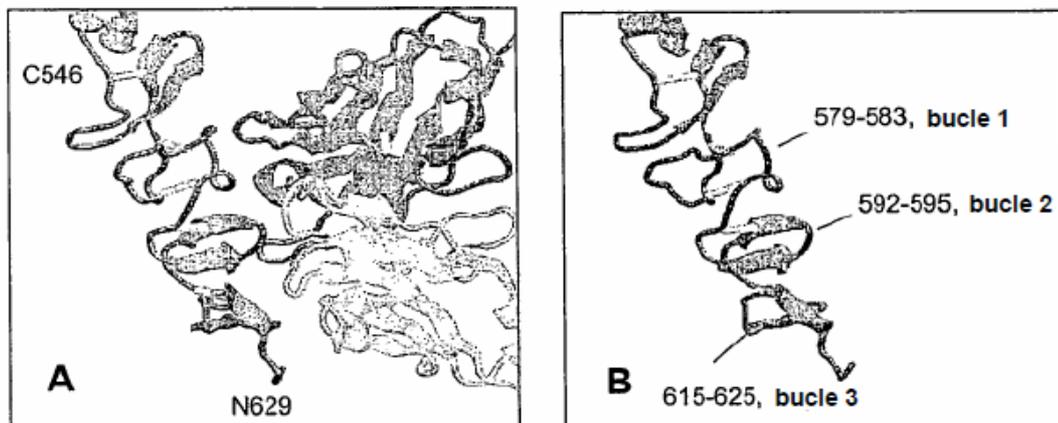


FIGURA 9

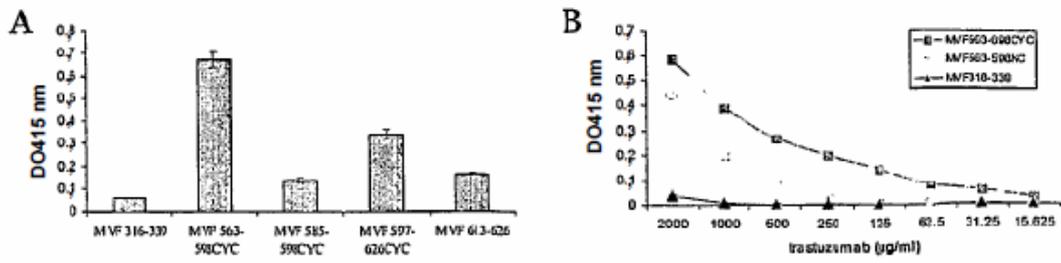


FIGURA 10

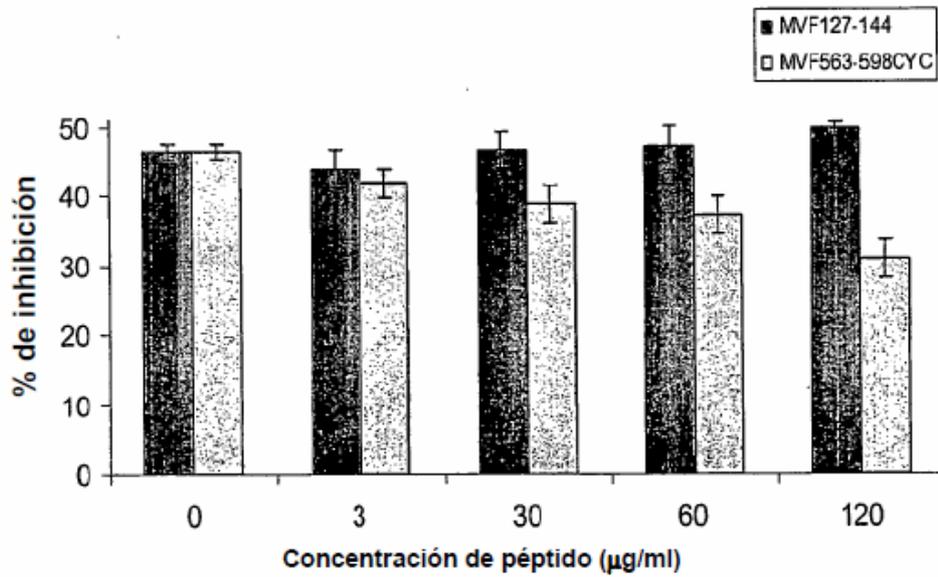


FIGURA 11

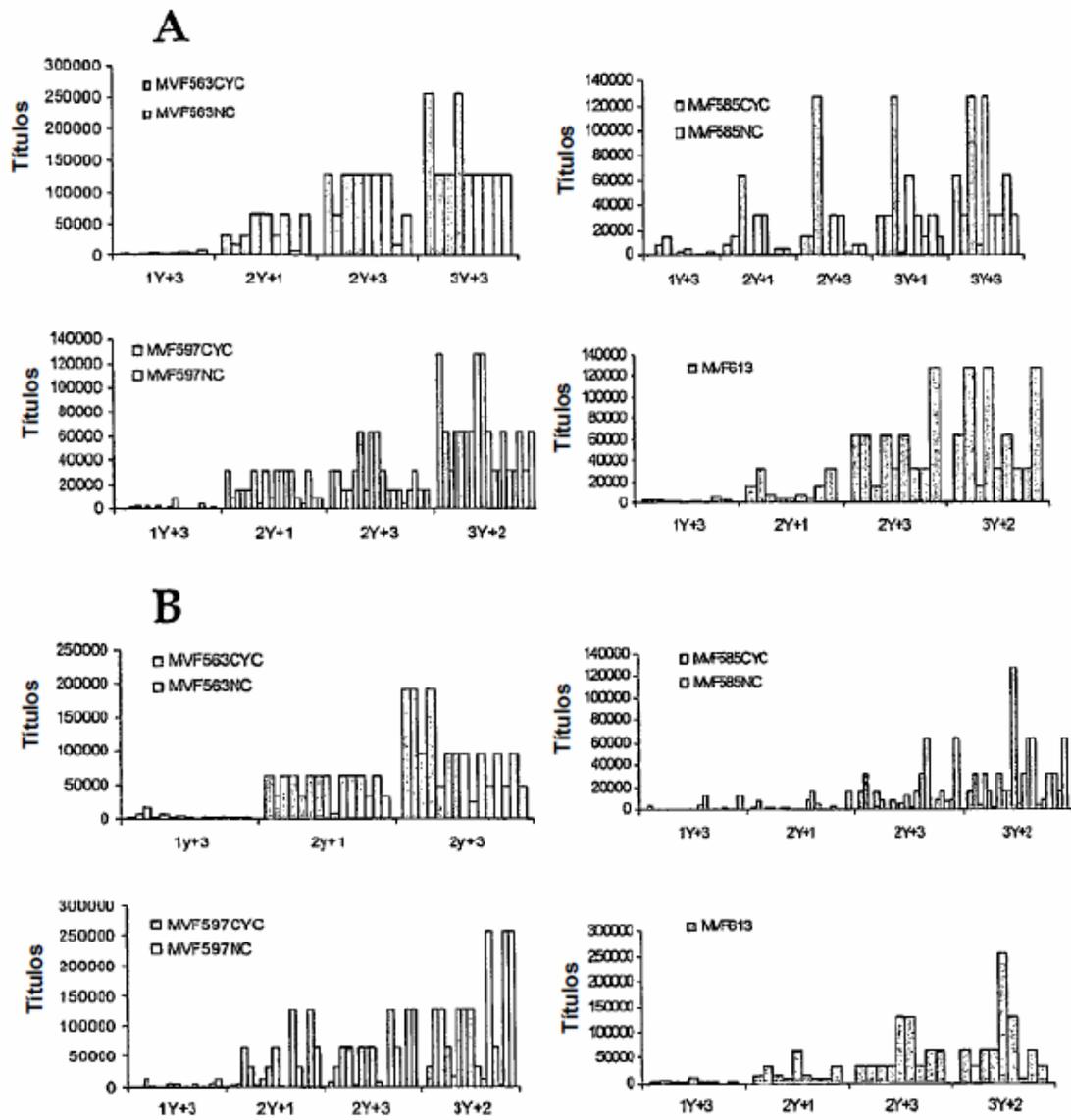


FIGURA 12

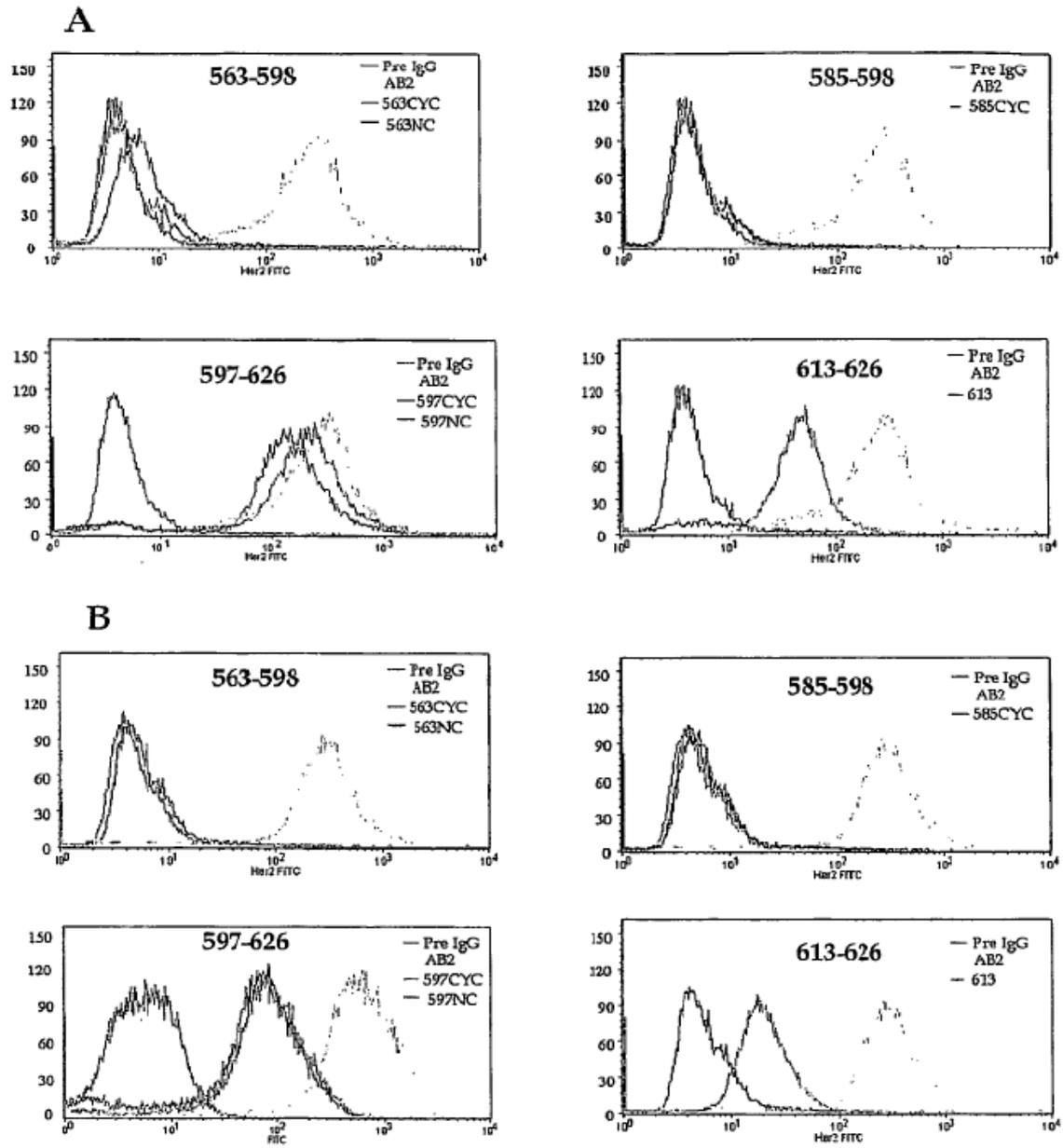
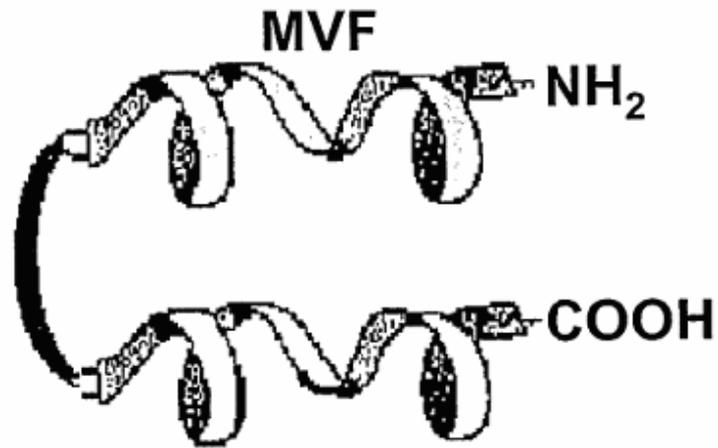


FIGURA 13



Epítipo de linfocitos B

FIGURA 14

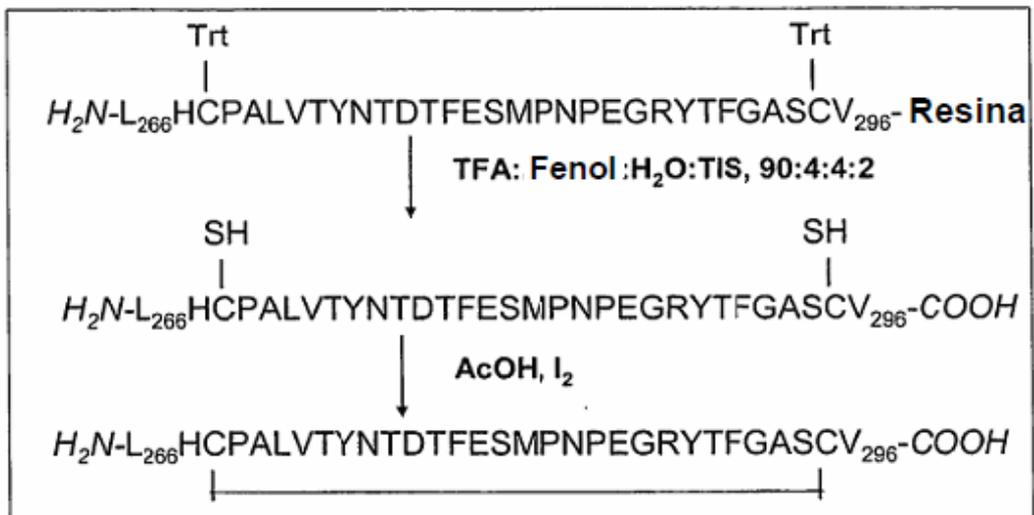


FIGURA 15

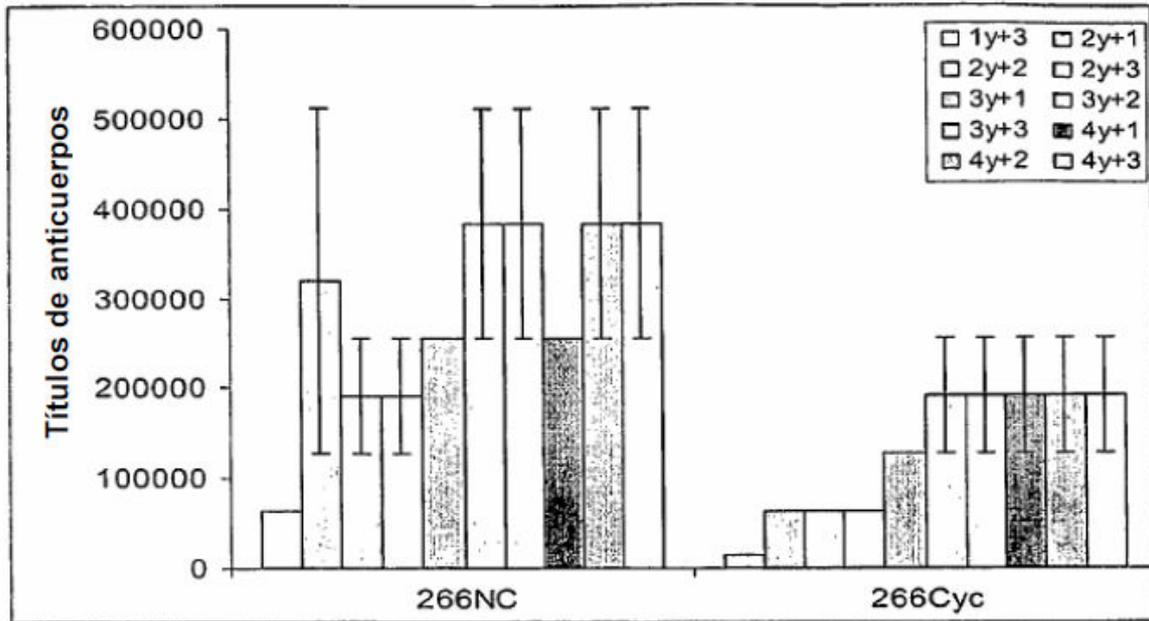


FIGURA 16

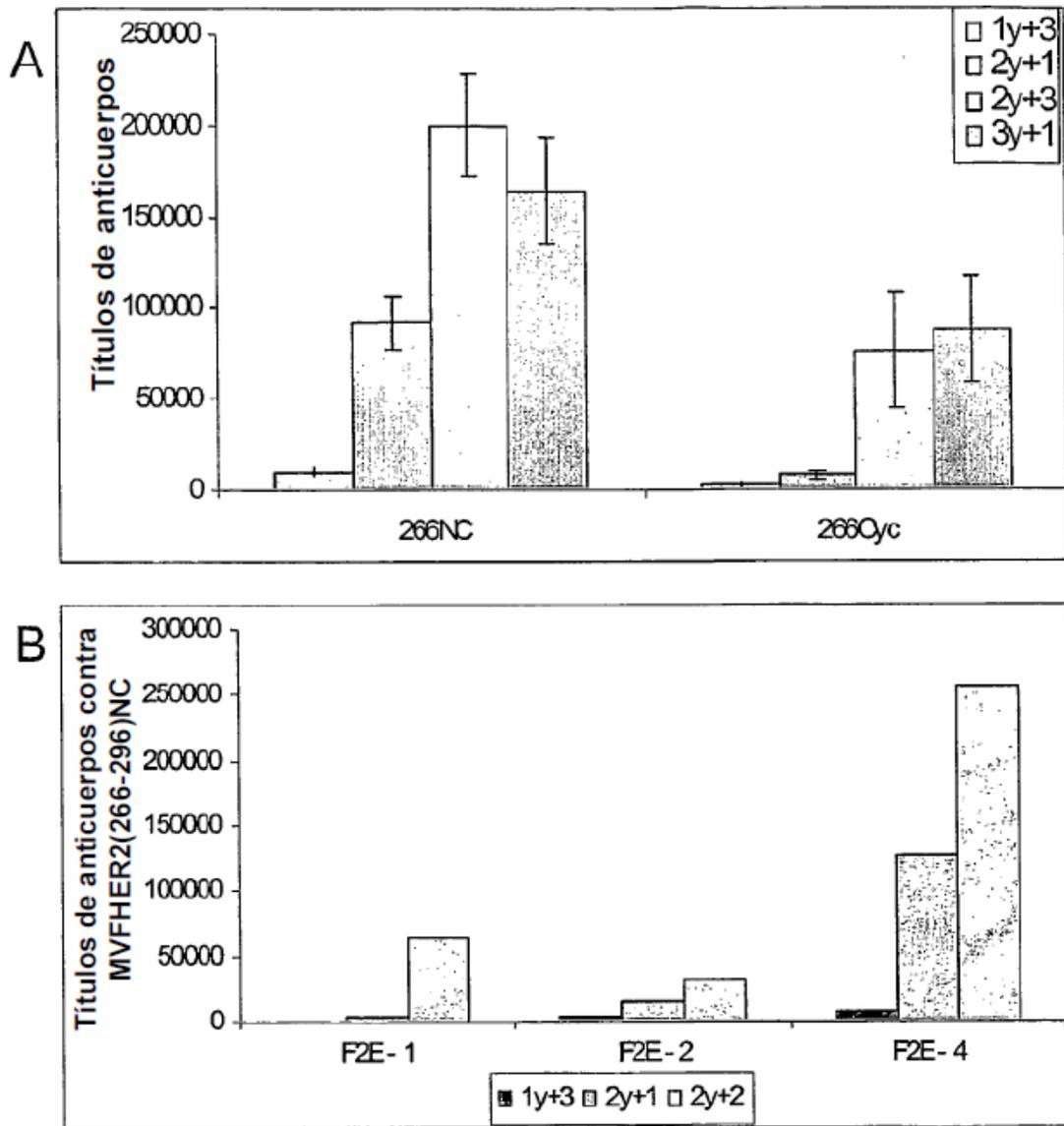


FIGURA 17

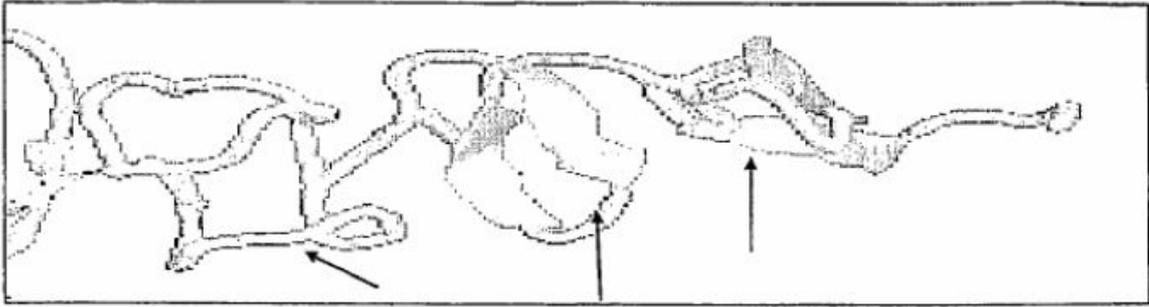


FIGURA 18

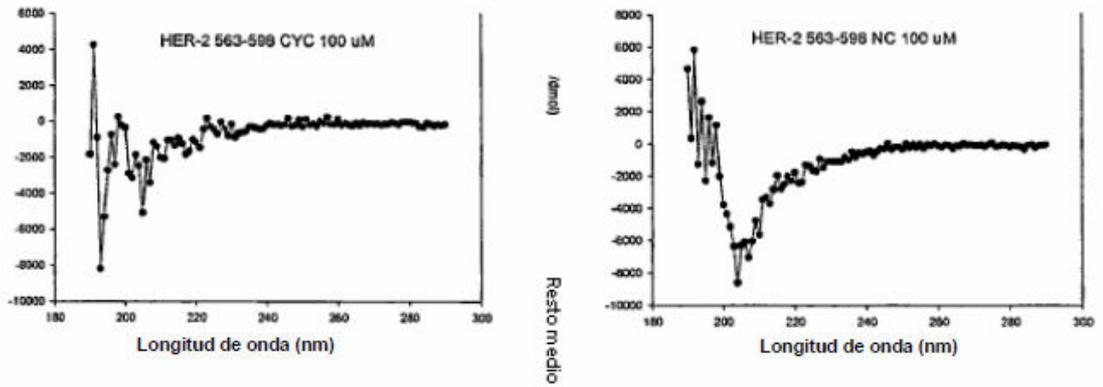


FIGURA 19



*Adición de maleimida PEO₂-Biotina no observada

FIGURA 20

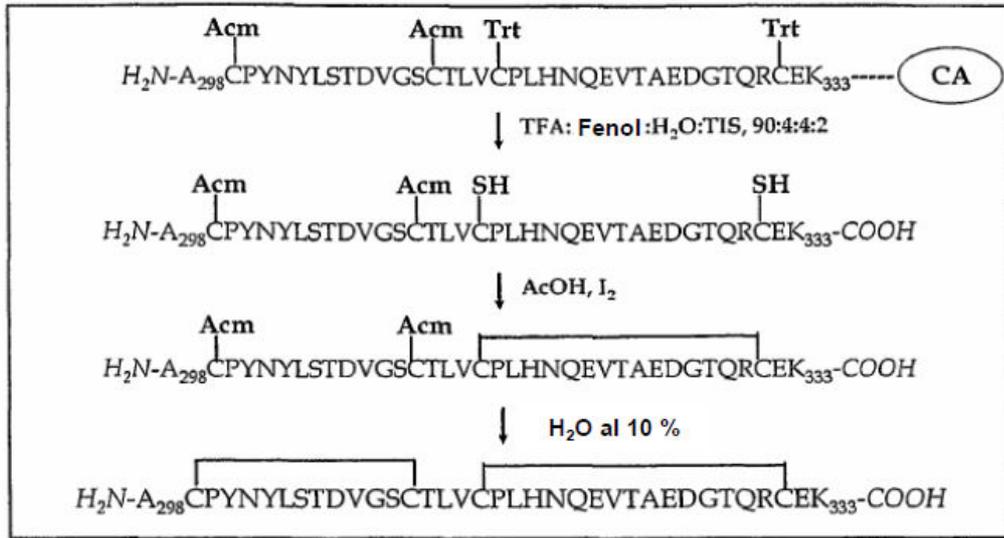


FIGURA 21

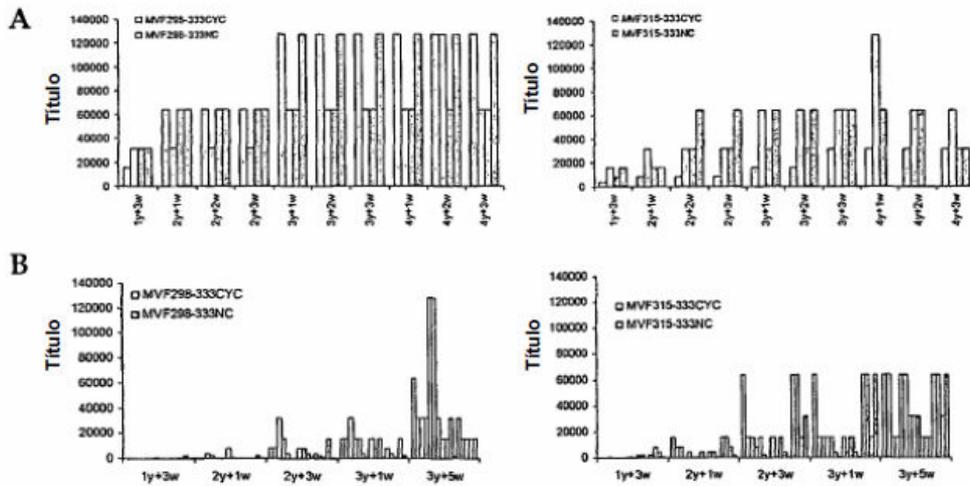


FIGURA 22

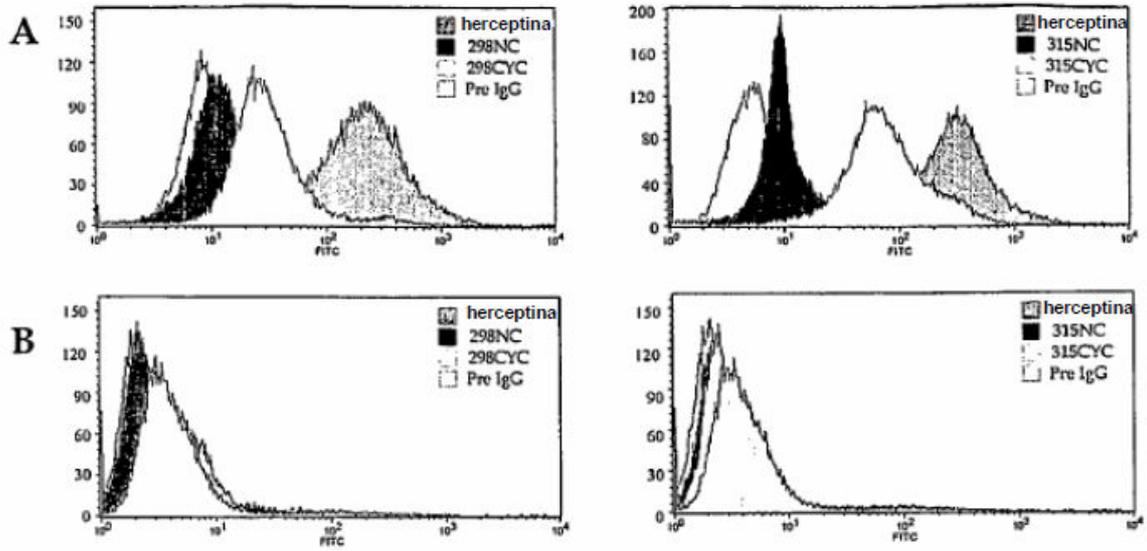


FIGURA 23

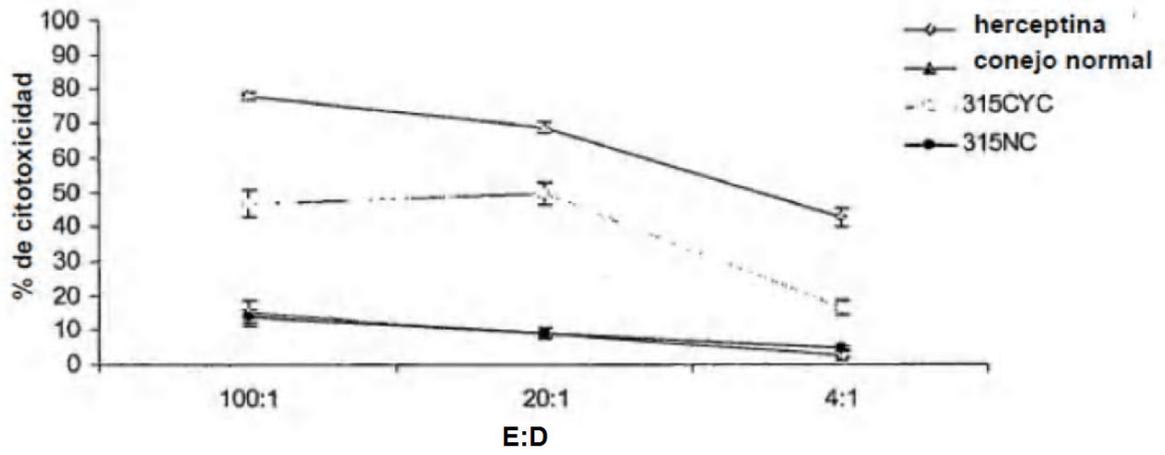
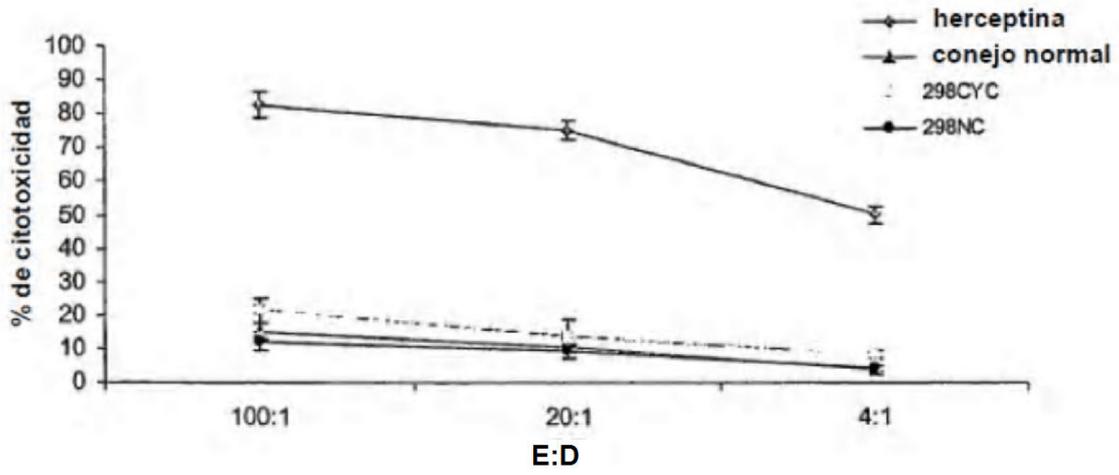


FIGURA 24

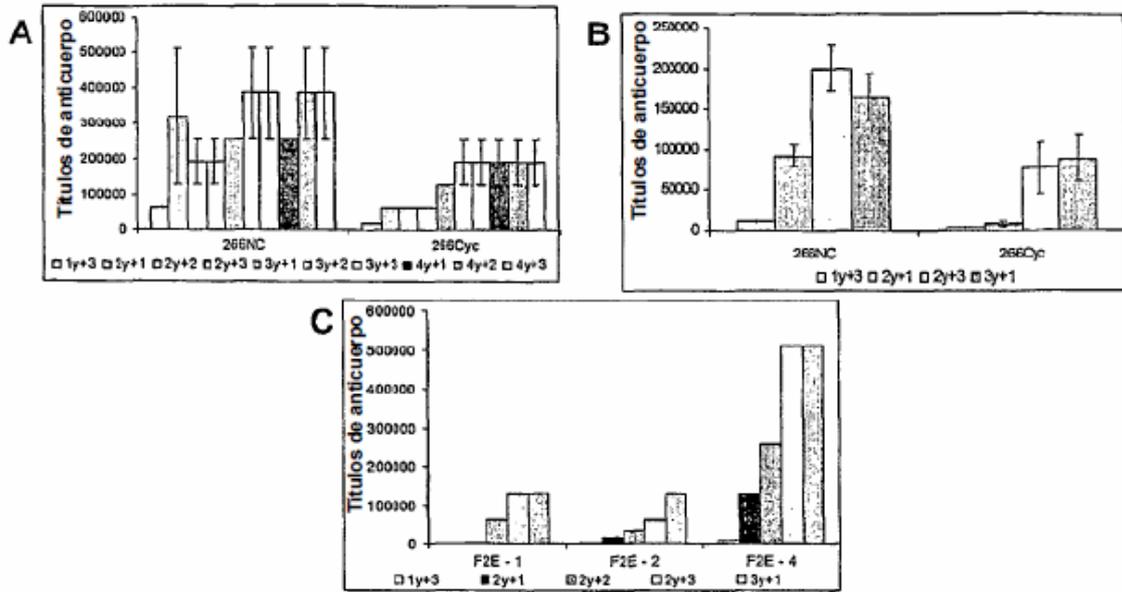


FIGURA 27

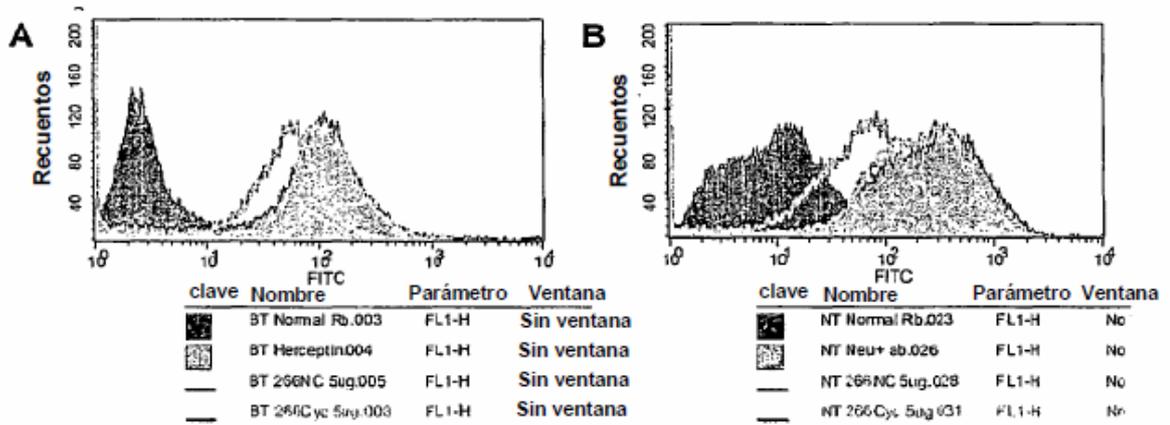


FIGURA 28

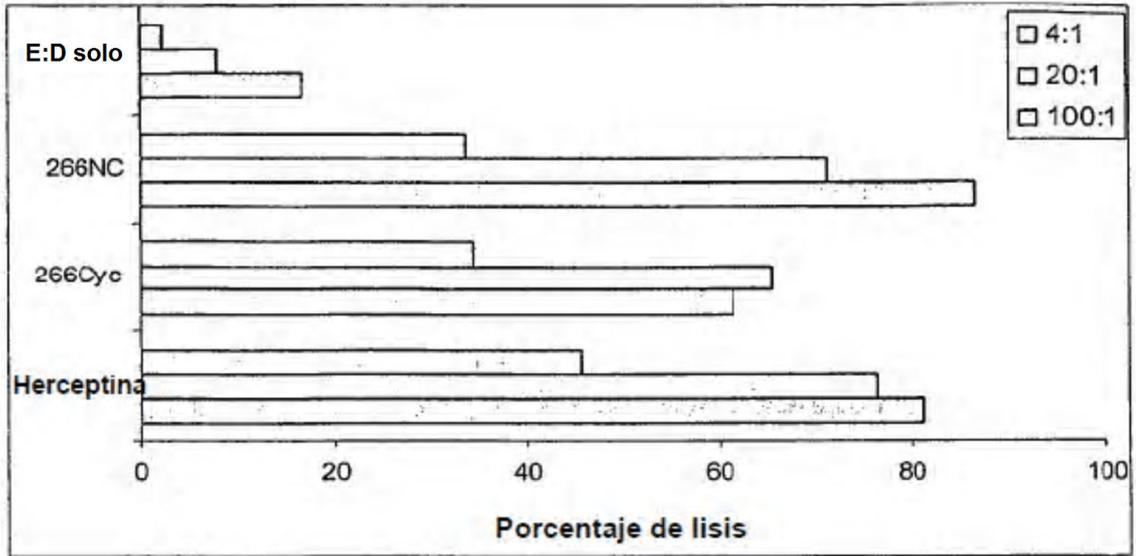


FIGURA 29

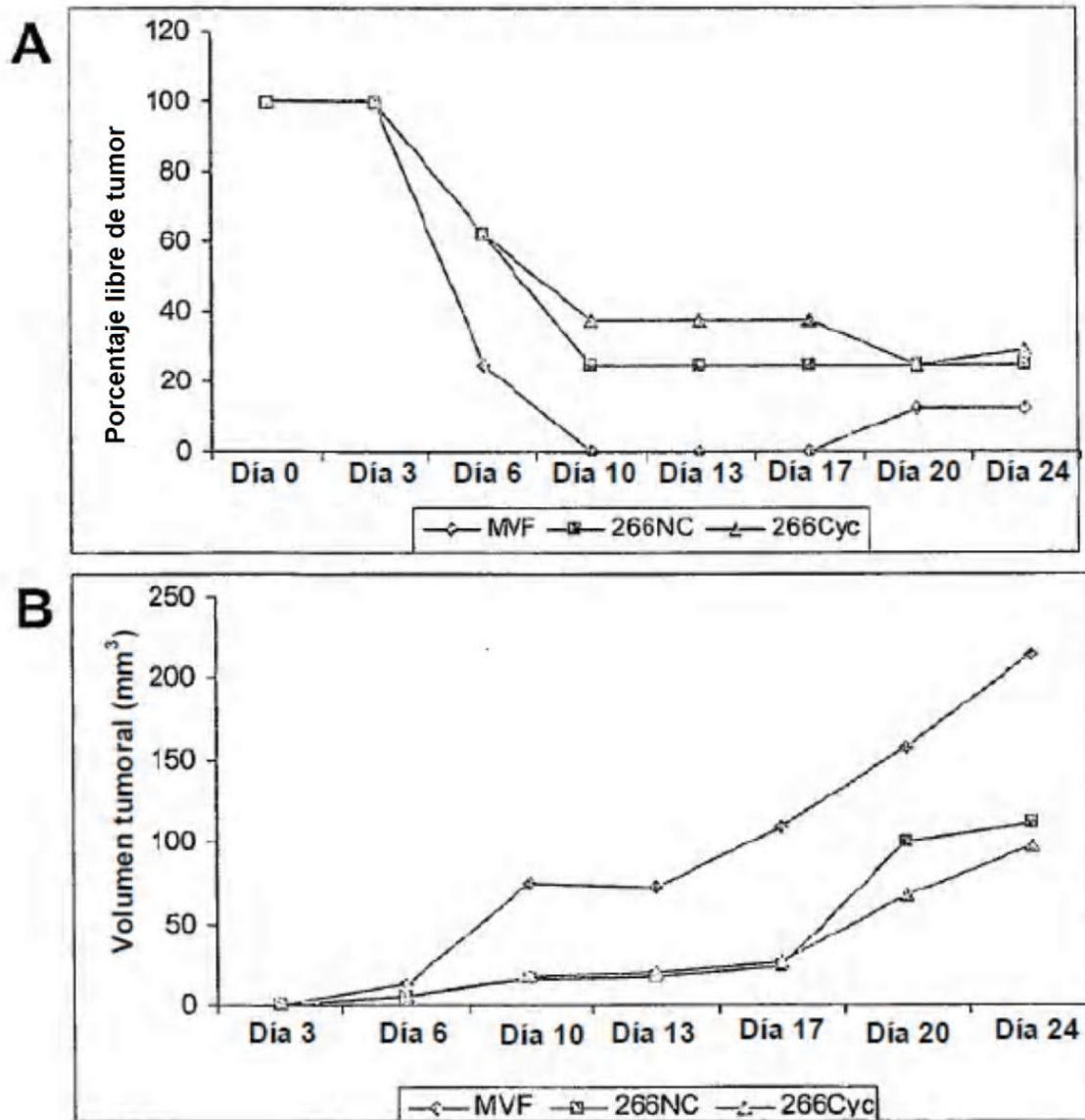


FIGURA 30