

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 465**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008 E 08017305 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2172211**

54 Título: **Composición de péptidos tumor-asociados y relacionados con la vacuna contra el cáncer para el tratamiento de glioblastoma (GBM) y otros cánceres**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.05.2015**

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)  
PAUL-EHRLICH-STRASSE 15  
72076 TÜBINGEN, DE**

72 Inventor/es:

**SCHOOR, OLIVER;  
HILF, NORBERT;  
WEINSCHENK, TONI;  
TRAUTWEIN, CLAUDIA;  
WALTER, STEFFEN y  
SINGH, HARPREET**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 536 465 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

Composición de péptidos tumor-asociados y relacionados con la vacuna contra el cáncer para el tratamiento de glioblastoma (GBM) y otros cánceres

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunoterapéuticos y a su uso en inmunoterapia, en particular, en la inmunoterapia del cáncer. La presente invención se refiere específicamente a una composición farmacéutica, la cual comprende un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 2, y un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 3, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable. En concreto, la composición de los péptidos de la presente invención puede ser utilizada en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales contra gliomas.

10 **Antecedentes de la invención**

Los gliomas son tumores cerebrales originados en las células gliales del sistema nervioso. Las células gliales, llamadas por lo común neuroglía o simplemente glía, son células no neuronales que proporcionan soporte y nutrición, mantienen la homeostasia, forman la mielina e intervienen en la transmisión de señales en el sistema nervioso. Los dos tipos más importantes de glioma son el astrocitoma y el oligodendroglioma, llamados así por el tipo de célula glial que los origina, esto es, astrocitos y oligodendrocitos. En el grupo de los astrocitomas se encuentra el glioblastoma multiforme (denominado en lo sucesivo glioblastoma) que es el tumor cerebral maligno más frecuente en adultos pues supone alrededor del 40% de los tumores cerebrales malignos y alrededor del 50% de los gliomas (CBTRUS, 2006). El glioblastoma invade con agresividad el sistema nervioso central y entre todos los gliomas es el que ostenta el nivel más alto de malignidad (grado IV). Pese a los avances en el tratamiento logrados merced a mejoras en las técnicas de neuroimagen, la microcirugía y las opciones terapéuticas como la temozolomida o la radiación, el glioblastoma sigue siendo incurable (Macdonald, 2001; Burton and Prados, 2000; Prados and Levin, 2000). La tasa de letalidad de este tumor cerebral es muy alta: la esperanza de vida media oscila entre 9 y 12 meses desde el diagnóstico. La supervivencia a 5 años durante el periodo de observación comprendido entre 1986 y 1990 fue del 8,0%. Hasta la fecha, la supervivencia cinco años después del tratamiento agresivo que incluye la resección macroscópica del tumor sigue siendo inferior al 10% (Burton and Prados, 2000; Nieder et al., 2000; Napolitano et al., 1999; Dazzi et al., 2000). A tenor de lo anterior queda patente la necesidad de nuevos métodos terapéuticos eficaces.

El grado de indiferenciación de las células tumorales del glioblastoma es el más elevado de todos los tumores cerebrales, lo que explica su alto potencial de migración y proliferación y su elevada invasividad y, por ende, su pronóstico funesto. Los glioblastomas provocan la muerte por el crecimiento rápido, agresivo e infiltrante que demuestran en el cerebro. El crecimiento infiltrante es el responsable del carácter inoperable de estos tumores. Los glioblastomas también son relativamente resistentes a la radioterapia y la quimioterapia, por lo que la recurrencia postratamiento es elevada. Además, la respuesta inmunitaria contra las células neoplásicas resulta claramente ineficaz a la hora de lograr su erradicación total después de la resección y la radioterapia (Roth and Weller, 1999; Dix et al., 1999; Sablotzki et al., 2000).

El glioblastoma se clasifica en primario (de novo) y secundario dependiendo de las diferencias en el mecanismo génico de la transformación maligna que experimentan los astrocitos indiferenciados o las células precursoras gliales. El glioblastoma secundario afecta a personas jóvenes menores de 45 años. A lo largo de 4 o 5 años, en promedio, el glioblastoma secundario evoluciona de un astrocitoma de bajo grado a un astrocitoma indiferenciado. Por el contrario, el glioblastoma primario afecta sobre todo a personas más mayores, con una media de edad de 55 años. Por norma general el glioblastoma primario aparece como un glioblastoma fulminante caracterizado por la progresión del tumor en 3 meses desde el estado sin anomalías clínicas ni patológicas (Pathology and Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, Francia, 2000)).

El glioblastoma migra a lo largo de los nervios mielinizados y se disemina ampliamente por el sistema nervioso central. En la mayoría de casos el tratamiento quirúrgico sólo consigue un efecto terapéutico limitado (Neurol. Med. Chir. (Tokio) 34, 91-94, 1994; Neurol. Med. Chir. (Tokio) 33, 425-458, 1993; Neuropathology 17, 186-188, 1997) (Macdonald, 2001; Prados and Levin, 2000).

Las células del glioma maligno eluden la detección del sistema inmunitario del anfitrión mediante la producción de agentes inmunodepresores que alteran la proliferación de los linfocitos T y la producción por parte de estos de la citocina inmunoestimulante IL-2 (Dix et al., 1999).

Las neoplasias intracraneales pueden surgir en cualquiera de las estructuras o tipos celulares del SNC: encéfalo, meninges, glándula pituitaria, cráneo, e incluso tejido embrionario residual. La incidencia anual total de tumores cerebrales primarios en Estados Unidos es de 14 casos por 100. 000. Los tumores cerebrales primarios más frecuentes son los meningiomas, que representan el 27% de los tumores cerebrales primarios, y los glioblastomas, que suponen otro 23% (los glioblastomas suponen el 40% de los tumores cerebrales malignos en los adultos). Muchos de esos tumores son agresivos y presentan un alto grado. En la población pediátrica los tumores cerebrales primarios son los tumores sólidos más frecuentes y la segunda causa de muerte por cáncer después de la leucemia.

A día de hoy prosigue la búsqueda de un tratamiento eficaz contra el glioblastoma. Para combatir tales células neoplásicas se está estudiando la inmunoterapia, o el tratamiento basado en el reclutamiento del sistema inmunitario. Los primeros resultados alentadores en el tratamiento del glioblastoma los obtuvo Northwest Therapeutics con «DCVax Brain» en estudios inmunoterapéuticos en humanos, en el curso de los cuales se  
 5 pudieron generar respuestas de CTL específicas de antígeno que prolongaron la mediana del tiempo de supervivencia respecto al tratamiento estándar con una toxicidad mínima (Heimberger et al., 2006).

#### Carcinoma colorrectal

Según la Sociedad Americana contra el Cáncer (American Cancer Society), el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más habitual en Estados Unidos puesto que afecta a más de 175. 000 nuevos pacientes cada año. En  
 10 Estados Unidos, Japón, Francia, Alemania, Italia, España y Reino Unido el número de pacientes afectados supera los 480. 000. Ello lo convierte en una de las principales causas de muerte por cáncer en los países industrializados. Las investigaciones sugieren que el cáncer colorrectal tiene su origen en la interacción entre factores hereditarios y ambientales. En la mayor parte de los casos los pólipos adenomatosos parecen ser los precursores de los tumores colorrectales, aunque el proceso de transición puede durar muchos años. El principal factor de riesgo del cáncer  
 15 colorrectal es la edad, ya que el 90% de los casos se diagnostican a partir de los 50 años. Otros factores de riesgo referidos por la American Cancer Society son el consumo de alcohol, la alimentación rica en grasas o carnes rojas y una ingesta insuficiente de frutas y verduras. La incidencia sigue aumentando especialmente en zonas como Japón, donde como posibles causas se barajan la occidentalización de la alimentación, con la ingesta excesiva de grasas y carne y la reducción del consumo de fibra. Con todo, la incidencia no aumenta al mismo ritmo que en el pasado, lo cual se atribuye al aumento de las exploraciones preventivas y a la extirpación de los pólipos que de lo contrario se  
 20 habrían convertido en tumores malignos.

A semejanza de la mayoría de los tumores sólidos el tratamiento de primera línea consiste en cirugía, aunque sus ventajas siguen estando limitadas a los pacientes en fase inicial y una parte importante de los casos se diagnostica cuando la enfermedad ya se encuentra en fases avanzadas. El tratamiento de referencia contra el cáncer colorrectal  
 25 avanzado consiste en regímenes de quimioterapia basados en el fluorouracilo. Los protocolos denominados FOLFOX (leucovorina/5-FU más oxaliplatino en infusión) y FOLFIRI (irinotecán y leucovorina en bolo y 5-FU en infusión continua) constituyen la mayor parte de tales regímenes.

La introducción de los citotóxicos de tercera generación como el irinotecán y el oxaliplatino ha renovado las esperanzas de lograr mayor eficacia, pero el pronóstico sigue siendo relativamente malo y el índice de supervivencia  
 30 suele rondar generalmente los 20 meses cuando la enfermedad es metastásica. Por tanto, sigue existiendo una importante necesidad de mejorar los resultados contra la enfermedad.

Recientemente ha hecho aparición una nueva generación de medicamentos, agentes dirigidos contra moléculas, como por ejemplo Avastin (bevacizumab) y Erbitux (cetuximab), y cerca de 40 compuestos contra diferentes estadios del cáncer colorrectal se hallan en las últimas etapas de desarrollo clínico. Las combinaciones de varios de  
 35 estos compuestos aumentan las posibles opciones de tratamiento que cabe esperar en el futuro. La gran mayoría de las sustancias se encuentra en la fase II de desarrollo clínico, siendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) la diana de la mayor parte de ellos, puesto que alrededor del 80% de los pacientes afectados por el cáncer colorrectal presentan regulada al alza la expresión de dicho receptor.

En la actualidad se están efectuando ensayos clínicos con pacientes en estadio II que combinan la quimioterapia con anticuerpos monoclonales (AcM) recientemente autorizados (cetuximab + irinotecán o FOLFOX4; bevacizumab  
 40 en monoterapia o con FOLFOX4). Se prevén periodos de observación de tres o cuatro años para disponer de resultados estadísticamente significativos de dichos ensayos.

Los anticuerpos monoclonales (AcM) que actualmente se utilizan en oncología ofrecen en general buenas garantías de no interferir con la inmunoterapia activa. De hecho, existen datos preclínicos que apuntan a que la neutralización  
 45 del VEGF (por la acción del bevacizumab) contribuye positivamente a la activación de los linfocitos T mediada por las células dendríticas (CD).

#### Carcinoma de próstata y otros tumores

Con una cifra estimada de 27. 050 fallecimientos en 2007, el cáncer de próstata es la principal causa de muerte por  
 50 cáncer en varones. Aunque los índices de deceso se han reducido entre la población blanca y afroamericana desde principios de los 90, el nivel registrado entre los varones afroamericanos duplica con creces el de los hombres de raza blanca. El cáncer de próstata es el más diagnosticado en los varones. Por motivos que siguen sin estar claros, la incidencia es significativamente mayor entre los varones afroamericanos que entre los de raza blanca. La incidencia del cáncer de próstata ha cambiado notablemente durante los últimos 20 años: experimentó un rápido  
 55 incremento entre 1988 y 1992 para reducirse drásticamente entre 1992 y 1995 y volvió a repuntar ligeramente desde 1995. Estas tendencias reflejan en gran parte el aumento de los programas de detección del cáncer de próstata mediante el análisis sanguíneo del antígeno específico de la próstata (PSA). El moderado incremento de la incidencia acaecido durante la última década probablemente pueda atribuirse a la generalización del reconocimiento preventivo del PSA entre los varones menores de 65 años. La incidencia del cáncer de próstata se ha estabilizado

entre los mayores de 65 años. Los índices marcaron su máximo entre los hombres de raza blanca en 1992 (237,6 por cada 100.000 varones) y en 1993 entre los varones afroamericanos (342,8 por cada 100.000 varones).

El tratamiento del cáncer de próstata puede implicar la espera en observación, cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, hormonoterapia o cierta combinación de los anteriores. La mejor opción depende de la fase de la enfermedad, de la escala de Gleason y del nivel de PSA. Otros factores importantes incluyen la edad del varón, el estado general de salud y su actitud frente a los posibles tratamientos y los posibles efectos secundarios. Puesto que todos los tratamientos pueden provocar importantes efectos secundarios, como por ejemplo disfunción eréctil e incontinencia urinaria, los debates sobre dichos tratamientos suelen centrarse en equilibrar los objetivos de la terapia y las posibles alteraciones en el estilo de vida.

Cuando el cáncer se ha extendido fuera de la glándula prostática, las opciones de tratamiento cambian significativamente, por lo que la mayor parte de los médicos que tratan el cáncer de próstata utiliza una serie de nomogramas para pronosticar la probabilidad de la propagación. Los tratamientos consistentes en la espera en observación, HIFU, radioterapia, criocirugía y cirugía suelen ofrecerse a los varones cuyo cáncer permanece confinado en la próstata. La terapia hormonal y la quimioterapia suelen reservarse para los casos en que la enfermedad se ha extendido fuera de la próstata, aunque hay excepciones: la radioterapia puede utilizarse para algunos tumores avanzados y la terapia hormonal se emplea para algunos tumores en fase inicial. La crioterapia, la terapia hormonal y la quimioterapia también pueden ofrecerse si el tratamiento inicial falla y el cáncer avanza.

En un número importante de pacientes con carcinoma de próstata que son sometidos a prostatectomía radical por la sospecha clínica de que el crecimiento sigue limitado al órgano, el análisis histológico confirmatorio de la preparación quirúrgica revela que el tumor está extendido a nivel local y se propaga fuera de los límites del órgano. Estos pacientes presentan un elevado riesgo de recidiva local precoz, normalmente detectable por un incremento de los niveles de PSA que se traduce en una recaída bioquímica. Las opciones terapéuticas en esta situación incluyen la radioterapia externa y la ablación hormonal. No obstante, el valor de estos enfoques terapéuticos, especialmente en lo que concierne a prolongar la supervivencia del paciente a largo plazo, no deben considerarse como probados. Además, deben tenerse en cuenta posibles complicaciones asociadas con el tratamiento, como, por ejemplo, el desarrollo de estenosis uretral (radioterapia), la pérdida de la libido y la impotencia, el riesgo de reducción de las sales cálcicas del esqueleto que puede acarrear o agravar la osteoporosis y el notable incremento del riesgo de fracturas óseas patológicas (ablación hormonal).

Más del 90% de los casos de cáncer de próstata se descubren en los estadios local y regional. El índice de supervivencia relativa a 5 años de los pacientes diagnosticados en dichos estadios se aproxima al 100%. Durante los últimos 25 años, el índice de supervivencia a 5 años de todos los estadios combinados ha pasado del 69% a casi el 90%. Según los datos más recientes, la supervivencia relativa a 10 años es del 93%, mientras que a los 15 años es del 77%. Las espectaculares mejoras de la supervivencia, especialmente a 5 años, son atribuibles en parte a la mayor precocidad de los diagnósticos y a las mejoras del tratamiento. Con todo, la supervivencia desciende notablemente cuando el cáncer se ha extendido a otros tejidos y órganos.

#### Cáncer de pulmón

Se calcula que en 2007 se diagnosticarán 210.000 nuevos casos en Estados Unidos, cifra que supone en torno al 15% de los diagnósticos de cáncer. La incidencia está cayendo notablemente entre los hombres, desde un máximo de 102 casos por cada 100.000 varones en 1984 hasta 78,5 en 2003. En las mujeres está estabilizándose tras un largo período de incremento. Clínicamente el cáncer de pulmón se divide, a efectos de tratamiento, en dos grupos: el carcinoma microcítico de pulmón (13%) y el no microcítico (87%).

Al cáncer de pulmón se debe la mayor parte de fallecimientos relacionados con el cáncer, tanto en hombres como en mujeres. Se estima que en 2007 se producirán 160.390 fallecimientos, que representan alrededor del 29% del total de muertes por cáncer. Desde 1987, cada año han fallecido más mujeres a causa del cáncer de pulmón que del cáncer de mama. La tasa de mortalidad en la población masculina ha seguido cayendo notablemente entre 1991 y 2003, a un ritmo aproximado del 1,9% por año. La mortalidad por cáncer de pulmón entre las mujeres está estabilizándose, tras haber experimentado un aumento incesante durante varias décadas. Estas tendencias en la mortalidad por cáncer de pulmón reflejan el descenso del tabaquismo durante los últimos 30 años.

Las opciones de tratamiento vienen determinadas por el tipo (microcítico o no) y la fase del cáncer, e incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapias biológicas dirigidas, como bevacizumab (Avastin®) y erlotinib (Tarceva®). La cirugía suele ser el tratamiento de elección para los cánceres localizados. Algunos estudios recientes indican que la tasa de supervivencia del cáncer de pulmón no microcítico en fase inicial mejora si se aplica quimioterapia tras la cirugía. Como la enfermedad acostumbra a estar extendida cuando se descubre, suele recurrirse a la radioterapia y la quimioterapia, a veces en combinación con la cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento elegido habitualmente para el carcinoma microcítico de pulmón. Con este régimen un alto porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es duradera.

El índice de supervivencia relativa para el cáncer de pulmón después de 1 año se ha incrementado ligeramente desde el 37% en 1975-1979 hasta el 42% en 2002, en gran medida gracias a las mejoras en las técnicas quirúrgicas

y las terapias combinadas. No obstante, el índice combinado de supervivencia a 5 años para todos los estadios es tan solo del 16%. El índice de supervivencia es del 49% en los casos que son detectados cuando la enfermedad aún está localizada. Pero solo el 16% de los cánceres de pulmón se diagnostica en este estadio inicial.

5 Tabla 1: Estimación de los nuevos casos de cáncer y fallecimientos según el sexo en Estados Unidos en 2007 (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures, 2007. Atlanta: American Cancer Society, 2007.) Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: American Cancer Society; 2007.)

Localización	Estimación de nuevos casos			Estimación de fallecimientos		
	Ambos sexos	Varones	Mujeres	Ambos sexos	Varones	Mujeres
Glioma y cerebro	20.500	11.170	9.330	12.740	7.150	5.590
Mama	180.510	2.030	178.480	40.910	450	40.460
Próstata	218.890	218.890		27.050	27.050	
Esófago	15.560	12.130	3.430	13.940	10.900	3.040
Colon	112.340	55.290	57.050	52.180	26.000	26.180
Riñón	51.190	31.590	19.600	12.890	8.080	4.810
Páncreas	37.170	18.830	18.340	33.370	16.840	16.530
Carcinomas escamocelulares; neoplasias queratinocíticas cutáneo	1.000.000	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos	sin datos
Leucemia	44.240	24.800	19.440	21.790	12.320	9.470
Pulmón	213.380	114.760	98.620	160.390	89.510	70.880
Linfoma no hodgkiniano	63.190	34.210	28.990	18.660	9.600	9.060
Ovarios	22.430		22.430	15.280		15.280
Melanoma	59.940	33.910	26.030	8.110	5.220	2.890

El documento WO 02/074237 describe la proteína entera de la SEQ ID N. ° 2 (FABP7), pero no revela respuestas de linfocitos T contra la proteína.

- 10 Así pues, sigue existiendo necesidad de nuevas opciones de tratamiento eficaz y seguro para el glioblastoma, tumor de próstata, cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer colorrectal, carcinoma de células claras de células renales, cáncer de pulmón, del SNC, cáncer de ovarios, melanoma, cáncer de páncreas, carcinomas escamocelulares, leucemia y meduloblastoma, así como para otros tumores que muestran una sobreexpresión de survivina, de forma que se mejore el bienestar de los pacientes sin utilizar quimioterapia u otros fármacos que puedan provocar efectos secundarios graves.
- 15

#### Descripción detallada de la invención

- Todos los términos utilizados en la presente memoria se definen del modo indicado a continuación a menos que se indique lo contrario. El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes.
- 20 Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 aminoácidos de longitud.

- El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítipo o epítipos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 14, aproximadamente.
- 25

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantengan los epítomos adecuados. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un inmunógeno en la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos Tipo lo tanto, un inmunógeno sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T.

Un «epítomo» de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I o clase II, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos. Los epítomos de linfocitos T que se unen a moléculas MHC de clase II suelen tener una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos. En el caso de los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II, el mismo péptido y el epítomo del linfocito T correspondiente pueden compartir un segmento central común pero en cambio diferir en la longitud total como consecuencia de secuencias flanqueantes de diferentes longitudes en dirección ascendente del extremo amino de la secuencia central y descendente con respecto a su terminal carboxílico, respectivamente. Los receptores MHC de clase II presentan una conformación más abierta; de la misma manera, los péptidos unidos a receptores MHC de clase II no se enclavan completamente en la estructura de la hendidura de unión del péptido de la molécula MHC de clase II, como ocurre con la hendidura de unión del péptido de la molécula MHC de clase I. Es de notar que éste no es el caso para el péptido con arreglo a la SEQ ID n.º1, puesto que pequeñas variaciones en la longitud del péptido ocasionan un gran descenso de la actividad (véase más abajo).

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A\*01, HLA-A\*02 y HLA-A\*11 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

Tres locus diferentes del genoma humano albergan los genes MHC de clase II: HLA-DR, HLA-DQ y HLA-Duplos receptores MHC de clase II son heterodímeros que constan de una cadena alfa y una beta, las cuales se insertan en la membrana celular a través de una región transmembrana. HLA-DRB1\*04 y HLA-DRB1\*07 son dos ejemplos de diferentes alelos beta MHC de clase II que se sabe que están codificados en estos locus. Los alelos de clase II son muy polimorfos: por ejemplo, se han descrito varios cientos de alelos HLA-DRB1 distintos. En la Tabla 2 se muestran las frecuencias de expresión en diversas poblaciones del alelo HLA-A\*02 y de los serotipos más frecuentes del locus HLA-DR.

Tabla 2: Frecuencias de expresión F del HLA\*A02 y de los serotipos HLA-DR más frecuentes. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas  $G_r$  en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg  $F=1-(1-G_r)^2$ . Las combinaciones de A\*02 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al., 2004).

Alelo HLA	Frecuencias de expresión de los serotipos HLA-DR y HLA*02 en subpoblaciones de Norteamérica			
	Americanos de raza blanca	Afroamericanos	Americanos de origen asiático	Hispanoamericanos
A*02	49,1%	34,1%	43,2%	48,3%
DR1	19,4%	13,2%	6,8%	15,3%
DR2	28,2%	29,8%	33,8%	21,2%
DR3	20,6%	24,8%	9,2%	15,2%
DR4	30,7%	11,1%	28,6%	36,8%
DR5	23,3%	31,1%	30,0%	20,0%
DR6	26,7%	33,7%	25,1%	31,1%

DR7	24,8%	19,2%	13,4%	20,2%
DR8	5,7%	12,1%	12,7%	18,6%
DR9	2,1%	5,8%	18,6%	2,1%

Por tanto, a efectos terapéuticos y de diagnóstico sería muy deseable contar con un péptido que se uniese, con la afinidad adecuada, a varios receptores HLA de clase II distintos. Todo péptido que se une a varias moléculas HLA de clase II distintas recibe el nombre de ligando promiscuo.

- 5 En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ADN incluye tanto ADN monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia. El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica in vivo el producto de expresión natural del gen.

La región codificante puede formar parte de un gen normal, mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

El término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

- 15 La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas de la presente invención se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y de oligonucleótidos cortos de enlace, o a partir de una serie de oligonucleótidos, con el fin de proporcionar un gen sintético capaz de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

El término «producto de expresión» define al polipéptido o a la proteína que es el producto natural de la traducción del gen y cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y, por tanto, que codifican el mismo aminoácido o aminoácidos.

- 25 El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia de codificación, define una porción de ADN que no comprende la región codificante completa, cuyo producto de expresión retiene esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante completa.

- 30 El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en la forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de ADN mayor, que deriva de ADN aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, sin materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes en dirección 3' (downstream) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término «cebador» define una secuencia corta de ácidos nucleicos que puede aparearse con una cadena de ADN y que proporciona un extremo 3'OH libre en el que una polimerasa de ADN puede comenzar la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

- 40 El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción.

El término «marco de lectura abierto (ORF)» designa una serie de tripletes que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación y que forman una secuencia (potencialmente) traducible en proteína.

- 45 El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si queda separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Dichos polinucleótidos pueden formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos pueden formar parte de una composición y seguir estando aislados en el sentido de que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

- 50 Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de conformidad con la presente invención también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta;

más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan sólo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

Los productos ácidos nucleicos y los polipéptidos que son productos de expresión descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

El término «fragmento activo» define un fragmento que genera una respuesta inmunitaria (es decir, que posee actividad inmunógena) cuando se administra –solo u, opcionalmente, con un adyuvante adecuado– a un animal, que puede ser un mamífero como, por ejemplo, un conejo o un ratón, sin excluir a un ser humano; dicha respuesta inmunitaria adopta la forma de estimulación de una respuesta de linfocitos T en el animal receptor como, por ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T in vitro.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Esto significa que cualquiera de esos fragmentos, necesariamente y como parte de su secuencia de aminoácidos, va a contener un segmento, fragmento o porción que es sustancialmente idéntica, si no lo es exactamente, a una secuencia de las SEQ ID n.º 1 a 12, que corresponde a la estructura natural, o a las proteínas «precursoras» de las SEQ ID n.º 1 a 12. Utilizados en relación con los polinucleótidos, dichos términos se refieren a los productos generados por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje idéntico», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$

donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde

(i) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y

(ii) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y

(iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia;

y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad porcentual, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda la identidad porcentual mínima especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que la identidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

Los péptidos originales descritos aquí se pueden modificar mediante la sustitución de uno o más residuos en sitios diferentes, posiblemente selectivos, dentro de la cadena peptídica, si no se especifica de otra manera. Dichas sustituciones pueden ser de naturaleza conservadora como, por ejemplo, si un aminoácido es reemplazado por un

aminoácido de estructura y características similares, como en el caso de un aminoácido hidrófobo que es sustituido por otro aminoácido hidrófobo. Aún más conservador sería el reemplazo de aminoácidos de tamaño y naturaleza química igual o similar como, por ejemplo, si una leucina se reemplaza por isoleucina. En diversos estudios de variaciones de secuencias en familias de proteínas homólogas naturales, determinadas sustituciones de aminoácidos se toleran con más frecuencia que otras, y éstas muestran a menudo una correlación con similitudes de tamaño, carga, polaridad e hidrofobicidad entre el aminoácido original y su reemplazo, siendo ésta la base para la definición de las «sustituciones conservadoras».

Las sustituciones conservadoras se definen como intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes: Grupo 1: residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro y Gly); Grupo 2: residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu y Gln); Grupo 3: residuos polares cargados positivamente (His, Arg y Lys); Grupo 4: residuos alifáticos grandes no polares (Met, Leu, Ile, Val y Cys); y Grupo 5: residuos grandes aromáticos (Phe, Tyr y Trp).

Las sustituciones menos conservadoras pueden implicar el reemplazo de un aminoácido por otro con características similares pero diferenciado de alguna manera en el tamaño, como en el reemplazo de un residuo de isoleucina por alanina. Los reemplazos muy poco o nada conservadores pueden implicar la sustitución de un aminoácido ácido por otro polar, o incluso por uno de carácter básico. Estas sustituciones «radicales» no se pueden descartar, sin embargo, como potencialmente inefectivas, ya que los efectos químicos no son totalmente predecibles y las sustituciones radicales bien pueden provocar efectos inesperados imposibles de predecir de otra forma a partir de principios químicos simples.

Naturalmente, dichas sustituciones pueden implicar otras estructuras distintas de los aminoácidos L habituales. De esta forma, aminoácidos D podrían sustituir a los aminoácidos L que habitualmente se encuentran en los péptidos antigénicos de la invención y, aún así, quedar englobados en la descripción del presente documento. Además, los aminoácidos que poseen grupos R no estándar (es decir, grupos R distintos de los presentes en los 20 aminoácidos comunes de las proteínas naturales) también pueden ser utilizados como sustitutos para producir inmunógenos y polipéptidos inmunogénicos de conformidad con la presente descripción.

Si se descubre que las sustituciones en más de una posición dan lugar a un péptido con actividad antigénica sustancialmente equivalente o mayor, como se define más abajo, entonces las combinaciones de dichas sustituciones se probarán para determinar si las sustituciones combinadas provocan efectos aditivos o sinérgicos en la antigenicidad del péptido. Como máximo, se sustituirán hasta 4 posiciones simultáneamente dentro del péptido.

El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido in vitro o in vivo. En el caso de los linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas, preferiblemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido; la secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido; o la desgranulación. En el caso de los linfocitos T cooperadores restringidos a MHC de clase II, las funciones efectoras pueden ser la secreción inducida por péptido de citocinas, preferiblemente de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-4, IL-5, IL-10 o IL-2, o la desgranulación inducida por péptido. Las funciones efectoras posibles de los CTL y de los linfocitos T cooperadores no se limitan a esta lista.

#### Abordajes inmunoterapéuticos para el tratamiento

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar los mecanismos de defensa humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer (Cheever et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94; High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy). En concreto, en dicha respuesta desempeñan un papel importante los linfocitos T CD8-positivos, los cuales reconocen péptidos incorporados en las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que normalmente están compuestos por 8 a 10 residuos de aminoácidos procedentes de proteínas o productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol (Schubert U, Antón LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. ; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; *Nature* 2000; 404(6779):770-774). Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

Existen dos clases de moléculas MHC: las moléculas MHC de clase I, que se encuentran en la mayoría de células nucleadas y presentan péptidos derivados de la escisión proteolítica principalmente de proteínas endógenas,

citosólicas o nucleares, DRIPS y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas de MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía. Las moléculas de MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan predominantemente péptidos de proteínas exógenas que son captadas por las APC mediante endocitosis y después son procesadas por las mismas. Al igual que en la clase I, en las moléculas de MHC de clase II se han descrito otras vías alternativas para el procesamiento de antígenos que permiten a los péptidos procedentes de fuentes endógenas ser presentados por ellas (p. ej., autofagocitosis). Los complejos formados por un péptido y una molécula de MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos portadores del TCR apropiado y, por su parte, los complejos formados por un péptido y una molécula de MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado.

Los linfocitos T cooperadores CD4+ cumplen un importante papel en la organización de las funciones efectoras de las respuestas antitumorales de los linfocitos T y, por esta razón, la identificación de los epítomos derivados de antígenos asociados a tumor (AAT) que reconocen los linfocitos T CD4+ puede ser de gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Kobayashi, H., R. Omiya, M. Ruiz, E. Huarte, P. Sarobe, J. J. Lasarte, M. Herraiz, B. Sangro, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta, and E. Celis. Identification of an antigenic epitope for helper T lymphocytes from carcinoembryonic antigen. *Clin. Cancer Res.* 2002, 8:3219-3225, Gnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jäger, M. Matsuo, A. Selvakumar, N. K. Altorki, R. G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y. T. Chen, A. Knuth, and L. J. Old. Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, 100(15):8862-7). Los linfocitos TCD4+ pueden dar lugar a aumentos locales del IFN $\gamma$  (Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, Blankenstein T; A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells; *J Cancer Res*; 2003, 63(14):4095-4100).

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores sin el concurso de las células efectoras CTL (los linfocitos T CD8-positivos) a través de la inhibición de la angiogénesis mediante la secreción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Qin, Z. and T. Blankenstein. CD4+ T-cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity.* 2000, 12:677-686). Además, se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden contrarrestar la progresión tumoral mediante la inducción de respuestas de anticuerpos al reconocer péptidos de antígenos asociados a tumor presentados por moléculas HLA de clase II (Kennedy, R. C., M. H. Shearer, A. M. Watts, and R. K. Bright. CD4+ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen. *Cancer Res.* 2003, 63:1040-1045). A diferencia de lo que sucede con los péptidos asociados a tumor reconocidos por moléculas HLA de clase I, hasta la fecha el número descrito de ligandos de clase II derivados de antígenos asociados a tumor (AAT) es pequeño ([www.cancerimmunity.org](http://www.cancerimmunity.org), [www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).

Puesto que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II solo se da normalmente en las células inmunitarias (Mach, B., V. Steimle, E. Martínez-Soria, and W. Reith. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1996, 14:301-331), se creía imposible aislar péptidos de clase II directamente de los tumores primarios. Sin embargo, los inventores han logrado identificar con éxito cierto número de epítomos de MHC de clase II directamente de los tumores (EP 1642905, EP 1760088; Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4163-4170).

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC), como, por ejemplo, monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes oncológicos se ha descubierto con sorpresa que algunas células tumorales expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Müller M, Krämer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanović S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4163-4170).

Para que un péptido desencadene una respuesta inmunitaria celular, debe unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula de MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 10 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados ("anclaje") en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo, cada alelo del MHC tiene un «motivo de unión» que determina qué péptidos pueden unirse específicamente a la hendidura de unión (Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S. MHC ligands and peptide motifs, Landes Bioscience, USA, 1997).

En la reacción inmunitaria dependiente de MHC, los péptidos no sólo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas de MHC expresadas por las células tumorales, sino que también deben ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores de linfocitos T específicos (TCR).

Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc. Además, los antígenos asociados a tumor, por ejemplo, también pueden estar presentes únicamente en células tumorales, por ejemplo, en forma de productos de genes mutados. Otra clase importante de antígenos asociados a tumores son los antígenos específicos de tejido, como los antígenos «cáncer-testículo» (CT) que se expresan en diferentes tipos de tumores y en el tejido sano de los testículos.

Se han descubierto varios antígenos asociados a tumores. Además, se han invertido muchos esfuerzos en identificar nuevos antígenos asociados a tumores. Ciertos grupos de antígenos asociados a tumores, también denominados en la técnica como antígenos específicos de tumores, son específicos de tejido. Los ejemplos incluyen, sin ánimo de limitación, la tirosinasa en el caso del melanoma, el PSA y el PSMA en el del cáncer de próstata y translocaciones cromosómicas como bcr/abl en el linfoma. Sin embargo, muchos antígenos asociados a tumores identificados aparecen en múltiples tipos de tumores, y algunos, como las proteínas oncogénicas y/o los genes supresores de tumores (estos últimos genes son revisados por ejemplo para el cáncer renal en Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. J Urol. 2003 Dec; 170 (6Pt1):2163-72), que realmente causan el evento de transformación, están presentes en casi todos los tipos de tumores. Por ejemplo, proteínas celulares normales que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, como la p53 (un ejemplo de gen supresor de tumores), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones que ocasionan una regulación al alza de la expresión de estos productos génicos, lo que los convierte en oncogénicos (McCartey et al. Cancer Research, 1998, 15:58 2601-5; Disis et al. Ciba Found. Symp. 1994, 187:198-211). Estas proteínas mutantes también pueden ser la diana de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor en múltiples tipos de cáncer.

La inmunoterapia en pacientes con cáncer tiene por objeto activar específicamente células del sistema inmunitario, sobre todo los llamados linfocitos T citotóxicos (CTL, también llamados «células asesinas» o linfocitos T CD8-positivos), contra las células tumorales pero no contra el tejido sano. Las células tumorales difieren de las células sanas por la expresión de proteínas asociadas a tumor. Las moléculas HLA situadas en la superficie de la célula presentan partes del contenido celular al exterior, lo cual permite a los linfocitos T citotóxicos distinguir una célula sana de una tumoral. Esto se lleva a cabo descomponiendo todas las proteínas del interior de la célula en péptidos cortos que a continuación se ligan a moléculas HLA y se presentan en la superficie celular (Rammensee et al., 1993). Los péptidos que son presentados en las células tumorales, pero nada o muy poco en las células sanas del cuerpo, se denominan péptidos asociados a tumor (TUMAP).

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T citotóxicos como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, deben serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una célula tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación. En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido (péptido inmunogénico) derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones in vitro o in vivo.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerrequisito para la inducción de una respuesta de linfocitos T in vitro o in vivo es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia hacia ese epítomo en particular. Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los CTL CD8+, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los CTL CD8+ (moléculas de MHC de clase I) o por los CTL CD4-positivos (moléculas de MHC de clase II) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales. Por consiguiente uno de los fines de la presente invención consiste en proveer composiciones de péptidos que contengan péptidos de unión a complejos MHC de cualquiera de las clases.

Los primeros ensayos clínicos con péptidos asociados a tumores fueron iniciados a mediados de la década de 1990 por Boon y cooperadores, principalmente para la indicación de melanoma. Las mejores respuestas clínicas en los ensayos oscilaron entre el 10% y el 30%. En ningún ensayo clínico sobre una vacuna peptídica en monoterapia se

han descrito efectos adversos graves o autoinmunidad severa. Se han descrito formas leves de vitiligo en algunos pacientes que habían sido tratados con péptidos asociados a melanoma.

5 Sin embargo, la sensibilización de un tipo de CTL no suele bastar para erradicar todas las células tumorales. Los tumores mutan mucho y, por tanto, son capaces de responder rápidamente a los ataques de los CTL cambiando su patrón de proteínas para no ser reconocidos por estos. A fin de contrarrestar los mecanismos de evasión tumoral, en la vacunación se emplean diversos péptidos específicos. De este modo se puede desplegar un amplio ataque simultáneo contra el tumor por parte de varios clones de CTL a la vez. Así se puede reducir la posibilidad de que el tumor eluda la respuesta inmunitaria. Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente en un estudio clínico que trataba a pacientes con melanoma avanzado. Con pocas excepciones, los pacientes que presentaban al menos tres respuestas de linfocitos T distintas, manifestaron respuestas clínicas objetivas o enfermedad estable (Banchereau et al., 2001) así como un aumento de la supervivencia (comunicación personal de J. Banchereau), mientras que a la inmensa mayoría de los pacientes con menos de tres respuestas de los linfocitos T se les diagnosticó enfermedad en progresión.

15 En un estudio de los solicitantes se observaron efectos semejantes en pacientes aquejados por carcinoma de células renales que fueron tratados con una vacuna compuesta de 13 péptidos distintos (H. Singh-Jasuja, S. Walter, T. Weinschenk, A. Mayer, P. Y. Dietrich, M. Staehler, A. Stenzl, S. Stevanovic, H. Rammensee, J. Frisch; Correlation of T-cell response, clinical activity and regulatory T-cell levels in renal cell carcinoma patients treated with IMA901, a novel multi-peptide vaccine; Reunión de ASCO 2007 Póster n.º 3017; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Póster n.º 3017).

20 La tarea más importante en el desarrollo de una vacuna antitumoral no sólo consiste en identificar y caracterizar nuevos antígenos asociados a tumores y los epítomos inmunogénicos para los linfocitos T cooperadores derivados de los mismos, sino también en combinar diferentes epítomos para aumentar las probabilidades de obtener una respuesta contra más de un epítomo en cada paciente. Por consiguiente, uno de los objetos de la presente invención consiste en ofrecer combinaciones de secuencias de aminoácidos de péptidos que tengan la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (HLA de clase I). Otro objeto de la presente invención consiste en ofrecer una vacuna antitumoral eficaz que esté basada en una combinación de los péptidos.

25 En la presente invención, los inventores aislaron directamente de tumores de mamífero y después caracterizaron péptidos que se unen a moléculas HLA de clase I o II, es decir, muestras primarias procedentes principalmente de pacientes con glioblastoma, pero también muestras de tejido primario de cáncer colorrectal, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, melanoma maligno y cáncer de estómago.

30 La presente descripción proporciona péptidos que proceden de antígenos asociados con la oncogénesis, y que tienen la capacidad de unirse lo suficiente a moléculas de MHC (HLA) de clase II para desencadenar una respuesta inmunitaria por parte de los leucocitos humanos, especialmente de los linfocitos, especialmente de los linfocitos T, especialmente de los linfocitos T CD4-positivos, y especialmente de los linfocitos T CD4-positivos que median en las respuestas inmunitarias de tipo T<sub>H1</sub>.

35 La presente invención proporciona péptidos que proceden de antígenos asociados con la oncogénesis, y que tienen la capacidad de unirse lo suficiente a moléculas de MHC (HLA) de clase I para desencadenar una respuesta inmunitaria por parte de los leucocitos humanos, especialmente de los linfocitos, especialmente de los linfocitos T, especialmente de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, así como combinaciones de los dos que sean especialmente útiles para la vacunación de pacientes aquejados de cáncer.

40 De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve proporcionando una composición farmacéutica que comprende un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2, y un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 3, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender, además, como mínimo otro péptido adicional constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1 y las SEQ ID N.º 4 a SEQ ID N.º 12. Los péptidos también pueden tener enlaces no peptídicos.

45 Tal y como se describe en la presente memoria más adelante, se ha comprobado que, con la excepción de MET-005, todos los péptidos que forman la base de la presente invención son presentados por células portadoras de MHC de clase I. Así pues, estos péptidos concretos, así como otros péptidos que contengan la secuencia (péptidos derivados), desencadenan una respuesta de linfocitos T específicos, aunque la magnitud de esa respuesta puede variar según el péptido de que se trate y según el paciente. Las diferencias, entre otras razones, podrían deberse a mutaciones en los péptidos. La persona versada en la materia conoce bien los métodos aplicables para determinar la magnitud de la respuesta que desata un péptido concreto, en particular si consulta los ejemplos expuestos en la presente memoria y en la bibliografía correspondiente.

50 Los péptidos proceden de antígenos asociados a tumores, especialmente de antígenos asociados a tumores que intervienen en procesos como, por ejemplo, la proteólisis, angiogénesis, crecimiento celular, regulación del ciclo

celular, división celular, regulación de la transcripción, regulación de la traducción, invasión de tejidos, etc. La Tabla 3 expone los péptidos y la función de la proteína de la cual derivan.

Tabla 3: Péptidos (2 y 3 de conformidad con la presente invención) y función de la proteína original

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen	Función	Se une a MHC
1	CSP-001	TMLARLASA	CSPG4	Proteoglicano transmembrana implicado en la neovascularización	HLA-A*02
2	FABP7-001	LTFGDVVAV	FABP7	Proteína de unión a ácidos grasos específica del SNC	HLA-A*02
3	NLGN4X-001	NLDTLMTYV	NLGN4X	Molécula de adhesión celular	HLA-A*02
4	TNC-001	AMTQLLAGV	TNC	Proteína de matriz extracelular	HLA-A*02
5	NRCAM-001	GLWHHQTEV	NRCAM	Molécula de adhesión a células neuronales	HLA-A*02
6	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	IGF2BP3	Proteína de unión a ARNm	HLA-A*02
7	BCA-002	ALWAWPSEL	BCAN	Proteoglicano	HLA-A*02
8	MET-005	TFSYVDPVITSISPKYG	MET	Receptor de factor de crecimiento	TUMAP de HLA de clase I elongado

5

Proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4)

El CSPG4 (proteoglicano de sulfato de condroitina) representa un proteoglicano de sulfato de condroitina integrado en la membrana. Es conocido por ser un marcador superficial de progresión precoz del melanoma, implicado en la estimulación de la proliferación, la migración y la invasión de las células tumorales. El CSPG4 se expresa intensamente en >90% de las lesiones de melanoma humano. Aunque el CSPG4 no es estrictamente específico de tumor, las respuestas de los linfocitos T CD4+ reactivos a tumores en pacientes con melanoma y en individuos sanos reconocen el CSPG4<sub>693-709</sub> en células de melanoma que expresan el HLA-DR11 en ausencia de autoinmunidad (Erfurt et al., 2007).

La expresión del CSPG4 potencia la diseminación de las células mediada por integrinas, la fosforilación de FAK (cinasa de adhesión focal) y la activación de ERK1/2 (cinasa regulada por señal extracelular) (Yang et al., 2004). Asimismo, existen cada vez más indicios procedentes de datos in vitro de que el CSPG4 desempeña un importante papel en la angiogénesis tumoral. Así pues, en los tumores positivos para CSPG4 se ha observado una tasa de neovascularización y volúmenes vasculares notablemente elevados, y se ha comprobado que el CSPG4 secuestra la angiostatina, cosa que normalmente inhibe la proliferación de las células endoteliales y la angiogénesis. Los vasos inmaduros también contienen pericitos positivos para CSPG4, lo cual apunta a la intervención de esta población celular en la modulación de la proliferación de las células endoteliales por medio del bloqueo de los efectos inhibitorios de la angiostatina durante el desarrollo de los vasos (Chekenya et al., 2002b).

La expresión de CSPG4 también ha sido descrita en algunos tejidos normales aparte de en los pericitos activados en las células endoteliales, condrocitos, células musculares lisas, ciertos queratinocitos basales de la epidermis, así como en células del folículo piloso (Campoli et al., 2004).

En el curso de la angiogénesis y como respuesta a patologías del SNC, las células de alta motilidad que expresan el CSPG4 sufren rápidos cambios morfológicos y son reclutadas en puntos donde está teniendo lugar crecimiento y reparación vascular. El CSPG4 se sobreexpresa tanto en las células tumorales como en los pericitos de los vasos sanguíneos de tumores cerebrales malignos (Chekenya and Pilkington, 2002). Con la implantación de células procedentes de una línea celular humana de glioma positiva para CSPG4 en cerebros de ratas atímicas inmunodeficientes se pudo demostrar que estos tumores presentan una densidad microvascular superior a la de las ratas control, lo cual implica que la expresión del CSPG4 regula tanto la función como la estructura de la vasculatura

tumoral derivada del hospedador (Brekke et al., 2006). En un experimento de xenoinjerto consistente en implantar material biopsico de GBM a ratas atímicas, el CSPG4 se identificó como asociado principalmente a los vasos sanguíneos tanto en los pericitos como en los componentes de la membrana basal de la vasculatura tumoral y su expresión también estuvo asociada con zonas de elevada proliferación celular (Chekenya et al., 2002a). Además, la expresión del CSPG4 corrió paralela a la progresión del tumor en un modelo de implantación de glioma (Wiranowska et al., 2006). La progresión maligna se mantiene por la intercomunicación entre el tumor y su estroma, por la cual el estroma activado nutre a las células neoplásicas proliferativas e invasivas, aportando nueva vasculatura, componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento estimuladores. En ese contexto, elCSPG4 desempeña un papel importante en la activación del tumor-estroma a través de alteraciones en la adhesión, migración y proliferación celulares y en la morfogénesis vascular (Chekenya and Immervoll, 2007).

El CSPG4 se expresa diferencialmente en los gliomas humanos, con mayor expresión en los gliomas de alto grado que en los de bajo (Chekenya et al., 1999). La elevada expresión del CSPG4 aparece correlacionada con la multiresistencia farmacológica mediada por el aumento de la activación de la vía de señalización de la  $\alpha 3\beta 1$ -integrina/PI3K y sus dianas ulteriores, que promueve la supervivencia de la célula (Chekenya et al., 2008).

15 Proteína de unión a ácidos grasos 7, cerebro (IMA-FABP7-001)

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) son proteínas citosólicas de 14-15 kDa, que supuestamente intervienen en la captación, transporte y orientación de los ácidos grasos (AG). Se cree que aumentan la solubilidad de los AG en el citoplasma durante su transporte entre los compartimentos con membrana y que transportan los AG hasta sus destinos nucleares (Glatz et al., 2002). Las FABP podrían modular la concentración de AG y de este modo influir en varias funciones celulares como la actividad enzimática, la expresión génica y el crecimiento y diferenciación celular (Glatz and Storch, 2001).

El tejido nervioso alberga cuatro de los nueve tipos de FABP conocidos, con una distribución espacio-temporal característica (Veerkamp and Zimmerman, 2001). La FABP7 se expresa mucho en las células gliales radiales en todo el sistema nervioso central en desarrollo, pero después disminuye gradualmente en el adulto (Feng and Heintz, 1995; Shimizu et al., 1997). Es necesaria para la diferenciación de la glía inducida por las neuronas y la subsiguiente migración de las neuronas a lo largo de las prolongaciones gliales, pero no ejerce efecto alguno en la proliferación y la adhesión celular (Feng et al., 1994; Kurtz et al., 1994). En las células de Schwann la expresión de FABP7 depende de la vía de señalización del EGFR independiente de Ras, y regula las interacciones entre dichas células y los axones en los nervios periféricos normales y en los tumores de nervios periféricos (Miller et al., 2003).

El ARNm de la FABP7 se expresa en tejidos de origen neuroepitelial, así como en gliomas (grados III y IV de la OMS). El gen se ha localizado en la banda cromosómica 6q22-23, región que también acoge el protooncogén c-myc y que con frecuencia sufre pérdida de heterocigosidad en el glioma. El análisis de estirpes celulares de glioma ha demostrado que la FABP7 se coexpresa a menudo con la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), lo cual sugiere que la célula de origen del glioma maligno podría ser una célula precursora de astrocitos que es capaz de expresar ambas proteínas en condiciones normales o como resultado de la formación de un tumor (Godbout et al., 1998). La proteína FABP7 presenta una expresión moderada o intensa en el núcleo y en el citoplasma en el marco del GBM. Las células de glioma transfectadas con FABP7 presentan una migración cinco veces mayor que las células control. Así pues, la supervivencia total más breve asociada con la sobreexpresión de FABP7, especialmente en el GBM, podría deberse al aumento de la migración y la invasión de las células tumorales en el parénquima cerebral circundante (Liang et al., 2005). Otros análisis de la distribución de FABP7 en tumores de astrocitoma indican la presencia de niveles elevados de esta proteína en regiones infiltrantes de los tumores, lo cual apunta a una importante función de la FABP7 en la infiltración de las células malignas en los tejidos cerebrales adyacentes (Mita et al., 2007). La FABP7 muestra niveles variables de expresión y de localización intracelular en los tejidos gliales y en todos los grados de astrocitoma. No obstante, sobre todo en lo relativo a su localización nuclear, la FABP7 parece estar asociada con el fenotipo infiltrante de las células de glioma y las vías del EGFR, puesto que se detecta su translocación nuclear tras la activación del EGFR y está asociada con un mal pronóstico en el GBM EGFR-positivo. Asimismo, en el astrocitoma de grado I no se observa inmunorreactividad nuclear a la FABP7 (Liang et al., 2006; Kaloshi et al., 2007).

Neuroligina 4, ligada al cromosoma X (IMA-NLGN4X-001)

La neuroligina 4, ligada al cromosoma X pertenece a la familia de proteínas de adhesión celular que parecen desempeñar un papel en la maduración y la función de las sinapsis neuronales. Los miembros de la familia de la neuroligina presentan una organización estructural afín, con un péptido señal N-terminal, un dominio similar a la esterasa con dos sitios de corte y empalme alternativo, una pequeña región de conexión con baja identidad de secuencia situada frente al dominio transmembrana, y una corta parte citosólica con un extremo C-terminal muy conservado. En el corazón se han hallado concentraciones relativamente altas del ARNm de la neuroligina 4. En el hígado, el músculo esquelético y el páncreas se han detectado niveles de expresión más bajos, en tanto que en el cerebro, la placenta, el pulmón y el riñón apenas se detecta ARNm de dicha proteína (Bolliger et al., 2001).

Las mutaciones del gen NLGN4 ligado a X son una causa potencial de trastornos del espectro autista y se han descrito mutaciones en varios pacientes con autismo, síndrome de Asperger y retraso mental (Jamain et al., 2003; Laumonier et al., 2004; Lawson-Yuen et al., 2008).

5 Se han descrito algunas asociaciones del NLGN4X con el cáncer: En tumores estromales gastrointestinales se ha observado sobreexpresión del NLGN4X en pacientes pediátricos y adultos jóvenes respecto a los adultos de edad más avanzada (Prakash et al., 2005).

#### Tenascina C (hexabraquión) (IMA-TNC-001)

10 La matriz extracelular que rodea las células tumorales es distinta de la matriz extracelular de los tejidos normales. La tenascina C (TNC) es una proteína de la matriz extracelular que experimenta una regulación al alza muy acusada en procesos estrechamente vinculados con la actividad migratoria como son el desarrollo embrionario (Bartsch et al., 1992), la cicatrización de heridas (Mackie et al., 1988) y los procesos neoplásicos (Chiquet-Ehrismann, 1993; Chiquet-Ehrismann and Chiquet, 2003). Además, la TNC aparece sobreexpresada en vasos tumorales que muestran un elevado índice proliferativo, lo cual indica su implicación en la angiogénesis neoplásica (Kim et al., 2000). En el tejido humano normal la expresión de la TNC solo se detecta en raras ocasiones, mientras que en los gliomas presenta elevados niveles de expresión (Bourdon et al., 1983). La hipoxia puede estimular la expresión de la TNC (Lal et al., 2001), bien a través del TGFbeta1, lo cual proporciona un mecanismo para la invasión del parénquima sano por los gliomas de alto grado (Hau et al., 2006), bien a través de la gastrina, que modula significativamente la migración de las células de GBM humanas (Kucharczak et al., 2001). La TNC regula a la baja la tropomiosina1 y por ello desestabiliza las fibras de estrés de actina. Además, causa la regulación a la baja del inhibidor de la ruta de Wnt Dickkopf1. Dado que el descenso de la expresión de la tropomiosina1 y el aumento de la vía de señalización de las Wnt están vinculados estrechamente con la transformación y la oncogénesis, la TNC modula específicamente estas vías de señalización potenciando la proliferación de las células de glioma (Ruiz et al., 2004).

25 En los tejidos de GBM se observa tinción perivascular de TNC alrededor de los vasos sanguíneos que irrigan el tumor, mientras que ésta es menos frecuente en los gliomas de grado II y III de la OMS, lo cual indica que la intensidad de la tinción de TNC está correlacionada con el grado del tumor y que cuanto más intensa es, peor es el pronóstico (Herold-Mende et al., 2002). La TNC también contribuye a generar un nicho de citoblastos dentro de la zona subventricular (ZSV), interviniendo en la organización de la señalización de los factores de crecimiento para acelerar el desarrollo de los neurocitoblastos. El efecto predominante de la TNC sobre las células situadas en la ZSV consiste en la regulación de la progresión del desarrollo (Garcion et al., 2004). La TNC es el inductor más potente de la migración dirigida de los neurocitoblastos humanos. Así, la matriz extracelular producida por el tumor ofrece un entorno permisivo para el tropismo de los neurocitoblastos en células tumorales diseminadas (Ziu et al., 2006).

#### Molécula de adhesión celular neuronal (IMA-NRCAM-001)

35 La NRCAM (molécula de adhesión celular neuronal) es una molécula de adhesión celular transmembrana de neuronas que contiene varios dominios de tipo C2 similares a inmunoglobulina y dominios de fibronectina de tipo III. Interviene en la guía, desarrollo de ramificaciones y la fasciculación de las neuronas (Grumet et al., 1991; Morales et al., 1993; Stoeckli and Landmesser, 1995; Perrin et al., 2001; Sakurai et al., 2001) mediante la formación de interacciones homofílicas y heterofílicas con otras IgCAM (Volkmer et al., 1996; Sakurai et al., 1997; Zacharias et al., 1999). La NRCAM unida a anquirina (Davis and Bennett, 1994) está regulada al alza en las células endoteliales que forman tubos, lo que sugiere su posible intervención en la formación de los tubos y en la angiogénesis (Aitkenhead et al., 2002).

40 La NRCAM es un gen diana de la  $\beta$ -catenina y del complejo de plakoglobina-LEF/TCF que contribuye a la oncogénesis (Conacci-Sorrell et al., 2002). El dominio exterior de NRCAM se puede desprender de la superficie celular por actividades similares a las de las metaloproteasas. Este dominio desprendido es capaz de activar varias vías de señalización, potenciar la motilidad celular y desatar la oncogénesis en ratones (Conacci-Sorrell et al., 2005).

45 La NRCAM aparece regulada al alza en astrocitomas anaplásicos y en tejidos de GBM en comparación con el cerebro normal, y las concentraciones elevadas están correlacionadas con el comportamiento invasivo (Sehgal et al., 1998). El ARN antisentido dirigido contra la NRCAM reduce la capacidad oncogénica de las células de GBM humanas (Sehgal et al., 1999).

#### Proteína de unión 3 al ARNm del factor de crecimiento insulinoide 2 (IMA-IGF2BP3-001)

50 La IGF2BP3 pertenece a la familia de las proteínas de unión al ARNm del factor de crecimiento insulinoide-II, implicada en la localización, recambio y control traduccional del ARNm. La proteína contiene varios dominios KH (homólogo con K), que son importantes para la unión al ARN, y se sabe que intervienen en la síntesis y el metabolismo del ARN. La expresión ocurre principalmente en el desarrollo embrionario y ha sido descrita en algunos tumores. Por ello, la IGF2BP3 se considera una proteína oncofetal (Liao et al., 2005). La presencia de altas concentraciones del transcrito de IGF2BP3 en numerosos tejidos tumorales en comparación con tejidos de control indica que dicha proteína podría desempeñar una función en las células transformadas en proliferación. Esta hipótesis está avalada por el hallazgo de que el único tejido humano no canceroso que expresa el transcrito de la IGF2BP3 es la placenta, tejido caracterizado por el crecimiento y la proliferación celular (Mueller-Pillasch et al.,

1997).

La bibliografía científica no contiene información específica sobre la expresión de la IGF2BP3 en el GBM, pero se ha descrito su sobreexpresión en otros tipos de cáncer.

5 Por ejemplo, la IGF2BP3 se expresa en muestras de carcinoma renal de células claras y su expresión está asociada con un estadio y un grado avanzado de los tumores primarios. Además, su expresión positiva está asociada con un aumento de entre 5 y 10 veces en el riesgo de metástasis a distancia y con un aumento del riesgo de muerte por carcinoma renal del 42% al 50% (Hoffmann et al., 2008; Jiang et al., 2006; Jiang et al., 2008). La expresión de la IGF2BP3 también se ha detectado en el melanoma en comparación con nevus benignos, en los que no se detectó expresión aún en presencia de rasgos displásicos (Pryor et al., 2008). En los pacientes aquejados de carcinoma epidermoide de esófago se pueden observar linfocitos T específicos para un epítipo peptídico restringido al HLA-A\*2402 derivado de la IGF2BP3 entre los linfocitos infiltrados en el tumor (TIL), los linfocitos de los ganglios linfáticos regionales y los linfocitos de sangre periférica en el 40% de los casos (Mizukami et al., 2008).

15 La IGF2BP3 también presenta un elevado nivel de expresión en los carcinomas pancreáticos. En dos estudios >90% de las muestras de tejido tumoral pancreático presentaron expresión de la IGF2BP3 revelada por inmunotinción, mientras que en los tejidos pancreáticos no neoplásicos dieron negativo. Asimismo, la expresión aumentó progresivamente con el estadio tumoral (Yantiss et al., 2005; Yantiss et al., 2008).

20 También se ha hallado una elevación significativa de la expresión de la IGF2BP3 en tumores uroteliales de alto grado, si bien en general no se expresa en el urotelio benigno ni en los tumores uroteliales de bajo grado. Asimismo, los pacientes con tumores IGF2BP3-positivos presentan unas tasas de supervivencia sin progresión y de supervivencia sin enfermedad mucho menores que los afectados por tumores IGF2BP3-negativos (Li et al., 2008; Sitnikova et al., 2008; Zheng et al., 2008).

#### BCAN - Brevicán (IMA-BCA-002)

25 El brevicán (BCAN) es un miembro específico del cerebro de la familia de proteoglicanos de sulfato de condroitina del lecticán. Se han descrito dos isoformas de BCAN: una isoforma entera que se segrega en la matriz extracelular y otra más corta con una secuencia que predice un anclaje de glucofosfatidilinositol (GPI). La isoforma segregada se expresa mucho desde el nacimiento hasta los 8 años de edad y queda regulada a la baja alrededor de los 20 años, manteniéndose en niveles bajos en la corteza adulta normal. La isoforma con GPI se expresa en niveles uniformemente bajos a lo largo del desarrollo (Gary et al., 2000). El BCAN pertenece a una familia de proteoglicanos que suelen ser descritos como moléculas de barrera que impiden la motilidad de las células y de las neuritas en el sistema nervioso adulto (Viapiano and Matthews, 2006). En condiciones in vivo, el BCAN se expresa alrededor de los límites del torrente migratorio rostral (Jaworski and Fager, 2000) y es un componente importante regulado al alza de las cicatrices gliales que aparecen a raíz de lesiones neurales (Jaworski et al., 1999).

35 El BCAN muestra una espectacular regulación al alza en los gliomas, pues la expresión se multiplica aproximadamente por siete respecto a los niveles normales (Gary et al., 2000; Gary et al., 1998). La expresión es detectable en los márgenes invasivos de tumores inducidos experimentalmente (Glass et al., 2005) y está elevada en tumores con perfiles infiltrativos elevados (Phillips et al., 2006). Desde el punto de vista clínico, la regulación al alza del BCAN conlleva una menor supervivencia en los pacientes con gliomas de alto grado (Liang et al., 2005). Además de la regulación al alza del BCAN en el glioma, es posible que el procesamiento proteolítico de la proteína entera también contribuya a la invasión (Gary et al., 1998; Nutt et al., 2001). La escisión del BCAN por metaloproteasas de la familia ADAMTS es un paso necesario para que tenga lugar su efecto favorecedor de la invasividad en el glioma. Generando una forma mutante específica de sitio que es resistente a la escisión por ADAMTS se ha demostrado que este BCAN «indegradable» es capaz de potenciar la invasión de las células in vitro y la progresión tumoral in vivo en el marco del glioma (Zhang et al., 1998; Viapiano et al., 2008). A escala molecular, el BCAN promueve la activación del EGFR, aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular y promueve la secreción de fibronectina (Hu et al., 2008).

El ARNm del BCAN no se ha detectado en muestras de corteza adulta humana procedentes de fallecidos sin complicaciones neurológicas. En marcado contraste, su ARNm sí se ha detectado en las 27 muestras quirúrgicas de glioma humano que componían una serie, lo cual sitúa al BCAN como un posible marcador único y selectivo del glioma (Jaworski et al., 1996).

50 La regulación al alza del BCAN en el glioma no sólo conduce en general al aumento de la expresión sino también a la expresión de isoformas glucosiladas diferencialmente específica del glioma. A este respecto, B/b<sub>Δg</sub> es un producto entero del ARNm del BCAN que surge como resultado de la glucosilación incompleta o reducida de la proteína central. B/b<sub>Δg</sub> se expresa muy poco durante la segunda mitad del desarrollo prenatal y los primeros días del desarrollo postnatal, desaparece al primer año de vida y no se encuentra en el cerebro normal adulto, pero sí en muestras de glioma de alto grado. Un estudio demostró que B/b<sub>Δg</sub> estaba presente en todas las muestras de glioma de alto grado (grados 3 y 4) y que representaba la mitad de la sobreexpresión total por encima de los niveles del control del BCAN no escindido. Las muestras negativas para B/b<sub>Δg</sub> correspondían a los pacientes diagnosticados con tumores de bajo grado (Viapiano et al., 2005). Esta expresión específica del glioma de alto grado podría

representar la reactivación de los programas tempranos de desarrollo, un mecanismo que ha sido implicado en la progresión del glioma (Seyfried, 2001). El IMA-BCA-002 contiene en su secuencia un posible sitio de glucosilación. Se ha demostrado que es muy inmunógeno en comparación con otro péptido derivado del BCAN (IMA-BCA-001) que carece de sitio de glucosilación. Es más, se ha descrito la sobreexpresión selectiva del BCAN en un tipo de citoblastos cancerosos del GBM que muestran la mayor pluripotencia y oncogenicidad in vivo conocidas (Gunther et al., 2008).

Protooncogén Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) (IMA-MET-005)

El protooncogén MET codifica c-Met, un receptor transmembrana con actividad tirosina-cinasa capaz de modular la proliferación, diferenciación, motilidad, adhesión e invasión celular. Es activado por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Giordano et al., 1989; Trusolino and Comoglio, 2002).

La vía de señalización de c-Met interviene en la regeneración orgánica –tal y como se demuestra en el caso del hígado y del riñón, embriogénesis, hematopoyesis, desarrollo muscular, así como en la regulación de la migración y la adhesión de los linfocitos B y los monocitos normalmente activados (Naldini et al., 1991; Mizuno et al., 1993; Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Zarnegar and Michalopoulos, 1995; van der Voort et al., 1997; Beilmann et al., 2000).

Estudios realizados con diversos tipos de tumores han demostrado la existencia de varios mecanismos de activación de c-Met, incluido el bucle autocrino HGF/c-Met, mutaciones puntuales activadoras, proteína de fusión TPR-Met y la falta de escisión de c-MET para formar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (Park et al., 1986; Mondino et al., 1991; Ebert et al., 1994; Schmidt et al., 1997; Olivero et al., 1999; Park et al., 1999; Di Renzo et al., 2000). La activación constitutiva de c-Met a través de la fosforilación también ha sido identificada como un importante mecanismo de oncogénesis en el carcinoma renal de células claras (Nakaigawa et al., 2006).

Asimismo, numerosos estudios señalan la implicación de la sobreexpresión de c-Met en la transformación maligna y la invasividad de las células cancerosas. c-Met media en las actividades multifuncionales y potencialmente oncógenas del HGF (Bottaro et al., 1991; Rubin et al., 1993; Zarnegar and Michalopoulos, 1995). Con la unión al receptor, el HGF induce la autofosforilación de c-Met y activa la señalización descendente que abarca las vías de ras, fosfatidilinositol-3'-cinasa, fosfolipasa C, y la relacionada con la proteína-cinasa activada por mitógeno (Naldini et al., 1991; Ponzetto et al., 1993; Montesano et al., 1998; Furge et al., 2000; Dong et al., 2001; Furge et al., 2001).

El gen c-Met se expresa predominantemente en células epiteliales y está sobreexpresado en varios tejidos y estirpes celulares malignas (Di Renzo et al., 1995; Ferracini et al., 1995; Tuck et al., 1996; Koochekpour et al., 1997; Fischer et al., 1998; Ramirez et al., 2000; Li et al., 2001; Maulik et al., 2002; Qian et al., 2002).

La sobreexpresión de c-Met, con frecuencia inducida por la hipoxia tumoral, conduce a la activación constitutiva del receptor y está correlacionada con un pronóstico malo. El silenciamiento del gen c-MET endógeno desbarata la ejecución de todo el programa de crecimiento invasivo in vitro, detiene el crecimiento tumoral y reduce la generación de metástasis experimentales in vivo (Corso et al., 2008).

La sobreexpresión de c-MET ha sido descrita en el GBM (Tso et al., 2006). c-Met está correlacionado con el grado histológico del tumor, lo cual sugiere que la creación del bucle autocrino HGF/c-MET tiene lugar en paralelo con la progresión de los tumores cerebrales astrocíticos. Así pues, se cree que el HGF genera una potente actividad inductora de migración/invasión en las células GBM portadoras del receptor c-Met (Moriyama et al., 1999). El promotor de c-Met contiene puntos de unión para el factor inducible por hipoxia-1, por lo que se ha demostrado que la hipoxia activa el promotor de c-Met y regula al alza su expresión. Se cree que aproximadamente la mitad de los GBM humanos responden a la hipoxia induciendo el c-Met, lo que potencia el efecto estimulador del HGF sobre la migración de las células tumorales (Eckerich et al., 2007) y puede atraer a los neurocitoblastos hacia el tumor (Kendall et al., 2008). El c-Met y el EGFR a menudo se expresan conjuntamente en el astrocitoma (Reznik et al., 2008). Se ha demostrado que el sitio de fosforilación activador del receptor c-Met es muy sensible a las concentraciones de EGFRvIII, lo que hace pensar en la existencia de interconexión entre el EGFRvIII y el receptor c-Met en el glioblastoma (Huang et al., 2007a; Huang et al., 2007b). Se ha sugerido a MET como un marcador de neurocitoblastos cancerosos en el GBM (Nam et al., 2008). Otro estudio demostró que MET estaba sobreexpresado de manera selectiva en un subtipo concreto de citoblastos cancerosos derivados del GBM (Gunther et al., 2008).

Los resultados intermedios de un estudio de fase II en pacientes con GBM recurrente que recibían AMG102, un anticuerpo neutralizante humano dirigido contra el HGF, sugieren que en algunos pacientes la enfermedad podría depender de la vía de señalización de c-MET:HGF; de los 18 pacientes tratados, uno presentó respuesta parcial, otro respuesta pequeña y dos estabilización de la enfermedad (Reardon et al., 2008).

Un hecho interesante son los indicios de interacción entre la señalización de MET y la vía de las Wnt/beta-catenina que aparece con frecuencia regulada al alza en el cáncer de colon. MET puede ser activado por la prostaglandina E2 (PGE2) y el c-Met activado por la PGE2 se asocia con la  $\beta$ -catenina y aumenta la fosforilación de sus tirosinas, estimulando con ello la invasividad de las células de cáncer de colon (Pai et al., 2003). En fecha reciente se ha descrito la activación mutua de MET y de la beta-catenina, que da como resultado un bucle de retroalimentación positiva entre estos dos componentes clave de la oncogénesis colorrectal (Rasola et al., 2007).

5 El nivel de expresión del ARNm de c-Met en tumores primarios de cáncer colorrectal (n=36) es un importante indicador predictivo de la invasión precoz y las metástasis regionales, por lo que está relacionado directamente con el estadio del cáncer de colon (Takeuchi et al., 2003). Otro análisis de la expresión de c-Met en 130 muestras de cáncer colorrectal demostró sobreexpresión (T/N > 2,0) en el 69% de los tumores primarios y niveles significativamente mayores de c-Met en el cáncer colorrectal con invasión de vasos sanguíneos (P = 0,04), así como en estadios avanzados (P = 0,04), lo cual corrobora el papel de c-Met en la progresión y la metástasis del cáncer colorrectal humano (Zeng et al., 2004). En otro estudio con 60 adenocarcinomas de colon el 69% de ellos manifestó una elevación del ARNm de c-Met más de dos veces mayor y el 48% más de diez veces mayor en comparación con la mucosa normal adyacente (Kammula et al., 2007). Así pues, el aumento de la señalización de c-Met es frecuente en los primeros estadios del cáncer colorrectal, aunque la expresión más elevada tenga lugar en las fases avanzadas y metastásicas.

Tabla 4: Otros péptidos inmunogénicos útiles en una composición de la invención

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen	Función	Se une a MHC
9	PTP-003	AIIDGVESV	PTPRZ1		HLA-A*02
10	PTP-005	KVFAGIPTV	PTPRZ1		HLA-A*02
11	CHI-001	SLWAGVVVL	CHI3L2		HLA-A*02
12	BIR-002	TLGEFLKDRERAKN	BIRC5		HLA-DR and HLA-A*02
13	(HBV-001)	FLPSDFFPSV		péptido de control	

Proteína-tirosina-fosfatasa, tipo receptor, Zeta1 (PTPRZ1, PTP-ξ)

15 El PTPRZ1 es un miembro de la familia de las proteína-tirosina-fosfatasas de tipo receptor y codifica una proteína de membrana de un solo paso de tipo 1 dotada de dos dominios citoplasmáticos de tirosina-fosfatasa, un dominio alfa-anhidrasa carbónica y un dominio de fibronectina de tipo III. La expresión de este gen está inducida en células de cáncer gástrico (Wu et al., 2006), cáncer de mama (Perez-Pinera et al., 2007), en los oligodendrocitos remielinizantes de las lesiones de la esclerosis múltiple (Harroch et al., 2002), así como en células embrionarias de riñón humano en condiciones hipóxicas (Wang et al., 2005).

Tanto la proteína como el transcrito aparecen sobreexpresados en las células de glioblastoma, promoviendo su migración haptotáctica (Lu et al., 2005), así como en la amplificación del ADN genómico en el glioblastoma (Mulholland et al., 2006).

Quitinasa 3-Like 2 (CHI3L2)

25 El CHI3L2 se identificó originalmente en condrocitos y está regulado al alza, p. ej., en la artrosis (Steck et al., 2002). Aunque la proteína no está bien caracterizada todavía, lo más probable es que se segregue en el espacio extracelular. Se ha descrito frecuentemente como un antígeno diana en la artritis reumatoide. La inducción antiangiogénica en condiciones experimentales de una línea celular de glioma humano mediante la transfección con ARNpi (VEGF-A) causó la regulación al alza del CHI3L2.

30 Survivina (BIRC5)

La expresión de BIRC5 (survivina), miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), es elevada en tejidos fetales y en diversos tipos de cáncer humanos. La survivina parece ser capaz de regular tanto la proliferación celular como la muerte celular apoptótica. Y especialmente en el glioblastoma se detectan niveles sumamente elevados de expresión de la survivina (Angileri et al., 2008). Se ha planteado que la sobreexpresión de la survivina en los gliomas cerebrales podría desempeñar un papel importante en la proliferación maligna, los mecanismos anti-apoptóticos y la angiogénesis (Zhen et al., 2005; Liu et al., 2006). Especialmente en el caso del glioblastoma, pero también en el de otras entidades tumorales, la expresión de la survivina apareció relacionada significativamente con el grado de malignidad (con la mayor expresión de survivina en el glioblastoma) y con tiempos de supervivencia global más cortos que los pacientes con tumores negativos para la survivina (Kajiwara et al., 2003; Saito et al., 2007; Uematsu et al., 2005; Mellai et al., 2008; Grunda et al., 2006; Xie et al., 2006; Sasaki et al., 2002; Chakravarti et al., 2002).

Antígeno central de la hepatitis B

Los péptidos inmunógenos de la proteína central HBC del virus de la hepatitis B (VHB) se conocen bien (Bertoletti et

al., 1993; Livingston et al., 1997). En vacunas antitumorales basadas en la presente invención se puede incluir un péptido de 10 aminoácidos de la HBc como control positivo a fin de verificar la inmunocompetencia de los pacientes y el éxito de las inmunizaciones.

5 En una forma de realización preferida de la invención la composición farmacéutica comprende al menos dos péptidos que contienen una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N. ° 2 y una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N. ° 3.

En una forma de realización aún más preferida la composición farmacéutica comprende al menos un péptido más que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo consistente en la SEQ ID N. ° 1, y las SEQ ID N. ° 4 a SEQ ID N. ° 12, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Otras formas de realización preferidas de la invención comprenden al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 péptidos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede contener, además, otros péptidos adicionales y/o excipientes para aumentar la eficacia, tal y como se explicará más adelante.

15 Por «variante de la secuencia de aminoácidos» los inventores quieren decir que las cadenas laterales de, por ejemplo, uno o dos de los residuos de aminoácidos están alteradas (por ejemplo sustituyéndolas por la cadena lateral de otro residuo de aminoácido natural o alguna otra cadena lateral) de modo que el péptido sigue siendo capaz de unirse a una molécula HLA básicamente de la misma manera que un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos dada. Por ejemplo, se puede modificar un péptido de modo que al menos conserve, si no mejora, la capacidad de interactuar y de unirse a una molécula MHC adecuada, como HLA-A o DR, y que como mínimo conserve, si no mejora, la capacidad para generar CTL activados que reconozcan y destruyan las células que expresen un polipéptido que contenga una secuencia de aminoácidos tal y como se define en los aspectos de la invención. Como se puede deducir a partir de bases de datos, ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA-A normalmente son residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión de la hendidura de unión del HLA.

25 Aquellos residuos de aminoácidos que no son esenciales para interactuar con el receptor del linfocito T pueden ser modificados sustituyéndolos por otros aminoácidos cuya incorporación no afecte sustancialmente a la reactividad de los linfocitos T y no suprima la unión al MHC pertinente. Así pues, aparte de la condición indicada, el péptido descrito puede ser cualquier péptido (en cuyo término los inventores incluyen oligopéptidos o polipéptidos), que incluya las secuencias de aminoácidos o una porción o una variante de las mismas tal y como se indican.

30 Es sabido, además, que los péptidos presentados por el MHC de clase II están compuestos de una «secuencia central» dotada de un cierto motivo de aminoácidos específico del HLA y, opcionalmente, de extensiones N- y/o C-terminales que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, que se consideran irrelevantes para la interacción del péptido con el linfocito T). Las extensiones N- y/o C-terminales pueden, por ejemplo, tener entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, respectivamente. Estos péptidos se pueden utilizar directamente para cargar las moléculas MHC de clase II o bien la secuencia se puede clonar en vectores de conformidad con la descripción ofrecida más adelante en la presente memoria. Dado que estos péptidos constituyen el producto final del procesamiento de péptidos más grandes en el interior de la célula, también pueden utilizarse péptidos más largos. Los péptidos de la invención pueden tener cualquier tamaño, pero normalmente tienen una masa molecular menor de 100. 000, preferiblemente menos de 50. 000, más preferiblemente menos de 10. 000, más preferiblemente menos de 5. 000, más preferiblemente menos de 2. 500 y normalmente entre 1000 y 2000 aproximadamente. En términos del número de residuos de aminoácidos, los péptidos de la invención pueden tener menos de 1000 residuos, preferiblemente menos de 500 residuos, más preferiblemente menos de 100 residuos.

En consecuencia, las variantes que estimulan la reacción cruzada de los linfocitos T con un péptido de la invención son a menudo variantes de longitud.

45 Si un péptido de más de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos se utiliza directamente para unirse a una molécula MHC de clase II, es preferible que los residuos que flanquean la región central de unión a HLA sean residuos que no afecten sustancialmente a la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula MHC de clase II o presentar el péptido al CTL. No obstante, como se ha indicado arriba, se apreciará que es posible usar péptidos más grandes, especialmente los codificados por un polipéptido, ya que estos péptidos más grandes pueden ser fragmentados por células presentadoras de antígeno adecuadas.

50 También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 10 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítomo real. De forma similar a los epítomos de MHC de clase II, es preferible que los residuos flanqueantes de los péptidos precursores alargados situados por delante y/o por detrás de los extremos N-terminal y C-terminal del epítomo real, no alteren sustancialmente la presentación del péptido al CTL ni enmascaren los sitios de escisión proteolítica necesarios para obtener el epítomo real a partir del procesamiento del péptido elongado.

Por supuesto, el péptido según la presente invención tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC humano

de clase I. La unión de un péptido a un complejo de MHC puede ser analizada mediante métodos conocidos en la técnica como, por ejemplo, los descritos más adelante en los ejemplos ofrecidos en la presente invención o los descritos en la bibliografía para diferentes alelos de MHC de clase II (p. ej., Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R; Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides; J Immunol. 1994; 153(4):1665-1673; Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A; Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands; J Immunol. 1994; 153(3):1141-1149; Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP; Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11; J Exp Med. 1999; 189(5): 871-876; Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F; Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association; J Exp Med. 1995 181(5):1847-1855; Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE; A europium fluoro-immunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins; J Immunol Methods. 1993;163(2): 209-216; Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM; Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice; Int Immunol. 1998 (12):1765-1776).

Otros segmentos de aminoácidos localizados en las regiones N- y/o C-terminal que no forman necesariamente parte del péptido que actúa como epítipo real para las moléculas de MHC podrían, no obstante, ser importantes para conseguir introducir con eficiencia en las células el péptido conforme a la presente invención. Se describe el péptido de la presente invención como parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo «li») como la derivada del NCBI, número de acceso de GenBank X00497 (Strubin, M., Mach, B. and Long, E. O. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity EMBO J. 3 (4), 869-872 (1984)).

Además, el péptido puede ser modificado aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas de MHC con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria más potente. Los métodos para conseguir esa optimización de una secuencia peptídica son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces peptídicos inversos o enlaces no peptídicos.

Así pues, de acuerdo con otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica, en la que al menos un péptido incluye enlaces no peptídicos.

En un enlace peptídico inverso los residuos de aminoácido no están unidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino que el enlace peptídico está invertido. Estos peptidomiméticos retro-inversos pueden sintetizarse con métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos por Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237, y que se incorporan en la presente memoria como referencia. Esta estrategia implica la síntesis de pseudopéptidos que contengan cambios en la estructura principal, pero no en la orientación de las cadenas laterales. Meziere et al. (1997) demuestran que estos pseudopéptidos resultan útiles para las respuestas de MHC y de los linfocitos T cooperadores. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis.

Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH<sub>2</sub>-NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-, -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>SO-. La patente de Estados Unidos 4. 897. 445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH<sub>2</sub>-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH<sub>3</sub>.

Péptidos que comprenden las secuencias de la invención descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar, por ejemplo, la estabilidad, biodisponibilidad y/o afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrófobos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej., el grupo hidrófobo t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

Adicionalmente, todos los péptidos de la invención pueden ser sintetizados para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el isómero D de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido en lugar del isómero L habitual.

De manera similar, un péptido de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005, que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS),

- transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido perbórico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamiloación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.
- La modificación de proteínas y péptidos terapéuticos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamiloación con cianato potásico.
- En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados, p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámida, como muestra Lu et al. (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433 y las referencias que aparecen en el mismo.
- La purificación puede llevarse a cabo mediante una sola o una combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrófoba, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando, p. ej., separación con gradiente de acetonitrilo/agua.
- El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía en capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.
- Se describe un ácido nucleico (p. ej. un polinucleótido) que codifica un péptido de la invención. El polinucleótido puede ser, p. ej., ADN, ADNc, ANP, ANC o ARN, ya sea monocatenario y/o bicatenario, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como, p. ej., polinucleótidos con una estructura de fosforotioato, o combinaciones de los mismos, y puede contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Se describe un vector de expresión capaz de expresar un péptido conforme a la invención. En la técnica se conocen bien vectores de expresión para diferentes tipos de células que pueden ser seleccionados sin demasiada experimentación.
- En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. Se pueden hallar indicaciones, p. ej., en Sambrook et al (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- En una forma de realización especialmente preferida de la invención, la composición farmacéutica comprende un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 2, y en un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 3.
- La cantidad óptima de cada péptido que ha de incluirse en la vacuna y la pauta posológica óptima pueden ser determinadas por una persona versada en la técnica sin demasiada experimentación. Por ejemplo, el péptido o su variante pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i. v.), subcutánea (s. c.), intradérmica (i. d.), intraperitoneal (i. p.) o intramuscular (i. m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido son s. c., i. d., i. p., i. m. e i. v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN son i. d., i. m., s. c., i. p. e i. v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 1 y 500 mg, 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis de este rango se han utilizado con éxito en varios ensayos (Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G. Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55(12):1553-1564; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Resumen N. ° 3017).
- La composición farmacéutica de la invención puede elaborarse de modo que la selección, el número y/o cantidad de péptidos presentes en la composición sea/sean específicos de tejido, de cáncer y/o de paciente. Por ejemplo, la selección exacta de los péptidos puede estar guiada por los patrones de expresión de las proteínas originales en un tejido dado para evitar efectos secundarios. La selección puede depender del tipo específico de cáncer que el paciente padece, así como del curso de la enfermedad, los regímenes terapéuticos previos, el estado inmunitario del paciente y, por supuesto, de su haplotipo HLA. Además, la vacuna conforme a la invención puede contener componentes individualizados, de acuerdo con las necesidades personales del paciente en cuestión. Ejemplos de

esta personalización son el uso de diferentes cantidades de péptidos según la expresión de los AAT relacionados en el paciente, los efectos secundarios indeseados causados por alergias u otros tratamientos, y los ajustes de tratamientos secundarios después de una primera tanda o pauta de tratamiento.

5 En el caso de las composiciones que se van a utilizar como vacuna contra el GBM, por ejemplo, se evitarán los péptidos cuyas proteínas originales se expresen en grandes cantidades en los tejidos normales, o bien se procurará que estén presentes en bajas cantidades en la composición de la invención. Por otra parte, si se sabe que el tumor del paciente expresa grandes cantidades de cierta proteína la composición farmacéutica para el tratamiento de ese cáncer podría contener grandes cantidades y/o contar con más de un péptido específico de esa proteína en particular o de la vía de esa proteína.

10 La persona versada en la técnica será capaz de seleccionar las combinaciones preferidas de péptidos inmunogénicos analizando, por ejemplo, la generación de linfocitos T in vitro, así como su eficiencia y presencia total, la proliferación, afinidad y expansión de ciertos linfocitos T frente a ciertos péptidos, y la funcionalidad de dichos linfocitos, por ejemplo, analizando la producción de IFN-gamma (véanse también los ejemplos presentados más adelante). Normalmente, los péptidos más eficientes se combinan después en una vacuna con los fines  
15 descritos arriba.

Una vacuna adecuada contendrá preferentemente entre 2 y 20 péptidos, más preferentemente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 péptidos diferentes, aún más preferentemente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 péptidos diferentes, y lo más preferible de todo 10, 11, 12, 13 o 14 péptidos diferentes. Los péptidos 9-ámeros y 10-ámeros descritos en las Tablas 1 y 2 adjuntas son péptidos de MHC de clase I, mientras que los 12- a 15-ámeros  
20 son péptidos de MHC de clase II.

Los péptidos constituyen una vacuna antitumoral o contra el cáncer. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica, o aplicarse ex vivo a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse in vitro para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar.

25 El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y Longenecker et al. (1993) Ann. NY Acad. Sci. 690,276-291). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o  
30 ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los CTL CD8. No obstante, la estimulación es más eficiente si se cuenta con la ayuda de los linfocitos T positivos para el CD opuesto. Así pues, en el caso de los epítomos de MHC de clase II que estimulan a los CTL CD4 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD8-positivos. Por su parte, en los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8, la pareja de fusión o  
35 las secciones de una molécula híbrida proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos que estimulan a los CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica.

Los vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico son bien conocidos y normalmente consisten en líquidos, con los que se formula un agente terapéutico activo. El vehículo generalmente no aporta ninguna actividad farmacológica a la formulación, pero puede proporcionar estabilidad química o biológica, características de liberación  
40 y similares. Ejemplos de formulaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en Alfonso R. Gennaro. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins 2000, e incluyen, sin ánimo limitativo, solución salina fisiológica, agua, agua tamponada, glicina al 0,3%, ácido hialurónico, dextrosa y similares. Recientemente se ha descubierto que ciertas emulsiones grasas que vienen siendo utilizadas desde hace muchos años para la nutrición intravenosa de pacientes también pueden actuar como vehículos para péptidos.  
45 ejemplos de tales emulsiones son las emulsiones grasas comerciales conocidas con los nombres de Intralipid y Lipofundin. «Intralipid» es una marca registrada de Kabi Pharmacia, Suecia, y consiste en una emulsión grasa para nutrición intravenosa que aparece descrita en la patente de EE. UU. N. ° 3. 169. 094. «Lipofundin» es una marca registrada de B. Braun Melsungen, Alemania. Ambas contienen aceite de soja como grasa (100 ó 200 g en 1. 000 ml de agua destilada: 10% o 20%, respectivamente). Como emulsificantes, en Intralipid se utilizan fosfolípidos de la yema de huevo (12 g/l de agua destilada) y en Lipofundin la lecitina de yema de huevo (12 g/l de agua destilada). La isotonicidad se consigue añadiendo glicerol (25 g/l) tanto en Intralipid como en Lipofundin.  
50

Para desencadenar una respuesta inmunitaria normalmente es necesario incluir excipientes que aumenten la inmunogenicidad de la composición. Así pues, en una forma de realización preferida la composición farmacéutica comprende, además, como mínimo un adyuvante adecuado.

55 Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej., respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T cooperadores (T<sub>H</sub>) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Los adyuvantes adecuados incluyen, entre otros ejemplos: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870. 893, CpG7909, CyaA, dSLIM de Mologen, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, interferón-alfa o beta, IS Patch, ISS, ISCOM, JuvImmune,

LipoVac, MF59, monofosforil lípido A, y otros derivados de LPS no tóxicos, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vector PepTel, micropartículas PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas pseudovíricas, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, QS21 stimulon de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EE. UU. ) que es un derivado de la saponina, extractos de micobacterias y análogos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren adyuvantes como Imiquimod, Resiquimod, adyuvante de Freund incompleto o GM-CSF. Varios adyuvantes inmunitarios (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas y su preparación han sido descritos con anterioridad (Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM; Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison AC; The mode of action of immunological adjuvants; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej., el TNF- $\alpha$ ), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertir las células presentadoras de antígeno para los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE. UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej., la IL-12) (Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos T<sub>H1</sub> y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, Nature Reviews, Drug Discovery, 2006, 5, 471-484). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes que no son ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 comercial conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR, como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Otros ejemplos de adyuvantes útiles incluyen, entre otros, CpG químicamente modificados (p. ej., CpR, Idera), Poli(I:C) (p. ej., polii:C12U), ADN o ARN bacteriano sin CpG, así como pequeñas moléculas inmunoactivas y anticuerpos como imidazoquinolinas, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafilo, tadalafilo, vardenafilo, sorafinib, XL-999, CP-547632, pazopanib, ZD2171, AZD2171, ipilimumab, tremelimumab y SC58175, que pueden actuar terapéuticamente y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son dSLIM, BCG, OK432, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, interferón alfa, PeviTter y JuvImmune o combinaciones de los anteriores.

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), imiquimod, resiquimod e interferón alfa.

En otra forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es imiquimod o resiquimod.

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> Ed. 2000, American

Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas, preferiblemente del cáncer colorrectal (CCR).

5 Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen un antígeno que adopta la forma de un péptido unido a una molécula de MHC en lugar del antígeno extraño intacto. La molécula de MHC está ubicada en la superficie de una célula presentadora de antígeno. Por ello, la activación de los CTL sólo es posible en presencia de un complejo trimérico compuesto por el antígeno peptídico, la molécula de MHC y la célula APC. Por consiguiente, se puede potenciar la respuesta inmunitaria si, además de utilizar el péptido para activar a los CTL, se añaden células APC con la correspondiente molécula de MHC.

10 Así pues, en una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la presente invención contiene, además, una célula presentadora de antígeno como mínimo.

La célula presentadora de antígeno (o célula estimuladora) normalmente presenta una molécula de MHC de clase I o II en su superficie y en una forma de realización es sustancialmente incapaz de cargar la molécula de MHC de clase I o II con el antígeno seleccionado. Tal y como se describe con más detalle abajo, la molécula de MHC de clase I o II puede cargarse fácilmente in vitro con el antígeno seleccionado.

15 Preferiblemente, la célula de mamífero carece del transportador de péptidos TAP o bien este se presenta en un nivel reducido o funciona poco. Entre las células desprovistas del transportador peptídico TAP adecuadas se incluyen las T2, una línea celular humana deficiente para la carga de péptidos que está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE. UU. con el número de catálogo N. ° CRL-1992; las líneas celulares deficientes para TAP como la T2 pueden ser utilizadas como APC, ya que por su carencia de TAP  
20 casi todos los péptidos presentados por las MHC de clase I son los péptidos en estudio con los que se cargan externamente las moléculas MHC clase I vacías de estas líneas celulares, por lo que todos los efectos pueden atribuirse claramente a los péptidos añadidos.

25 Preferiblemente, las células presentadoras de antígeno son células dendríticas. Las células dendríticas adecuadas son células dendríticas autólogas que son expuestas a pulsos de un péptido antigénico. El péptido antigénico puede ser cualquier péptido antigénico adecuado que desencadene una respuesta de linfocitos T apropiada. El tratamiento de linfocitos T con células dendríticas autólogas expuestas a pulsos de péptidos derivados de un antígeno asociado a tumor se describe en Murphy et al. (1996) *The Prostate* 29, 371-380, y en Tjua et al. (1997) *The Prostate* 32, 272-278.

30 Así pues, en una forma de realización preferida de la presente invención la composición farmacéutica contiene al menos una célula presentadora de antígeno que es expuesta a pulsos o cargada con el péptido, por ejemplo, con el método del ejemplo 4.

Como alternativa, la célula presentadora de antígeno puede comprender un constructo de expresión que codifique el péptido. El polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido adecuado y se prefiere que sea capaz de transducir la célula dendrítica dando como resultado la presentación de un péptido y la inducción de inmunidad.

35 Para mayor conveniencia, un ácido nucleico de la presente invención puede estar comprendido en un polinucleótido viral o en un virus. Por ejemplo, se ha comprobado que células dendríticas transducidas con adenovirus inducen inmunidad antitumoral específica de antígeno en relación con MUC1 (véase Gong et al. (1997) *Gene Ther.* 4, 1023-1028). De manera similar, se pueden usar sistemas basados en adenovirus (véase, por ejemplo, Wan et al. (1997) *Hum. Gene Ther.* 8, 1355-1363); se pueden usar sistemas de retrovirus (Specht et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1213-1221 y Szabolcs et al. (1997) o también la transferencia a células dendríticas mediada por partículas sanguíneas (Tuting et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27, 2702-2707); y también ARN (Ashley et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1177-1182).

45 Por lo general, una composición farmacéutica de la invención que contenga (a) ácido(s) nucleico(s) de la invención puede ser administrada de una manera similar a las que contienen péptido(s) de la invención, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intratumoral, oral, dérmica, nasal, yugal, rectal, vaginal, por inhalación, o por vía tópica.

Debido a los mecanismos de evasión los tumores suelen desarrollar resistencia contra los fármacos con los que son tratados. La resistencia farmacológica puede aparecer durante el tratamiento y manifestarse en forma de metástasis y de tumores recurrentes. A fin de evitar esta resistencia farmacológica el tumor se suele tratar con una combinación  
50 de fármacos, y las metástasis y los tumores que reaparecen después de un periodo de tiempo sin enfermedad suelen requerir una combinación distinta. La composición farmacéutica se puede administrar conjuntamente con un segundo agente contra el cáncer. Este segundo agente puede ser administrado antes, después o simultáneamente con la composición farmacéutica de la invención. La administración simultánea puede llevarse a cabo, por ejemplo, mezclando la composición farmacéutica con el segundo agente anticanceroso si las propiedades químicas de ambos son compatibles. Otra forma de administración simultánea consiste en la administración de la composición y del  
55 agente anticanceroso el mismo día pero por vías de administración distintas, de modo que, por ejemplo, la composición farmacéutica de la invención puede inyectarse mientras que el segundo agente anticanceroso se administra por vía oral. La composición farmacéutica y el segundo agente anticanceroso también pueden

administrarse durante el mismo ciclo de tratamiento pero en días distintos y/o en ciclos de tratamiento distintos.

Se describe un método para tratar o prevenir el cáncer en un paciente, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención.

5 Una cantidad terapéuticamente eficaz será una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria, en particular una activación de una subpoblación de CTL. Una persona versada en la técnica puede determinar fácilmente si una cantidad es eficaz utilizando métodos inmunológicos estándar, como los facilitados en los ejemplos de las presentes especificaciones. Otra forma de monitorizar el efecto de cierta cantidad de la composición farmacéutica consiste en observar el crecimiento del tumor tratado y/o su recurrencia.

10 En una forma de realización especialmente preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se utiliza como una vacuna contra el cáncer.

15 La composición que contiene péptidos también puede constituir una vacuna antitumoral o contra el cáncer. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica, o aplicarse ex vivo a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse in vitro para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar.

20 La composición de la invención se puede utilizar en un método para tratar o ser utilizada como una vacuna contra el cáncer. El cáncer puede ser de la cavidad bucal o la faringe, cáncer del tubo digestivo, cáncer de colon, recto o ano, cáncer de las vías respiratorias, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, vagina o vulva, cáncer del cuerpo uterino y de ovario, cancer de las vías genitales masculinas, cáncer de las vías urinarias, cáncer de hueso y tejido blando, sarcoma de Kaposi, melanoma cutáneo, melanoma ocular, y cáncer ocular no melanómico, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de tiroides y de otras glándulas endocrinas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano o mieloma, preferentemente cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer cerebral, GIST o glioblastoma, preferentemente tumores cerebrales y aún más preferentemente glioblastomas.

25 En la forma de realización más preferida del método de tratamiento o vacuna conforme a la invención, la vacuna es una vacuna antitumoral muropeptídica para el tratamiento del GBM. La vacuna comprende un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 2, y un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. ° 3 y opcionalmente al menos un péptido adicional consistente en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N. ° 1 y las SEQ ID N. ° 4 a SEQ ID N. ° 12 que están localizados y han sido identificados en células de glioblastoma primario. Este conjunto incluye péptidos de HLA de clase I y clase II. El conjunto de péptidos también puede contener al menos un péptido, como el antígeno central del VHB, a modo de péptido de control positivo que actúe como marcador inmunitario para verificar la eficacia de la administración intradérmica. En una forma de realización particular, la vacuna consiste en 14 péptidos individuales (conformes a las SEQ ID N. ° 1 a SEQ ID N. ° 12), con entre aproximadamente 1500 µg a aproximadamente 75 µg, preferentemente entre aproximadamente 1000 µg a aproximadamente 750 µg, y más preferentemente entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 600 µg, y la más preferida aproximadamente 578 µg de cada péptido, todos los cuales se pueden purificar con HPLC y cromatografía de intercambio iónico y presentar un aspecto de polvo blanco o casi blanco. El liofilizado se disuelve preferentemente en hidrogenocarbonato de sodio, y se usa para la inyección intradérmica en los 30 minutos posteriores a su reconstitución a temperatura ambiente. De acuerdo con la presente invención, las cantidades preferidas de péptidos pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 y 100 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 1 mg, y aún más preferentemente entre aproximadamente 300 µg y 800 µg por 500 µl de solución. En la presente memoria, el término «aproximadamente» significa +/- 10 por ciento del valor dado, si no se indica otra cosa distinta. La persona versada en la técnica será capaz de ajustar la cantidad real de péptido que debe utilizarse en función de varios factores, como, por ejemplo, el estado inmunitario del paciente y/o la cantidad de TUMAP que presenta un tipo particular de cáncer. Los péptidos de la presente invención pueden proporcionarse en otras formas adecuadas (soluciones estériles, etc.) en lugar de liofilizados.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «una sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo –NH<sub>2</sub> neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se lleva a cabo con una base farmacéuticamente aceptable como

hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma de sales de ácido acético (acetatos), de amonio o de ácido clorhídrico (cloruros).

5 En otra forma de realización, una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir azúcares, polioles, aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido glutámico y otros en calidad de formadores de matriz. Los azúcares pueden ser mono, di o trisacáridos. Estos azúcares pueden emplearse solos o en combinación con polioles. Algunos ejemplos de azúcares son: glucosa, manosa, galactosa, fructosa o sorbosa como monosacáridos; sacarosa, lactosa, maltosa o trehalosa como disacáridos; y rafinosa como trisacárido. Un poliol puede ser, por ejemplo, la manitosa. Los ingredientes preferidos son: sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, manitol y/o sorbitol, y más preferentemente, manitol.

10 Asimismo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir excipientes que son bien tolerados fisiológicamente (véase Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5<sup>th</sup> ed., edited by Raymond Rowe, Paul Sheskey and Sian Owen, Pharmaceutical Press (2006)), como por ejemplo antioxidantes como ácido ascórbico o glutatión, conservantes como fenol, m-cresol, metil o propilparabeno, clorobutanol, tiomersal o cloruro de benzalconio, estabilizante, formador de matriz como sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, manitosa, manitol y/o sorbitol, manitol y/o lactosa y solubilizante como polietilenglicoles (PEG), es decir PEG 3000, 3350, 4000 o 6000, o ciclodextrinas, es decir hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sulfobutiletíl- $\beta$ -ciclodextrina o  $\gamma$ -ciclodextrina, o dextranos o poloxaómeros, esto es, poloxámero 407, poloxámero 188, o Tween 20, Tween 80. En una forma de realización preferente las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen uno o varios excipientes bien tolerados, seleccionados del grupo consistente en antioxidantes, formadores de matriz y estabilizantes.

20 El intervalo de pH aceptable va de 2 a 12 para la administración intravenosa intramuscular, mientras que para la administración subcutánea se reduce entre 2,7 y 9,0 ya que la velocidad de dilución in vivo es menor, lo que ofrece más posibilidades de irradiación en el punto de inyección. Strickley Robert G., Pharm. Res., 21, n. ° 2, 201 - 230 (2004).

25 La preparación farmacéutica de la presente invención comprende péptidos acordes con la invención que se administran a un paciente aquejado por una enfermedad adenomatosa o cancerosa que está asociada con el respectivo péptido o antígeno. De ese modo, se puede desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T.

30 Se prefiere una composición farmacéutica conforme a la invención, en la cual las cantidades de péptidos (en particular de los asociados a tumor) conformes a la invención presentes en la composición sean específicas del tejido, del cáncer y/o del paciente.

35 Se describe una vacuna de ácido nucleico. Es sabido que la inoculación de una vacuna de ácido nucleico (como una vacuna de ADN) que codifique un polipéptido conduce a una respuesta de linfocitos T. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica, o aplicarse ex vivo a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse in vitro para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células in vitro, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina2 o el GM-CSF. El o los ácidos nucleicos pueden ser sustancialmente puros, o bien combinarse con un adyuvante inmunoestimulador, o emplearse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o ser administrados con un sistema adecuado, como por ejemplo liposomas. La vacuna de ácido nucleico también puede administrarse con un adyuvante como los descritos previamente en el caso de las vacunas peptídicas. Se prefiere que la vacuna de ácido nucleico se administre sin adyuvante.

45 El polinucleótido puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o un sistema de liberación adecuado. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de naturaleza viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la «pistola génica», también pueden utilizarse. El péptido o el péptido codificado por el ácido nucleico puede ser una proteína de fusión, dotada por ejemplo con un epítipo del toxoide tetánico que estimula a los linfocitos T CD4-positivos.

50 Es conveniente que cualquier ácido nucleico que se administre al paciente sea estéril y apirógeno. El ADN desnudo puede administrarse por vía intramuscular, intradérmica o subcutánea. Convenientemente, la vacuna de ácido nucleico puede comprender cualquier medio adecuado para la introducción de ácidos nucleicos. El ácido nucleico, preferentemente ADN, también puede ser introducido en un liposoma o formando parte de un sistema de liberación basado en un vector viral. Si la vacuna es de ácido nucleico, como una vacuna de ADN, es preferible que sea administrada en el músculo, mientras que si se trata de una vacuna peptídica es preferible que lo sea por vía s. c. o i. d. También se prefiere que la vacuna se pueda administrar en la piel.

Se cree que la captación del ácido nucleico y la expresión del polipéptido codificado por parte de las células presentadoras de antígeno especializadas como las células dendríticas puede ser el mecanismo de sensibilización de la respuesta inmunitaria; no obstante, aunque las células dendríticas no sean transfectadas, siguen siendo importantes porque pueden captar el péptido expresado por otras células transfectadas del tejido («sensibilización cruzada», p. ej., Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med*. 2004 Aug 2; 200(3):297-306).

El tratamiento del cáncer mediante inmunización con polinucleótidos aparece descrito en Conry et al. (1996) *Seminars in Oncology* 23,135-147; Condon et al. (1996) *Nature Medicine* 2,1122-1127; Gong et al. (1997) *Nature Medicine* 3,558-561; Zhai et al. (1996) *J. Immunol.* 156,700-710; Graham et al. (1996) *Int J. Cancer* 65,664-670; y Burchell et al. (1996) 309-313 In: *Breast Cancer, Advances in biology and therapeutics*, Calvo et al. (Eds), John Libbey Eurotext, que se incorporan íntegramente en la presente memoria como referencia.

También puede ser útil dirigir la vacuna hacia poblaciones celulares específicas, como, por ejemplo, células presentadoras de antígeno, ya sea a través del sitio de inyección, utilizando vectores y sistemas de liberación dirigidos, o mediante la purificación selectiva de una población celular de esa naturaleza del paciente y la administración ex vivo del péptido o ácido nucleico en cuestión (por ejemplo, las células dendríticas pueden seleccionarse del modo descrito por Zhou et al. (1995) *Blood* 86, 3295-3301; Roth et al. (1996) *Scand. J. Immunology* 43, 646-651). Por ejemplo, los vectores dirigidos pueden comprender un promotor específico de tejido o de tumor que dirija la expresión del antígeno a un lugar adecuado.

Por último, la vacuna conforme a la invención puede depender del tipo específico de cáncer del paciente, así como del estado de la enfermedad, las anteriores pautas de tratamiento, el estado inmunitario del paciente y, por supuesto, de su haplotipo HLA. Además, la vacuna conforme a la invención puede contener componentes individualizados, de acuerdo con las necesidades personales del paciente en cuestión. Ejemplos de esta personalización son el uso de diferentes cantidades de péptidos según la expresión de los AAT relacionados en el paciente, los efectos secundarios indeseados causados por alergias u otros tratamientos, y los ajustes de tratamientos secundarios después de una primera tanda o pauta de tratamiento.

Además de ser útiles para el tratamiento del cáncer, los péptidos de la presente invención también son útiles para el diagnóstico. Dado que muchos de los péptidos son generados por el glioblastoma y se ha determinado que dichos péptidos no están presentes en tejidos normales, dichos péptidos pueden ser utilizados para diagnosticar la presencia de un cáncer.

La presencia de los péptidos en biopsias de tejido puede ayudar al anatomopatólogo a diagnosticar un cáncer. La detección de ciertos péptidos mediante anticuerpos, espectrometría de masas u otros métodos conocidos en la técnica puede advertir al anatomopatólogo de que el tejido es maligno o está inflamado o enfermo. La presencia de grupos de péptidos puede permitir la clasificación o subclasificación de los tejidos enfermos.

La detección de los péptidos en una muestra de tejido enfermo puede ayudar a decidir si los tratamientos que implican al sistema inmunitario pueden ser beneficiosos, sobre todo si se sabe o se prevé que los linfocitos T estén implicados en el mecanismo de acción. La pérdida de expresión de MHC es un mecanismo conocido con el que las células infectadas o cancerosas logran eludir la vigilancia del sistema inmunitario. Así pues, la presencia de los péptidos indica que dicho mecanismo no es utilizado por las células analizadas.

Los péptidos descritos pueden ser utilizados para analizar las respuestas de los linfocitos contra ellos, como son las respuestas de los linfocitos T o las respuestas de anticuerpos contra el péptido o el péptido unido a moléculas de MHC. Estas respuestas de los linfocitos pueden ser utilizadas como marcadores pronósticos para decidir los pasos posteriores del tratamiento. Dichas respuestas también pueden ser utilizadas como marcadores indirectos en las estrategias de inmunoterapia destinadas a estimular respuestas linfocitarias a través de diferentes medios, como por ejemplo la vacunación con proteínas, ácidos nucleicos, materiales autólogos, o la transferencia adoptiva de linfocitos. En el ámbito de la terapia génica, las respuestas de los linfocitos contra los péptidos de la presente invención pueden tenerse en cuenta para la evaluación de los efectos secundarios. El control regular de las respuestas de los linfocitos también puede ser una herramienta valiosa para el seguimiento en trasplantes, por ejemplo con el fin de detectar enfermedades del injerto contra el hospedador y del hospedador contra el injerto.

Se describe un kit que comprende (a) un envase que contiene una composición farmacéutica como la descrita arriba, en forma de solución o liofilizada; (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o una solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y (c) opcionalmente, instrucciones para (i) el uso de la solución o (ii) reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada. El equipo puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: (iii) un tampón, (iv) un diluyente, (v) un filtro, (vi) una aguja, o (v) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

Los equipos comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos,

viales (p. ej. viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por diversos materiales como vidrio o plástico. Preferiblemente el equipo y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones en el envase que indica las instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar además que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej. de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El equipo puede comprender además un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituida es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Los equipos pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención acompañado o no de otros componentes (p. ej. otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

Preferiblemente, los equipos incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej. GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénesis, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej. una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc. ) para permitir la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente equipo.

La formulación farmacéutica de la presente invención es toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (entérica), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica. Se puede utilizar una bomba de infusión para la administración.

La invención se describirá a continuación con más detalle aludiendo a las Figuras siguientes, la lista de Secuencias y los Ejemplos. Los ejemplos siguientes se facilitan únicamente a título ilustrativo y no pretenden limitar la invención.

#### Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Análisis de tetrámeros resultantes de la proliferación estimulada con microesferas de linfocitos CD8+ específicos de CSP-001 y de NLGN4X-001 obtenidos de sangre periférica de un donante sano.  $1 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas con CD8+ por pocillo se estimularon semanalmente con microesferas acopladas con anti-CD28 más antígeno tumoral A\*0201/CSP-001 en alta densidad (panel izquierdo) o anti-CD28 más antígeno tumoral A\*0201/NLGN4X-001 en alta densidad (panel derecho). Después de tres estimulaciones in vitro, todas las células se tiñeron con anticuerpo contra el CD8, conjugado con FITC, y con tetrámeros de A\*0201/CSP-001 y A\*0201/NLGN4X-001 marcados por fluorescencia. Las células se seleccionan entre los linfocitos CD8+; las cifras representan el porcentaje de células hallado en el cuadrante indicado entre los linfocitos CD8+.

Figura 2: Afinidad de los péptidos de HLA de clase I de la invención por la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A\*0201. Las constantes de disociación ( $K_D$ ) de los TUMAP de HLA de clase I de IMA950, de los péptidos de control IMA-MUC-001 (ligando intermedio) y del péptido marcador viral HBV-001 (ligando fuerte) se midieron con un ensayo de repliegamiento de MHC basado en ELISA. El ensayo se repitió tres veces con resultados similares.

Figura 3: Unión relativa in vitro de los 15-ámeros derivados de IMA-BIR-002 y de IMA-MET-005 con los alelos HLA-DR más frecuentes. La tecnología ProlImmune REVEAL™ emplea ensayos in vitro de ensamblaje con HLA-DR para determinar las tasas de asociación (on-rates) del complejo MHC:péptido como uno de los principales determinantes de la constante de unión de cada péptido. El ensayo corrió a cargo de ProlImmune (Oxford, Reino Unido). Tras un intervalo de tiempo fijado, se mide la cantidad de complejos MHC:péptido intactos y se comparan con la cantidad en

un control pasa/no pasa(ligando relativamente débil). Como control positivo se incluye un ligando de HLA-DR fuerte y promiscuo. Los valores indican el porcentaje de unión de cada péptido con las moléculas de HLA-DR respecto al control de pasa/no pasa. Como la tecnología REVEAL™ está limitada a 15-ámeros, se analizaron dos 15-ámeros solapados (posiciones 2-16; 6-20) en lugar del MET-005 entero.

5 Las Figuras 4a y 4b muestran la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que segregan IFN $\gamma$  específico contra PSMA y survivina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en varios intervalos de tiempo tras la vacunación del paciente, análisis realizado con EliSpot de IFN $\gamma$ . Intervalos de tiempo: antes de la vacunación (a) y después de 3 (b), 6 (c), 7 (d), 8. (e), 9 (f), 10 (g) y 11 (h) vacunaciones.

10 La Figura 5 muestra la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que segregan IFN $\gamma$ , IL-5, IL-10 y TNF $\alpha$  específicamente contra la survivina en PBMC en tres intervalos de tiempo distintos tras la vacunación del paciente, analizados con un ensayo de tinción intracelular (ICS). Intervalos de tiempo: después de 1 (a), 3 (b) y 7 (c) vacunaciones.

**Ejemplos**

1. Síntesis

15 Los péptidos se sintetizaron con métodos convencionales y conocidos de síntesis en fase sólida basados en la química del Fmoc. Después de la purificación con HPLC preparativa, se aplicó un procedimiento de intercambio iónico para incorporar contraiones fisiológicamente compatibles (por ejemplo acetato, amonio o cloruro). Por último, se los sometió a liofilización y se obtuvo una sustancia sólida blanca o casi blanca. Todos los TUMAP se administran preferentemente en forma de sales de acetato, aunque también es posible hacerlo en forma de otras sales.

20 Es importante tener presente que la identidad y la pureza de los péptidos se pueden determinar fácilmente y con mucha exactitud con espectrometría de masas, análisis de aminoácidos y HPLC analítica. Según los resultados analíticos, todos los péptidos utilizados en la vacuna IMA950 presentan la estructura correcta con purezas  $\geq 95\%$ .

Tabla 5: Características fisicoquímicas de los péptidos de IMA950

N. °	ID del péptido	Longitud del péptido (n. ° de aminoácidos)	Tipo de sal	Forma física	Higroscopicidad
1	CSP-001	9	acetato	Liofilizado blanco o casi blanco	Almacenado como polvo liofilizado. Los péptidos liofilizados en general tienen propiedades higroscópicas.
2	FABP7-001	9	acetato		
3	NLGN4X-001	9	acetato		
4	TNC-001	9	acetato		
5	NRCAM-001	9	acetato		
6	IGF2BP3-001	9	acetato		
7	BCA-002	9	acetato		
8	MET-005	17	acetato		
9	PTP-003	9	acetato/amonio		
10	PTP-005	9	acetato		
11	CHI-001	9	acetato		
12	BIR-002	15	acetato		
13	(HBV-001)	10	acetato		

25 2. Componentes de la composición farmacéutica de ejemplo de IMA950

IMA950 está compuesta de un cóctel de péptidos sintéticos asociados a tumores (TUMAP), de los que la mayoría han sido identificados en células primarias de cáncer colorrectal. Los TUMAP incluyen 10 péptidos de unión a HLA de clase I con capacidad para activar linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CD8<sup>+</sup>), un péptido de unión a HLA de clase

5 II con capacidad para activar linfocitos T cooperadores (linfocitos T CD4+), y otro péptido de unión a HLA de clase I elongado dotado con ambas capacidades. Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel esencial porque facilitan la función de los linfocitos T citotóxicos liberando citocinas que potencian la acción citocida de los linfocitos T CD8+ y también podrían actuar directamente contra las células tumorales (Knutson and Disis, 2005). Además de esos doce TUMAP, IMA950 contienen un péptido de control de origen vírico.

Las muestras se extrajeron quirúrgicamente de tejido canceroso y normal de pacientes con GBM y de la sangre de donantes sanos, siendo analizadas de forma escalonada como se indica a continuación:

10 En primer lugar, se sometieron a un análisis hologenómico de la expresión de ARNm con micromatrices para descubrir los genes sobreexpresados en el tejido maligno en comparación con una gama de órganos y tejidos normales. En segundo lugar, se identificaron con espectrometría de masas los ligandos HLA del material canceroso. A continuación, los ligandos HLA identificados se compararon con los datos de expresión génica. Los péptidos codificados por los genes sobreexpresados o expresados selectivamente que habían sido detectados en el primer paso se consideraron TUMAP candidatos para la vacuna multipeptídica.

15 Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para hallar datos adicionales que avalaran la relevancia de los péptidos identificados como TUMAP.

Por último, se analizó la reactividad de los linfocitos T CD8+ periféricos de individuos sanos contra los ligandos HLA asociados a tumores en el curso de varios inmunoensayos (ensayos de linfocitos T in vitro).

Tabla 3: Composición de los TUMAP de IMA950.

20 IMA950 contiene diez péptidos de unión a HLA-A\*02 (clase I), un péptido de unión a HLA-DR (clase II) y otro péptido a HLA-A\*02 elongado. Además, contiene el péptido marcador viral HBV-001 que no se cita aquí.

Tabla 6: Funciones de las proteínas de las que derivan los TUMAP

ID del TUMAP	Denominación	Función / Comentarios
TUMAP de HLA-A*02		
BCA-002	Brevicán	Molécula de la matriz extracelular específica del cerebro que interviene en la invasión; se sobreexpresa y es desglucosilada específicamente en el glioma; asociada a nicho de citoblastos.
CHI-001	Quitinasa 3-like 2	Proteína extracelular de función poco clara; muy sobreexpresada en el glioblastoma.
CSP-001	Proteoglicano de sulfato de condroitina 4	Proteoglicano transmembrana implicado en la neovascularización; sobreexpresado por células tumorales y pericitos en los vasos sanguíneos de los tumores cerebrales malignos.
FABP7-001	Proteína de unión a ácidos grasos 7, cerebro	Proteína citoplasmática implicada en el metabolismo de los ácidos grasos; asociada con el aumento de la motilidad de las células de GBM en el tejido circundante y con una supervivencia corta; muy sobreexpresada en el GBM.
IGF2BP3-001	Proteína de unión 3 al ARNm del factor de crecimiento insulinoide 2	Interviene en el recambio y el control traduccional del ARNm; proteína oncofetal; descrita como sobreexpresada en varios tipos de cáncer donde está asociada con una supervivencia corta.
NLGN4X-001	Neuroligina 4, ligada al cromosoma X	Molécula de adhesión celular; escasa bibliografía; muy inmunógena; elevada sobreexpresión en el GBM y el GIST; interviene en la invasión y la oncogénesis.
NRCAM-001	Molécula de adhesión celular neuronal	Implicada en la vía de señalización de la beta-catenina; papel importante en la invasión, crecimiento tumoral y oncogénesis; altos niveles de expresión correlacionados con supervivencia breve.

PTP-003	Proteína-tirosina-fosfatasa, receptor, polipéptido Z 1	tipo	Proteína transmembrana de tipo I; muy sobreexpresada en glioblastoma, oligodendroglioma y otros tumores; papel funcional en la oncogénesis; con frecuencia experimenta amplificación génica en el GBM y en otros tipos de tumor.
PTP-005			
TNC-001	Tenascina C		Papel en la angiogénesis; actor importante en varias vías implicadas en la transformación y la proliferación tumoral; sobreexpresada en los vasos sanguíneos que irrigan el tumor; asociada a nicho de citoblastos cancerosos.
TUMAP de HLA-DR			
BIR-002	Survivina		Antígeno de supervivencia del tumor implicado en la regulación de la apoptosis y la proliferación; la sobreexpresión en gliomas y en otros tipos de tumor está asociada con un mal pronóstico.
TUMAP de HLA-A*02 elongado			
MET-005	Protooncogén met		Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; implicado en la transformación, la invasividad y la angiogénesis tumorales; descrito como asociado con nicho de GBM.

3. Presentación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) contenidos en IMA950 en muestras tumorales.

Muestras de tejido

5 Las muestras de tejido tumoral fueron facilitadas por el Hôpital Cantonal Universitaire de Genève (Oncología Médica, Laboratorio de inmunología tumoral) y la Neurochirurgische Universitäts-Klinik de Heidelberg (Laboratorio de biología molecular). Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

10 Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de los tejidos sólidos siguiendo un protocolo ligeramente modificado (Falk, K., 1991; Seeger, F. H. T., 1999) con el anticuerpo específico de HLA-A\*02 BB7. 2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarsa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

15 Detección de los TUMAP mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ESI (ESI-LCMS)

Método uno:

20 Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente de ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y la desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 5 µm (Dionex). El solvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El solvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80%/agua. El pH de los dos solventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15% al 60% de B en 90 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema fraccionamiento. Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. A continuación se reveló la identidad de las secuencias peptídicas mediante espectrometría de masas (ESI-LCMS/MS) con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica.

Método dos:

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase inversa (sistema Acquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente de ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm d. i. x 250 mm) rellena con material de fase inversa C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo operar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30. 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. El TUMAP identificado se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia. Las Figuras 1a y b muestran espectros de ejemplo de varios TUMAP asociados a MHC de clase I obtenidos de tejido tumoral.

La Tabla 7 expone los resultados de un análisis de muestras de glioblastoma, la mayoría procedentes de tumores primarios de GBM. Todos los TUMAP de HLA-A\*02 se hallaron en tres o más de las 18 muestras analizadas y cinco de los TUMAP se detectaron en más del 50% de las muestras de GBM analizadas.

Tabla 7: Detección de los TUMAP de clase I en muestras de GBM

Solo se incluyeron muestras tumorales en las que se analizaron los ligandos de clase I ("-" = TUMAP de clase I de IMA950 no detectado;"+" = TUMAP de clase I de IMA950 detectado)

N.º	Muestra de GBM	Estadio tumoral (grado)	TUMAP de clase I detectado (+) o no detectado (-) en el análisis por espectrometría de masas									
			IMA-BCA-002	IMA-CHI-001	IMA-CSP-001	IMA-FABP7-001	IMA-IGF2BP3-001	IMA-NLGN4X-001	IMA-NRCAM-001	IMA-PTP-003	IMA-PTP-005	IMA-TNC-001
1	GB6010T	GBM primario (IV)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	GB1023T	GBM primario (IV)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	GB1021T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
4	GB6003T#	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
5	GB1020T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
6	GB6027T	GBM primario (IV)	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
7	GB1014T#	GBM secundario (IV)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
8	GB1012T	GBM primario (IV)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
9	GB6019T	GBM primario (IV)	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
10	GB1002T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
11	GB6024T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
12	GB1006T	GBM primario (IV)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
13	GB1004T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-

14	GB1008T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
15	GB1011T	GBM primario (IV)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
16	GB1005T	GBM primario (IV)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
17	GB6015T	GBM primario (IV)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
18	GB6016T	GBM primario (IV)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+

#### 4. Inmunogenicidad in vitro de los péptidos presentados por MHC de clase I de IMA950

Para obtener información relativa a la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en IMA950, llevamos a cabo análisis con una conocida plataforma de estimulación in vitro descrita por (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978). De este modo pudimos demostrar datos positivos de inmunogenicidad en los diez péptidos restringidos a HLA-A\*0201 contenidos en IMA950, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en humanos. La inmunogenicidad de MET-005 no se puede analizar con este método puesto que en su forma elongada no se une al HLA-A\*02. Así pues, con MET-005 no se pueden producir los tetrámeros que son indispensables para la estimulación in vitro. No obstante, se ha demostrado la inmunogenicidad in vitro del epítomo de HLA-A\*02 incluido en MET-001 (YVDPVITSI, véase EP 1507795B1). Se supone que MET-005 estimula CTL específicos de MET-001 tras el adecuado procesamiento natural por las células presentadoras de antígeno. La inmunogenicidad de MET-001 indica la presencia de CTL específicos de MET-001 en donantes sanos, lo que también es un prerrequisito para la eficacia de MET-005 como parte de una vacuna contra el cáncer. Así pues, la inmunogenicidad de MET-001 es un indicador bastante fiable de la inmunogenicidad de MET-005.

#### Sensibilización in vitro de los linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo las estimulaciones in vitro con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con un complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocíticas HLA-A\*02+ frescas utilizando un medio de separación en gradiente de densidad ordinario (PAA, Cölbe, Alemania). Las capas leucocíticas procedían del banco de sangre de Tubinga y del Katharinenhospital de Stuttgart. Las PBMC aisladas se incubaron hasta el día siguiente con medio para linfocitos T (TCM) para la sensibilización humana in vitro. El medio consistía en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAA, Cölbe, Alemania), penicilina 100 U/ml/estreptomina 100 µg/ml (Cambrex, Verviers, Bélgica), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Neustadt, Alemania) y gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Los linfocitos CD8+ se aislaron con un kit de selección positiva MACS para CD8+ (Miltenyi, BergischGladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8+ obtenidos se incubaron hasta su uso en TCM suplementado con IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Chiron, Múnich, Alemania). La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros (Walter et al., 2003) con pequeñas modificaciones. En suma, con el método descrito por (Altman et al., 1996) se sintetizaron moléculas recombinantes y biotiniladas de HLA-A\*0201 desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada. El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humano (Jung et al., 1987) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,60 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois/EE. UU. ). Los complejos pMHC usados como controles positivo y negativo fueron A\*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A/MART-1 modificado) y A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5) o A\*0201/HBV-001 (FLPSDFFPSV), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800.000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng de pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad) o de 2 ng del relevante más 200 ng de MHC irrelevante (biblioteca de pMHC) (microperlas de baja densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD8+ con  $2 \times 10^5$  microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37°C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37°C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, se llevaron a cabo análisis tetraméricos de los tetrámeros de MHC fluorescentes (producidos del modo descrito por (Altman et al., 1996) más anticuerpo CD8-FITC del clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) en un citómetro FACSCalibur de cuatro colores (BD). Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis tetramérico se hizo con el programa FCS Express (De Novo Software). La sensibilización in vitro de los linfocitos CD8+ tetrámero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (gating) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado in vitro y evaluable de un donante sano contenía una línea de

linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación in vitro (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetrámero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetrámero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad in vitro de los péptidos de IMA950

- 5 En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad in vitro se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de ese péptido. En la Figura 1 se expone una tinción representativa que muestra la generación de líneas de linfocitos T específicas. Los resultados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Inmunogenicidad de los péptidos de HLA de clase I incluidos en IMA950

Antígeno	Donantes positivos / donantes analizados	Pocillos positivos / pocillos analizados
BCA-002	75 %	35 %
CHI-001	100 %	63 %
CSP-001	100 %	57 %
FABP7-001	100 %	27 %
IGF2BP3-001	50 %	21 %
NLGN4X-001	100 %	62 %
NRCAM-001	86 %	39 %
PTP-003	50 %	17 %
PTP-005	100 %	52 %
TNC-001	60 %	30 %
MET-001 (MET-005)	67 %	39 %
HBV-001	43 %	12 %

- 10 Aquí se resumen los resultados de los experimentos de inmunogenicidad in vitro llevados a cabo por Immatics con todos los péptidos de HLA de clase I contenidos en IMA950. Los resultados mostrados han sido obtenidos con la estimulación de linfocitos CD8+ con microperlas de alta densidad. La variabilidad de los lotes de suero humano puede influir mucho en los resultados de las pruebas de inmunogenicidad, por lo que solo se evaluaron los ensayos en que se usó un único lote de suero.

- 15 5. Inmunogenicidad del TUMAP de clase II BIR-002 de IMA950

Se llevó a cabo un estudio clínico para confirmar la inmunogenicidad del péptido con la SEQ ID N. ° 12.

El objetivo principal del estudio era investigar la respuesta del PSA (antígeno específico de próstata) (PSA-R) a la administración subcutánea de un panel de péptidos específicos de la próstata (vacunación) en pacientes con recidiva bioquímica tras prostatectomía radical sin detección de lesiones metastásicas evidentes.

- 20 El objetivo secundario del estudio consistió en investigar la tolerabilidad y la viabilidad del tratamiento vacunal en pacientes con carcinoma de próstata, con especial hincapié en los fenómenos inmunitarios en términos de respuesta de los linfocitos T.

El estudio se diseñó como un ensayo prospectivo y aleatorizado de fase I/II para la indicación de «recidiva bioquímica tras prostatectomía radical sin detección de lesiones metastásicas evidentes».

- 25 Población del estudio

Como parte de este estudio de fase I/II se intentó inducir la regresión del PSA como indicador del cese del crecimiento tumoral mediante la vacunación con un panel de péptidos específicos de la próstata en pacientes HLA-A\*02<sup>+</sup> que presentaban recidiva bioquímica tras la prostatectomía radical. La combinación de péptidos específicos de la próstata se administró por vía subcutánea y se evaluó la magnitud de la respuesta inmunitaria en el contexto de varias formas de administración de las estructuras antigénicas.

- 30

A diferencia de los estudios de vacunación anteriores, el estudio se centró en el tratamiento de pacientes que presentaban una pequeña carga tumoral todavía indetectable con las técnicas de imagen. Todos los pacientes fueron vacunados del mismo modo utilizando conocidas estructuras antigénicas específicas de la próstata para estimular la respuesta inmunitaria contra las células malignas. Se trató a 19 pacientes.

5 Tabla 9: Características de la población del estudio

	Total	%	Mediana	Rango
Edad	19		63	55 - 77
Tratamiento neo-/adyuvante previo				
Ninguno	11	58		
Radiación	3	16		
Hormonoterapia intermitente	2	11		
Rad. + Int. Horm. Int.	2	11		
Rad. + Quimioterapia	1	5		
Clasificación TNM en el momento de la prostatectomía radical (RPX)				
T2a-c R0	6	32		
T3a-c R0	6	32		
T2a-c R1	3	16		
T3a-c R1	3	16		
T3aN2 R0	1	5		
Escala de Gleason				
5 - 7	10	53		
8 - 10	3	16		
Desconocido	6	32		
Meses entre la RPX y la vacunación			41	9 - 124
Primera recidiva postquirúrgica, meses			14	1 - 90
PSA al iniciar la vacunación			0,76	0,14 – 10,8

#### Plan de tratamiento

10 Una vez descartadas las lesiones metastásicas manifiestas con la tomografía computarizada y la gammagrafía ósea, la vacuna de péptidos específicos de la próstata se administró por vía subcutánea conforme a las diferentes formas de administración a pacientes con recidiva del PSA que habían sido sometidos a prostatectomía radical (aumento del PSA: elevación del 50% en dos análisis realizados como mínimo con 14 días de diferencia). La vacuna se administró ocho veces los días 0, 7, 14, 28, 42 y 56 (aproximadamente 100 microgramos de cada péptido en cada inyección). Después de cada vacunación y de nuevo el día 70, se midió la concentración de PSA para evaluar la respuesta al tratamiento.

15 Si se detectaba respuesta del tumor (remisión completa [PSA-CR] o remisión parcial [PSA-PR] o estabilización clínica [sin cambio, PSA-NC]), el paciente recibía la vacuna una vez al mes como tratamiento de mantenimiento con la forma de administración seleccionada en cada caso. La respuesta del paciente al tratamiento de vacunación se evaluó detalladamente del modo indicado a continuación:

20 Remisión completa (PSA-CR): Normalización de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas. La normalización se definió como un valor mínimo del PSA

< 0,2 ng/ml, que cabría esperar después de la prostatectomía radical con extirpación completa del tumor o de la próstata.

5 Remisión parcial: a) PSA-PR  $\leq$  80% (Reducción de un 80% de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas); y b) PSA-PR  $\leq$  50% (Reducción de un 50% de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas).

Enfermedad estable (PSA-SD): Ningún cambio significativo durante un período mínimo de cuatro semanas. Esto incluye la estabilización y una reducción inferior al 50% y un aumento inferior al 10%, confirmada por la medición después de un intervalo de al menos 4 semanas.

10 Progresión (PSA-PD): Aumento de la concentración de PSA superior al 10%. El estudio se daba por concluido para el paciente si aparecía progresión del PSA.

15 Una vez admitidos los pacientes en el estudio se les administraba la vacuna de epítomos específicos; se tuvieron en cuenta las proteínas que se expresan específicamente en las células epiteliales de la próstata (p. ej. PSMA/PSCA). Además de investigar la eficacia general de la vacuna controlando el crecimiento de las fracciones residuales del tumor mediante la cuantificación regular de las concentraciones de PSA, el estudio investigó los efectos de los diversos métodos de vacunación sobre la modulación del sistema inmunitario. Además de la simple administración subcutánea de los péptidos solos, también se probaron diversas combinaciones con adyuvantes. En concreto se empleó Montanide por la liberación lenta y el efecto adyuvante que consigue en las vacunas peptídicas (Montanide consiste en el clásico adyuvante incompleto de Freund adaptado para la administración en humanos), que  
20 recientemente ha sido descrito muy favorablemente. Con este fin, antes de la administración se mezclaron 500  $\mu$ l de la solución de péptidos con 500  $\mu$ l de Montanide. Así se obtiene una emulsión de agua en aceite que libera lentamente el antígeno contenido en la fase acuosa durante varias semanas. La estabilidad física de la emulsión es muy alta, y a 4 °C se puede conservar durante más de tres meses sin una separación apreciable de las fases. La liberación lenta de Montanide se ha aprovechado en varios ensayos de vacunación con buenos resultados (Oka et al., 2004).

25 En una rama del estudio se investigó la eficacia de la vacunación con la estimulación simultánea del sistema inmunitario con factores de crecimiento, GM-CSF y solución inyectable Leukine®. El GM-CSF es un adyuvante muy habitual en los ensayos de vacunación con péptidos y en varios se ha descrito la potenciación de la respuesta clínica y de los linfocitos T. Inicialmente, el GM-CSF actúa como un factor de reclutamiento y de diferenciación de las células dendríticas que se cree que potencia el número de estas en el punto de inyección de la vacuna. Aunque el GM-CSF no activa por sí solo las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y los macrófagos sí se ha descrito la activación indirecta en condiciones in vivo (Molenkamp et al., 2005).

30 Otra rama del estudio investigó la eficacia de la vacunación con la activación simultánea de las células dendríticas mediante el uso epicutáneo del imiquimod. El imiquimod se administró en forma de pomada al 5% (Aldara). Ejerce una potente acción inmunoestimuladora a través de su efecto sobre las células TLR7-positivas (p. ej. células dendríticas plasmocitoides, células de Langerhans, células dendríticas dérmicas), que activa la vía dependiente de MyD88. Las APC activadas liberan citocinas inflamatorias y estimuladoras de los linfocitos T, regulan al alza la coestimulación y migran a los ganglios linfáticos invadidos por el tumor. En modelos con animales se ha demostrado la capacidad del imiquimod para estimular la respuesta de los CTL inducida por los péptidos con la mezcla de los antígenos en la pomada o con la aplicación de Aldara sobre el punto de administración por vía s. c. o inyección i. d. de los antígenos.

35 Otra rama del estudio investigó la eficacia de la vacunación con la activación concomitante de las células dendríticas mediante su mezcla con ARNm de la mucina-1 estabilizado con protaminas para activar los TLR 7/8. El ARNm genera una amplia activación de las poblaciones de células inmunitarias de ratón y humanas. La incorporación a la formulación de la proteína polibásica protamina aumenta la semivida del ARNm y propicia la formación de partículas que probablemente prolongan la liberación. Así pues, este adyuvante combina propiedades de liberación lenta con la activación de las APC.

En resumen, las formas de administración de la vacuna incluyeron las siguientes estrategias:

- Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada con Montanide
- 50 - Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500  $\mu$ l de Montanide en combinación con la administración tópica de 225  $\mu$ l de GM-CSF con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria más potente gracias a la administración simultánea de factores de crecimiento
- Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500  $\mu$ l de Montanide en combinación con hipertermia local, esta última con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria más potente por el efecto térmico
- 55 - Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500  $\mu$ l de Montanide en combinación con imiquimod epicutáneo a fin de activar las células dendríticas a través del TLR 7

- Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500 µl de Montanide en combinación con 55 µl de ARNm de mucina-1/protamina a fin de activar las células dendríticas a través de los TLR 7/8

Calendario: La duración total del estudio fue de tres años.

5 Las vacunas con los péptidos específicos de próstata se administraron a los pacientes los días 0, 7, 14, 28, 42 y 56. En los pacientes con enfermedad estable o con respuesta objetiva del tumor (PSA-CR o PSA-PR) las vacunas se administraron una vez al mes por vía i. d. hasta detectar progresión. A tenor de la experiencia hasta la fecha, las inyecciones de péptidos se toleran sin reacciones adversas significativas. Como la respuesta al tratamiento vacunal se evaluó exclusivamente con la serología a través de las concentraciones de PSA, al inicio del estudio se efectuó un análisis para determinar si la vacuna administrada interfería con la medición de las concentraciones de PSA in vitro, de modo que pudiera semejar una respuesta clínica. Los días 0, 7, 14, 28, 42, 56 y 70 se extrajeron muestras de sangre para las analíticas clínicas, la concentración de PSA, el hemograma diferencial, el análisis de FACS y citocinas. Si el tratamiento duraba más de 70 días se practicaba un control regular del PSA cada 6 semanas para detectar oportunamente el fracaso terapéutico.

El tratamiento concluía si se verificaba la progresión de la enfermedad con la elevación continua del PSA.

15 A partir del día 84 el tratamiento de vacunación se administró cada 4 semanas hasta verificar la progresión o hasta el día 420 (15 meses). Las decisiones referentes a la continuación del tratamiento fuera del estudio en los casos de éxito se tomaron de forma individualizada. Durante el estudio no hubo reacciones adversas imprevistas.

20 Las analíticas incluyeron pruebas de coagulación, electrolitos, LDH, β2-M, CK, enzimas hepáticas, bilirrubina, creatinina, ácido úrico, proteína total, coagulación, CRP, hemograma diferencial con extensión, concentración de PSA, citocinas, FACS y Elispot.

El análisis de la reacción cutánea a antígenos bacterianos y fúngicos conocidos (48-72 horas después de la administración, hipersensibilidad retardada (DTH), mediada por linfocitos T, se empleó para analizar el sistema inmunitario celular del paciente antes de iniciar el estudio).

25 Los péptidos necesarios para el estudio (nonapéptidos) se fabricaron en el laboratorio del Dr. Stefan Stevanovic del departamento del catedrático H. G. Rammensee. Los péptidos se purificaron con HPLC y se analizaron con espectrometría de masas. La pureza de los péptidos también se puede verificar con HPLC, espectrometría de masas y secuenciación de Edman. Con estos métodos se puede obtener una pureza de hasta el 98% (que se puede considerar el máximo por el estado actual de los métodos). Los péptidos sintetizados se disolvieron en DMSO (CryoSure, WAK Chemie Medical GmbH; 10 mg/ml), se diluyeron 1:10 con Ampuwa (Fresenius Kabi), y se fraccionaron en alícuotas en condiciones estériles.

Respuesta clínica

En dos pacientes el estudio de TEP-TAC reveló recurrencia local después de detectar el tumor local mediante tacto rectal continuo. En los 17 pacientes restantes la localización de la actividad de la enfermedad no se pudo verificar al acabar el estudio.

35 Los reiterados hemogramas diferenciales y los análisis bioquímicos completos no revelaron anomalías ni cambios durante el estudio.

40 Dieciséis de los 19 pacientes reaccionaron al péptido de la survivina II (IFN-g ELISPOT, +/- ICS) conforme a la SEQ ID N. ° 12. Entre ellos hubo 12 que manifestaron una respuesta de linfocitos T contra la survivina después de la vacunación, dos que ya presentaban linfocitos T anti-survivina antes de ello y otros dos en los que no se pudo determinar si los linfocitos T anti-survivina eran abundantes antes de la vacunación.

Respuesta bioquímica

45 La respuesta completa se definió como todo valor de PSA indetectable según el límite de detección del laboratorio colaborador después de haber presentado inicialmente un valor elevado de PSA. Para confirmar la medición esta tenía que verificarse tras un intervalo mínimo de cuatro semanas. La PR > 80% y > 50% tenían que volver a analizarse al cabo de cuatro semanas. La enfermedad estable se definió como cualquier valor del PSA comprendido entre una reducción inferior al 50% y un aumento inferior al 10% que se volvía a confirmar al cabo de como mínimo cuatro semanas. La enfermedad progresiva se definió como todo aumento del PSA superior al 10% respecto al inicio del tratamiento.

50 La respuesta bioquímica de los pacientes que concluyeron el estudio se siguió controlando hasta que comenzaron a recibir otro tratamiento con radioterapia local o privación de andrógenos.

Diecinueve pacientes accedieron a participar y sus datos se analizaron; el período de seguimiento más largo duró alrededor de 3,75 años.

Estabilidad del PSA y aumento del TD

5 Dos pacientes (10,2%) manifestaron estabilización de los valores de PSA según los susodichos criterios de recidiva bioquímica, por los cuales no se produjo ningún aumento del valor del PSA superior al 10% desde el inicio del tratamiento hasta el final del estudio (Fig. 6, Tablas 10, 11 y 12). El seguimiento de los dos casos se prolongó hasta 14 y 16 meses después de la última aplicación de la vacuna. La duración media de la estabilidad fue de 24 meses (28 y 31) en el momento de la fecha límite de datos con una media de 18 vacunaciones (14 y 20) aplicadas.

10 Uno de los dos pacientes presentó respuesta parcial >50% durante un período de 9 meses, seguida por un período de lento incremento del PSA con un tiempo de duplicación de 20,5 en comparación con los 9,8 meses observados antes del tratamiento. La recidiva inicial del PSA había comenzado 18 meses después de la extirpación de un tumor pT2pN0 Gleason 5.

15 En el análisis de los datos el paciente 8 mostró enfermedad estable desde el inicio del programa de vacunación hacía 28 meses. Pero tuvo que abandonarlo al cabo de 10 meses debido a una reacción alérgica después de recibir la 14<sup>o</sup> vacunación. Presentaba una situación desfavorable con tumor pT3b Gleason 3+4 con un valor mínimo del PSA no inferior a 0,6 ng/ml tras la prostatectomía radical y progresión del PSA tras un declive postquirúrgico inicial. El tiempo de duplicación se frenó pasando de 6,6 a 148 meses.

Ambos pacientes recibieron imiquimod dérmico en el punto de aplicación en cada vacunación peptídica.

Aumento del TD del PSA sin estabilidad del mismo

20 El TD del PSA del paciente 11 aumentó de 1,5 a 10,1 meses en los primeros seis meses del estudio. Como había comenzado con un PSA de 10,8 ng/ml y progresó hasta 17,8 ng/ml se le retiró de los procedimientos del estudio para recibir supresión androgénica en monoterapia sin que se visualizara ninguna lesión maligna en el TEP-TAC. Recibió Aldara como adyuvante.

25 El paciente 16 comenzó con el tratamiento a base de vacuna acompañada de ARNm de la mucina-1/protamina con un tiempo de duplicación de 6,1 meses. La velocidad del PSA se redujo hasta un tiempo de semivida de 2,7 meses durante cinco meses, seguidos por un repunte calculado estadísticamente del TD del PSA de 14,4 meses que continuaba 16 meses después de comenzar el tratamiento. Su PSA inicial de 0,29 ng/ml se redujo a 0,19 ng/ml durante los 5 primeros meses de tratamiento del estudio, volvió a aumentar a 0,4 ng/ml en los 8 meses siguientes y 19 meses después de iniciar el tratamiento concluyó el estudio conforme al protocolo con 0,41 ng/ml.

Progresión del PSA

30 El paciente 5 manifestó progresión durante el estudio según el tiempo de duplicación del PSA calculado antes de recibir las vacunas. No obstante, experimentó un declive del PSA con un tiempo de semivida de 20,2 meses después del final del tratamiento durante un periodo continuo de 10 meses hasta la fecha límite de recogida de datos. Después de concluir las vacunaciones seguía sin recibir ningún tratamiento secundario. El único adyuvante que le fue administrado con las vacunas fue Montanide.

Tabla 10: Tiempo de duplicación del PSA en meses

	Total	%	Media geométrica	Rango del TD
TD del PSA antes de la vacunación, en meses	19		8,3	1,5 – 44,8
TD del PSA al final del estudio o al final del seguimiento	18*		11,2	2,2 -148
Sin cambio del TD del PSA durante la vacunación	11	58		2,2 – 44,8
Elevación del TD del PSA continuaba al final del estudio	4	21		
Sin cambio del TD del PSA durante la vacunación pero después descendió	1	5		
Descenso provisional del PSA o aumento del TD seguido por un descenso del TD	3	16		

35 \* El TD del PSA que presentaba este paciente al final del estudio o al final del seguimiento no quedó incluido. 5 debido al descenso del PSA

7. Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I de la invención al HLA-A\*0201

Objetivo y resumen

El objetivo del análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos de HLA de clase I a la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A\*0201, ya que este es un importante parámetro del mecanismo de acción de IMA950. Las afinidades hacia HLA-A\*0201 de los diez péptidos restringidos a HLA de clase I contenidos en IMA950 y de MET-001 se situaron en el intervalo medio a alto, en tanto que las constantes de disociación ( $K_D$ ) iban de 0,14 (MET-001) a 2,05 nM (CSP-001). Todos los valores recaen en el intervalo definido por el 0,1 del ligando fuerte HBV-001 y el 4,4 del ligando intermedio MUC-001. Estos resultados confirman la fuerte afinidad de unión de todos los péptidos HLA de clase I del candidato a vacuna IMA950 y del MET-001 derivado de MET-005 al alelo HLA-A\*02.

Principio de la prueba

Los complejos estables de HLA/péptido constan de tres moléculas: cadena pesada de HLA, beta-2 microglobulina (b2m) y el ligando peptídico. La actividad de las moléculas de cadena pesada recombinantes y desnaturalizadas del HLA-A\*0201 solas se puede conservar convirtiéndolas en equivalentes funcionales de «moléculas de HLA-A\*0201 vacías». Cuando se diluyen en un tampón acuoso que contiene b2m y un péptido adecuado, estas moléculas se pliegan con rapidez y con eficacia de un modo que depende totalmente del péptido. La disponibilidad de estas moléculas se utiliza en un ensayo ELISA para medir la afinidad de la interacción entre el péptido y la molécula de HLA de clase I (Sylvester-Hvid et al., 2002).

Moléculas recombinantes y purificadas de HLA-A\*0201 se incubaron con b2m y dosis escalonadas del péptido de interés. En lugar del MET-005 entero, que no se une a HLA de clase I, en el análisis se recurrió a MET-001, un producto de unión probada aA\*0-que se genera in vivo a partir de MET-005 con el procesamiento natural del antígeno. La cantidad de complejos de HLA plegados de novo/péptido se determinó con un ELISA cuantitativo. Las constantes de disociación (valores  $K_D$ ) se calcularon con una curva patrón trazada con disoluciones de un complejo HLA/péptido de calibración.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 2. Cuanto más bajo es el valor de  $K_D$  mayor es la afinidad hacia el HLA-A\*0201. La mayoría de los péptidos de IMA950 presentaron afinidades similares y potentes hacia el HLA-A\*0201, con valores comprendidos entre 0,1 (HBV-001, ligando fuerte) y 44,4 nM (MUC-001, ligando intermedio). Por tanto, todos los TUMAP de clase I de IMA950 tienen una afinidad de unión media a alta por la molécula del MHC A\*02.

8. Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase II de la invención al HLA-DR

Objetivo y resumen

Los TUMAP de clase II activan a los linfocitos T cooperadores, que desempeñan un papel esencial ayudando a los CTL activados por los TUMAP restringidos a clase I. Es importante que los péptidos de clase II de IMA950 se unan a varias moléculas HLA de clase II (unión promiscua) para asegurar que la mayoría de los pacientes tratados con el candidato a vacuna IMA950 puedan beneficiarse de la respuesta auxiliar de los linfocitos T cooperadores. El HLA-DR por ejemplo, la molécula de HLA de clase II humana predominante, es muy polimórfico pues se le conocen varios cientos de alelos. Basándose en las frecuencias alélicas conocidas de los haplotipos HLA-DRB1 y algoritmos de unión contrastados, se puede predecir que los dos ligandos de HLA de clase II contenidos en IMA950 –IMA-BIR-002 e IMA-MET-005– son péptidos de unión a HLA-DR promiscuos. En concreto, la probabilidad de que un individuo de raza blanca positivo para HLA-A\*02 exprese como mínimo un alelo HLA-DR adecuado es >90% para los dos TUMAP de clase II de IMA950. Como los demás alelos humanos de clase II HLA-DQ y -DP quedaron excluidos de este cálculo debido a la carencia de datos de frecuencia o de algoritmos de predicción de la unión, seguramente la promiscuidad real será superior. La promiscuidad calculada para los dos TUMAP de clase II de IMA950 recae en el mismo intervalo que la del epítipo pan-DR (PADRE, frecuencia genotípica F proyectada = 93,1%). Asimismo, la unión promiscua de estos péptidos quedó confirmada experimentalmente con ensayos de unión in vitro. Además se pudo demostrar la elevada inmunogenicidad in vivo de IMA-BIR-002 (véase arriba). En suma, estos resultados confirman que MET-005 y BIR-002 son péptidos que se unen con promiscuidad a HLA-DR.

Principio de la predicción de la unión

Con el algoritmo SYFPEITHI desarrollado en la Universidad de Tubinga (Rammensee et al., 1997; Rammensee et al., 1999) se clasificó la unión de los TUMAP de clase II de IMA950 a varios alelos HLA-DR comunes. El algoritmo ha sido utilizado con éxito para identificar epítomos de clase I y II en una amplia gama de antígenos, por ejemplo de los antígenos asociados a tumores humanos TRP2 (clase I) (Sun et al., 2000) y SSX2 (clase II) (Neumann et al., 2004). El valor límite de unión se definió en la puntuación de 18 a partir del análisis de las puntuaciones de unión publicadas sobre ligandos de HLA-DR promiscuos.

Se usaron las frecuencias publicadas de los haplotipos HLA-DR en población de raza blanca positiva para HLA-A\*02 (Mori et al., 1997) y las frecuencias de los haplotipos de alta resolución (Chanock et al., 2004) (véase la Tabla 2). La frecuencia haplotípica es la frecuencia de un alelo dado en un cromosoma individual. Debido a la dotación cromosómica diploide propia de las células de mamífero, la frecuencia genotípica de este alelo es superior y se calcula empleando la ley de Hardy-Weinberg (la frecuencia haplotípica  $G_f$  da como resultado una frecuencia genotípica  $F$  ( $F = 2G_f - G_f^2$ )).

La suma de la frecuencia de los haplotipos DRB1 con la matriz conocida SYFPEITHI y la frecuencia individual conocida entre la población blanca de A\*02+ es 47,8%. Por consiguiente, del restante 52,2% de alelos DRB1 se proyectó la distribución de unión predicha de los TUMAP de clase II porque de esos alelos no hay disponibles datos.

5 Por último, la unión promiscua se define como la unión de un péptido a varios alelos HLA-DR, siendo la probabilidad de expresión de uno de ellos en la población blanca de al menos el 50%.

Principio del ensayo de unión in vitro (ProlImmune REVEAL™)

10 IMA-BIR-002 e IMA-MET-005 se fabricaron con antígenos de especificidad amplia (HLA-DR1 a DR7, que comprenden también los antígenos de especificidad acotada HLA-DR11 a -DR15 (Mori et al., 1997) y se analizaron con el ensayo de unión de MHC:péptido REVEAL™ (ProlImmune, Oxford, RU) para determinar el nivel de incorporación a las moléculas de MHC. En este ensayo, la unión se comparó con la de un ligando de control pasa/no pasa y con un péptido de control positivo para cada antígeno HLA-DR.

Resultados

15 Según la predicción del algoritmo SYFPEITHI, IMA-BIR-002 tiene la probabilidad de unirse a 7/8 de los alelos HLA-DR con el motivo de unión conocido; en el caso del IMA-MET-005 esa probabilidad de unión es de 8/8 alelos (Tabla 11). La probabilidad de que una persona de raza blanca positiva para HLA-A\*02 exprese al menos un alelo HLA-DRB1 adecuado para IMA-BIR-002 es del 92,6% y para IMA-MET-005 es prácticamente del 100%. Por consiguiente, se predice que los dos péptidos de clase II de IMA950 son ligandos promiscuos de HLA-DR.

20 Aunque con este enfoque la frecuencia haplotípica de los alelos HLA-DRB1 que se unen se hubiera sobreestimado en un factor de dos, la frecuencia genotípica seguiría siendo >50% para todos los TUMAP de clase II contenidos en IMA950. Además, la confirmación experimental de la unión promiscua de IMA-BIR-002 a HLA-DR1, 3, 4 y 11 se obtuvo a partir de datos de unión in vitro (Figura 3). En el caso de los datos de unión in vitro de IMA-MET-005 los dos 15-ámeros solapados que abarcan la secuencia completa sugieren la unión a HLA-DR11; no obstante, el ensayo ProlImmune REVEAL™ está pensado como un instrumento de cribado grosero para la identificación de posibles epítomos de HLA de clase II. Con este ensayo los ligandos de HLA-DR que presentan tasas de asociación lentas (on-rates) pueden dar un resultado falso negativo y no ser tomados por ligandos. Por consiguiente, de los datos negativos obtenidos in vitro con ProlImmune REVEAL™ no se puede deducir que la unión a HLA-DR del IMA-MET-005 in vivo no sea promiscua. Es perfectamente posible que el IMA-MET-005 de IMA950 se una de esa forma promiscua al HLA-DR con la vacunación. Como no existen datos suficientes de las propiedades de unión y la frecuencia de los demás locus de clase II, HLA-DQ y -DP, estas moléculas se han excluido del cálculo. No obstante, estas moléculas ofrecen opciones de unión para los TUMAP de clase II de IMA950.

IMA-BIR-002 ha demostrado una amplia inmunogenicidad en un estudio clínico en pacientes con cáncer de próstata portadores de diversos alelos HLA-DR, por lo que la promiscuidad de este péptido de clase II se puede considerar claramente demostrada in vivo.

35 En conclusión, el análisis informático de las propiedades de unión a HLA-DR de los dos péptidos de clase II contenidos en IMA950 y otros datos experimentales procedentes de ensayos in vitro y de un estudio clínico con BIR-002 indican con bastante claridad que estos TUMAP son ligandos promiscuos de las moléculas HLA de clase II humanas.

40 Tabla 11: Puntuaciones de unión de los TUMAP de clase II de IMA950 a alelos HLA-DR con motivo de unión conocido. Se muestran las puntuaciones de unión obtenidas con SYFPEITHI correspondientes a los alelos HLA-DRB1 más frecuentes en la población de raza blanca. El valor p ofrece las frecuencias haplotípicas entre los individuos de raza blanca positivos para HLA-A\*02. Se consideró que el péptido se unía a una molécula HLA si la puntuación era igual o superior a 18. La acumulación de los valores p correspondientes a los alelos DRB1 que se unen da como resultado la frecuencia haplotípica mínima  $p_{\min}$ . La extrapolación de esas frecuencias a todos los alelos DRB1, incluidos aquellos con una matriz de predicción de la unión incompleta o datos de frecuencia incompletos da la frecuencia haplotípica proyectada  $p_{\text{proyectada}}$  que corresponde a la frecuencia genotípica  $F_{\text{proyectada}}$ . s. d. = sin datos

50

55

IMA-BIR-002								
Alelo DRB1*	0101	0301	0401	0404	0701	1101	1104	1501
Puntuación de SYFPEITHI	28	29	28	24	14	32	24	30
p	6,6%	5,9%	9,6%	6,0%	13,0%	4,4%	2,3%	s. d.
Unión predicha	sí	sí	sí	sí	no	sí	sí	sí
p <sub>min</sub>								34,8%
Frecuencia haplotípica p <sub>proyectada</sub>								72,8%
Frecuencia genotípica F <sub>proyectada</sub>								92,6%

IMA-MET-005								
Alelo DRB1*	0101	0301	0401	0404	0701	1101	1104	1501
Puntuación de SYFPEITHI	28	20	26	26	28	20	22	22
p	6,6%	5,9%	9,6%	6,0%	13,0%	4,4%	2,3%	s. d.
Unión predicha	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
p <sub>min</sub>								47,8%
Frecuencia haplotípica p <sub>proyectada</sub>								100,0%
Frecuencia genotípica F <sub>proyectada</sub>								100,0%

Bibliografía

Reference List

- 5 Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CC (2002). Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc. Res.* 63, 159-171.  
  
Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Imran AK (2007). Survivin expression correlates with unfavourable prognoses in invasive ductal carcinoma of the breast. *Med J Malaysia* 62, 6-8.
- 10 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, Heyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.  
  
Angileri FF, Aguenouz M, Conti A, La TD, Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008). Nuclear factor-kappaB activation and differential expression of survivin and Bcl-2 in human grade 2-4 astrocytomas. *Cancer*.
- 15 Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K, Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995). Assignment of the human protein tyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band 7q31.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 70, 52-54.  
  
Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61, 6451-6458.
- 20 Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, Honegger AM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K, . (1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.* 13, 1497-1506.
- 25 Bartsch S, Bartsch U, Dorries U, Faissner A, Weller A, Ekblom P, Schachner M (1992). Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci.* 12, 736-749.

- Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P (2000). Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95, 3964-3969.
- 5 Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC, . (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67, 2376-2380.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
- Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Kloog Y (2006). Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2337-2347.
- 10 Bolliger MF, Frei K, Winterhalter KH, Gloor SM (2001). Identification of a novel neuroligin in humans which binds to PSD-95 and has a widespread expression. *Biochem. J* 356, 581-588.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 251, 802-804.
- 15 Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD (1983). Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 43, 2796-2805.
- Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D (2004). Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol.* 26, 177-181.
- 20 Brekke C, Lundervold A, Enger PO, Brekken C, Stalsett E, Pedersen TB, Haraldseth O, Kruger PG, Bjerkvig R, Chekenya M (2006). NG2 expression regulates vascular morphology and function in human brain tumours. *Neuroimage.* 29, 965-976.
- Burton EC, Prados MD (2000). Malignant gliomas. *Curr. Treat. Options. Oncol* 1, 459-468.
- Campoli MR, Chang CC, Kageshita T, Wang X, McCarthy JB, Ferrone S (2004). Human high molecular weight-melanoma-associated antigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan (MSCP) with biological and clinical significance. *Crit Rev. Immunol.* 24, 267-296.
- 25 Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F, Belli F, Mezzanzanica D, Costa A, Andreola S, Leo E, Parmiani G, Castelli C (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 63, 4507-4515.
- CBTRUS. Primary Brain Tumors in the United States, Statistical Report. 2006. Ref Type: Internet Communication
- 30 Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002). Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20, 1063-1068.
- Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, O'Hanlon TP (2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. *Hum. Immunol.* 65, 1211-1223.
- 35 Chekenya M, Enger PO, Thorsen F, Tysnes BB, Al-Sarraj S, Read TA, Furmanek T, Mahesparan R, Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ, Bjerkvig R (2002a). The glial precursor proteoglycan, NG2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 28, 367-380.
- Chekenya M, Hjelstuen M, Enger PO, Thorsen F, Jacob AL, Probst B, Haraldseth O, Pilkington G, Butt A, Levine JM, Bjerkvig R (2002b). NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. *FASEB J* 16, 586-588.
- 40 Chekenya M, Immervoll H (2007). NG2/HMP proteoglycan as a cancer therapeutic target. *Methods Mol. Biol.* 361, 93-117.
- Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A, Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, Selheim F, Wang J, Sakariassen PO, Sandal T, Lonning PE, Flatmark T, Enger PO, Bjerkvig R, Sioud M, Stallcup WB (2008). The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene.*
- 45 Chekenya M, Pilkington GJ (2002). NG2 precursor cells in neoplasia: functional, histogenesis and therapeutic implications for malignant brain tumours. *J Neurocytol.* 31, 507-521.
- Chekenya M, Rooprai HK, Davies D, Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ (1999). The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: role in malignant progression of human brain tumours. *Int J Dev. Neurosci.* 17, 421-435.
- Chiquet-Ehrismann R (1993). Tenascin and other adhesion-modulating proteins in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 4,

301-310.

Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 200, 488-499.

5 Conacci-Sorrell M, Kaplan A, Raveh S, Gavert N, Sakurai T, Ben-Ze'ev A (2005). The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res.* 65, 11605-11612.

Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A (2002). Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2058-2072.

10 Corso S, Migliore C, Ghiso E, De RG, Comoglio PM, Giordano S (2008). Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* 27, 684-693.

Davis JQ, Bennett V (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol. Chem.* 269, 27163-27166.

15 Dazzi C, Cariello A, Giannini M, Del DM, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De GU, Marangolo M (2000). A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res.* 20, 515-518.

Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S, . (1995). Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 147-154.

20 Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM (2000). Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 19, 1547-1555.

Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA (1999). Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol.* 100, 216-232.

25 Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT, Bancroft CC, Van WC (2001). Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 61, 5911-5918.

Ebert M, Yokoyama M, Friess H, Buchler MW, Korc M (1994). Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 54, 5775-5778.

30 Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R, Loges S, Westphal M, Lamszus K (2007). Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *Int J Cancer* 121, 276-283.

Erfurt C, Sun Z, Haendle I, Schuler-Thurner B, Heirman C, Thielemans K, van der BP, Schuler G, Schultz ES (2007). Tumor-reactive CD4+ T cell responses to the melanoma-associated chondroitin sulphate proteoglycan in melanoma patients and healthy individuals in the absence of autoimmunity. *J Immunol.* 178, 7703-7709.

35 Feng L, Hatten ME, Heintz N (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895-908.

Feng L, Heintz N (1995). Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* 121, 1719-1730.

40 Ferracini R, Di Renzo MF, Scotlandi K, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM (1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. *Oncogene* 10, 739-749.

Fischer J, Palmedo G, von KR, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.

45 Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GF, Webb CP (2001). Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10722-10727.

Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 19, 5582-5589.

Garcion E, Halilagic A, Faissner A, ffrench-Constant C (2004). Generation of an environmental niche for neural stem

- cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423-3432.
- Gary SC, Kelly GM, Hockfield S (1998). BEHAB/brevican: a brain-specific lectican implicated in gliomas and glial cell motility. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 576-581.
- 5 Gary SC, Zerillo CA, Chiang VL, Gaw JU, Gray G, Hockfield S (2000). cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma. *Gene* 256, 139-147.
- Gebbink MF, van E, I, Hateboer G, Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA, Moolenaar WH (1991). Cloning, expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like protein tyrosine phosphatase. *FEBS Lett.* 290, 123-130.
- 10 Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol. Chem.* 283, 5188-5194.
- Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, Cooper CS, Comoglio PM (1989). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature* 339, 155-156.
- 15 Glass R, Synowitz M, Kronenberg G, Walzlein JH, Markovic DS, Wang LP, Gast D, Kiwit J, Kempermann G, Kettenmann H (2005). Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J Neurosci.* 25, 2637-2646.
- Glatz JF, Luiken JJ, van BM, van d, V (2002). Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism. *Mol. Cell Biochem.* 239, 3-7.
- 20 Glatz JF, Storch J (2001). Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 267-274.
- Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D, Day RS, III (1998). Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene* 16, 1955-1962.
- 25 Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, Cunningham BA (1991). Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol.* 113, 1399-1412.
- Grunda JM, Nabors LB, Palmer CA, Chhieng DC, Steg A, Mikkelsen T, Diasio RB, Zhang K, Allison D, Grizzle WE, Wang W, Gillespie GY, Johnson MR (2006). Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol.* 80, 261-274.
- 30 Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M, Lamszus K (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 27, 2897-2909.
- Harroch S, Furtado GC, Brueck W, Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002). A critical role for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functional recovery from demyelinating lesions. *Nat. Genet.* 32, 411-414.
- 35 Hau P, Kunz-Schughart LA, Rummele P, Arslan F, Dorfelt A, Koch H, Lohmeier A, Hirschmann B, Muller A, Bogdahn U, Bosserhoff AK (2006). Tenascin-C protein is induced by transforming growth factor-beta1 but does not correlate with time to tumor progression in high-grade gliomas. *J Neurooncol.* 77, 1-7.
- 40 Heimberger AB, Hussain SF, Aldape K, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, Sampson JH. Tumor-specific peptide vaccination in newly-diagnosed patients with GBM. *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529. 20-6-2006.
- Herold-Mende C, Mueller MM, Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int. J Cancer* 98, 362-369.
- 45 Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 112, 1471-1479.
- Hu B, Kong LL, Matthews RT, Viapiano MS (2008). The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. *J Biol. Chem.*
- 50 Huang PH, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007a). Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systems

biology approach. *Cell Cycle* 6, 2750-2754.

Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007b). Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 12867-12872.

- 5 Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27-29.

Jaworski DM, Fager N (2000). Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expression during rat CNS development. *J Neurosci. Res.* 61, 396-408.

- 10 Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S (1999). Intracranial injury acutely induces the expression of the secreted isoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. *Exp. Neurol.* 157, 327-337.

Jaworski DM, Kelly GM, Piepmeier JM, Hockfield S (1996). BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) is expressed in surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive glioma cell lines. *Cancer Res.* 56, 2293-2298.

- 15 Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Rock KL, Liu Q, Hsieh CC, Li C, Chen W, Duan HO, McDougal S, Wu CL (2006). Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 7, 556-564.

Jiang Z, Lohse CM, Chu PG, Wu CL, Woda BA, Rock KL, Kwon ED (2008). Oncofetal protein IMP3: a novel molecular marker that predicts metastasis of papillary and chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer* 112, 2676-2682.

- 20 Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.

Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2003). Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 97, 1077-1083.

- 25 Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C, Taillibert S, Lejeune J, Marie Y, Delattre JY, Godbout R, Sanson M (2007). FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *J Neurooncol.* 84, 245-248.

Kammula US, Kuntz EJ, Francone TD, Zeng Z, Shia J, Landmann RG, Paty PB, Weiser MR (2007). Molecular co-expression of the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome. *Cancer Lett.* 248, 219-228.

- 30 Kaplan R, Morse B, Huebner K, Croce C, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990). Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7000-7004.

Kendall SE, Najbauer J, Johnston HF, Metz MZ, Li S, Bowers M, Garcia E, Kim SU, Barish ME, Aboody KS, Glackin CA (2008). Neural Stem Cell Targeting of Glioma is Dependent on PI3K Signaling. *Stem Cells.*

- 35 Kim CH, Bak KH, Kim YS, Kim JM, Ko Y, Oh SJ, Kim KM, Hong EK (2000). Expression of tenascin-C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg Neurol.* 54, 235-240.

Knutson KL, Disis ML (2005). Augmenting T helper cell immunity in cancer. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 5, 365-371.

Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997). Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res.* 57, 5391-5398.

- 40 Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Chevillie JC, Vasmataz G (2005). Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res.* 11, 5128-5139.

Krueger NX, Streuli M, Saito H (1990). Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases. *EMBO J* 9, 3241-3252.

- 45 Kucharczak J, Pannequin J, Camby I, Decaestecker C, Kiss R, Martinez J (2001). Gastrin induces over-expression of genes involved in human U373 glioblastoma cell migration. *Oncogene* 20, 7021-7028.

Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Muller T (1994). The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120, 2637-2649.

- Lal A, Peters H, St CB, Haroon ZA, Dewhirst MW, Strausberg RL, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Riggins GJ (2001). Transcriptional response to hypoxia in human tumors. *J Natl. Cancer Inst.* 93, 1337-1343.
- 5 Laumonnier F, Bonnet-Brilhaut F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum. Genet.* 74, 552-557.
- Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, Picker J (2008). Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur. J Hum. Genet.* 16, 614-618.
- 10 Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O, Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T. (1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J Biol. Chem.* 268, 10573-10581.
- Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20, 8125-8135.
- 15 Li L, Xu H, Spaulding BO, Cheng L, Simon R, Yao JL, di Sant'agnese PA, Bourne PA, Huang J (2008). Expression of RNA-binding protein IMP3 (KOC) in benign urothelium and urothelial tumors. *Hum. Pathol.*
- Liang Y, Bollen AW, Aldape KD, Gupta N (2006). Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC. Cancer* 6, 97.
- 20 Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO, Israel MA (2005). Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 5814-5819.
- Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol. Chem.* 280, 18517-18524.
- Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q (2006). Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 905-913.
- 25 Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, Sette A (1997). The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159, 1383-1392.
- 30 Lo ML, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De RG, Altieri DC (2001). Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 249-254.
- Long IS, Han K, Li M, Shirasawa S, Sasazuki T, Johnston M, Tsao MS (2003). Met receptor overexpression and oncogenic Ki-ras mutation cooperate to enhance tumorigenicity of colon cancer cells in vivo. *Mol. Cancer Res.* 1, 393-401.
- 35 Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J, Dia EQ, Yoshimoto K, Wang MY, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS (2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by two forms of pleiotrophin. *J Biol Chem.* 280, 26953-26964.
- Macdonald DR (2001). Temozolomide for recurrent high-grade glioma. *Semin. Oncol* 28, 3-12.
- Mackie EJ, Halfter W, Liverani D (1988). Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol.* 107, 2757-2767.
- 40 Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, Gorunova L, Hoglund M, Karhu R, Kallioniemi A (2002). Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 35, 353-358.
- Maulik G, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, Lin J, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, Salgia R (2002). Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 620-627.
- Mellai M, Caldera V, Patrucco A, Annovazzi L, Schiffer D (2008). Survivin expression in glioblastomas correlates with proliferation, but not with apoptosis. *Anticancer Res.* 28, 109-118.
- 45 Miller SJ, Li H, Rizvi TA, Huang Y, Johansson G, Bowersock J, Sidani A, Vitullo J, Vogel K, Parysek LM, DeClue JE, Ratner N (2003). Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactions and peripheral nerve tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* 23, 2213-2224.
- Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, Sung R, Sun X, Godbout R (2007). B-FABP-expressing radial glial cells: the malignant glioma cell of origin? *Neoplasia.* 9, 734-744.

- Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*
- 5 Mizuno K, Higuchi O, Ihle JN, Nakamura T (1993). Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 178-186.
- Molenkamp BG, Vuylsteke RJ, van Leeuwen PA, Meijer S, Vos W, Wijnands PG, Scheper RJ, de Gruijl TD (2005). Matched skin and sentinel lymph node samples of melanoma patients reveal exclusive migration of mature dendritic cells. *Am. J Pathol.* 167, 1301-1307.
- 10 Mondino A, Giordano S, Comoglio PM (1991). Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor). *Mol. Cell Biol.* 11, 6084-6092.
- Montesano R, Soriano JV, Malinda KM, Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, Aaronson SA (1998). Differential effects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelial tubulogenesis. *Cell Growth Differ.* 9, 355-365.
- 15 Morales G, Hubert M, Brummendorf T, Treubert U, Tarnok A, Schwarz U, Rathjen FG (1993). Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. *Neuron* 11, 1113-1122.
- Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. *Transplantation* 64, 1017-1027.
- 20 Moriyama T, Kataoka H, Koono M, Wakisaka S (1999). Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met in brain tumors: evidence for a role in progression of astrocytic tumors (Review). *Int J Mol. Med* 3, 531-536.
- Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, Micha A, Zimmerhackl F, Hameister H, Varga G, Friess H, Buchler M, Begler HG, Vila MR, Adler G, Gress TM (1997). Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 14, 2729-2733.
- 25 Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C, Gorman P, Sasieni P, Adams J, Jones TA, Babbage JW, Vatcheva R, Ichimura K, East P, Poullikas C, Collins VP, Carter NP, Tomlinson IP, Sheer D (2006). Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle* 5, 783-791.
- 30 Nakaigawa N, Yao M, Baba M, Kato S, Kishida T, Hattori K, Nagashima Y, Kubota Y (2006). Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma. *Cancer Res.* 66, 3699-3705.
- Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6, 501-504.
- 35 Nam DH, Kong DS, Kyeung MJ, Kim S. c-MET: A Potential Candidate of Glioblastoma Cancer Stem Cell Targeted Marker. The Role of Cancer Stem Cells in the Initiation and Propagation of Tumorigenesis - An AACR Special Conference in Cancer Research, Los Angeles. Conference Proceedings, A45. 12-2-2008. 12-2-0080. Ref Type: Conference Proceeding
- 40 Napolitano M, Keime-Guibert F, Monjour A, Lafitte C, Ameri A, Cornu P, Broet P, Delattre JY (1999). Treatment of supratentorial glioblastoma multiforme with radiotherapy and a combination of BCNU and tamoxifen: a phase II study. *J Neurooncol.* 45, 229-235.
- Neumann F, Wagner C, Kubuschok B, Stevanovic S, Rammensee HG, Pfreundschuh M (2004). Identification of an antigenic peptide derived from the cancer-testis antigen NY-ESO-1 binding to a broad range of HLA-DR subtypes. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 589-599.
- 45 Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000). A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat. Rev.* 26, 397-409.
- Nutt CL, Matthews RT, Hockfield S (2001). Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage of BEHAB/brevican. *Neuroscientist.* 7, 113-122.
- O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M (2003). Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. *Curr. Cancer Drug Targets.* 3, 131-152.
- 50 Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Udaka K, Dohy

- H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13885-13890.
- 5 Olivero M, Valente G, Bardelli A, Longati P, Ferrero N, Cracco C, Terrone C, Rocca-Rossetti S, Comoglio PM, Di Renzo MF (1999). Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosine kinase in a HPRCC family. *Int. J Cancer* 82, 640-643.
- Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tarnawski AS (2003). Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors. *FASEB J* 17, 1640-1647.
- 10 Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF (1986). Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45, 895-904.
- Park WS, Dong SM, Kim SY, Na EY, Shin MS, Pi JH, Kim BJ, Bae JH, Hong YK, Lee KS, Lee SH, Yoo NJ, Jang JJ, Pack S, Zhuang Z, Schmidt L, Zbar B, Lee JY (1999). Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 59, 307-310.
- 15 Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O, Menendez-Rodriguez P, Mortimer J, Chang Y, Astudillo A, Deuel TF (2007). The receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP)beta/zeta is expressed in different subtypes of human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 5-10.
- Perrin FE, Rathjen FG, Stoeckli ET (2001). Distinct subpopulations of sensory afferents require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. *Neuron* 30, 707-723.
- 20 Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM, Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157-173.
- Piesche M, Hildebrandt Y, Zettl F, Chapuy B, Schmitz M, Wulf G, Trumper L, Schroers R (2007). Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Hum. Immunol.* 68, 572-576.
- 25 Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, Comoglio PM (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol. Cell Biol.* 13, 4600-4608.
- Prados MD, Levin V (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin. Oncol* 27, 1-10.
- 30 Prakash S, Sarran L, Socci N, DeMatteo RP, Eisenstat J, Greco AM, Maki RG, Wexler LH, LaQuaglia MP, Besmer P, Antonescu CR (2005). Gastrointestinal stromal tumors in children and young adults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases and review of the literature. *J Pediatr. Hematol. Oncol* 27, 179-187.
- Previsani, N. and Lavanchy, D.: Hepatitis B (internal immatics research report)
- Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 21, 431-437.
- 35 Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT (2002). Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 62, 589-596.
- Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Park M, Schwall R, Elliott B (1996). Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma. *Cell Growth Differ.* 7, 263-270.
- 40 Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL (2000). Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 53, 635-644.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- 45 Rammensee, H.G., Bachmann, J., and Stevanovic, S. (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 213-244.
- Rasola A, Fassetta M, De BF, D'Alessandro L, Gramaglia D, Di Renzo MF, Comoglio PM (2007). A positive feedback

- loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. *Oncogene* 26, 1078-1087.
- Reardon DA, Cloughesy TF, Raizer JJ, Laterra J, Schiff D, Yang X, Loh E, Wen PY. Phase II study of AMG 102, a fully human neutralizing antibody against hepatocyte growth factor/scatter factor, in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *ASCO Meeting Abstracts* 26 (May 20 suppl)[2051]. 20-5-2008.
- Rehermann B, Nascimbeni M (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 215-229.
- Reznik TE, Sang Y, Ma Y, Abounader R, Rosen EM, Xia S, Laterra J (2008). Transcription-dependent epidermal growth factor receptor activation by hepatocyte growth factor. *Mol. Cancer Res.* 6, 139-150.
- Roth W, Weller M (1999). Chemotherapy and immunotherapy of malignant glioma: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* 56, 481-506.
- Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA (1993). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-met proto-oncogene product. *Biochim. Biophys. Acta* 1155, 357-371.
- Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, Hamou MF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-Ehrismann R, Orend G (2004). Growth promoting signaling by tenascin-C [corrected]. *Cancer Res.* 64, 7377-7385.
- Sablotzki A, Ebel H, Muhling J, Dehne MG, Nopens H, Giesselmann H, Hempelmann G (2000). Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44, 82-87.
- Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K (2007). Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol.* 82, 193-198.
- Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001). Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol.* 154, 1259-1273.
- Sakurai T, Lustig M, Nativ M, Hemperly JJ, Schlessinger J, Peles E, Grumet M (1997). Induction of neurite outgrowth through contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptor tyrosine phosphatase beta. *J Cell Biol.* 136, 907-918.
- Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA (2002). Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 104, 105-109.
- Sato F, Abraham JM, Yin J, Kan T, Ito T, Mori Y, Hamilton JP, Jin Z, Cheng Y, Paun B, Berki AT, Wang S, Shimada Y, Meltzer SJ (2006). Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specific promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 465-471.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 16, 68-73.
- Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G, Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande WG, Neumann H, Walther M, Linehan WM, Zbar B (1998). Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene. *Cancer Res.* 58, 1719-1722.
- Sehgal A, Boynton AL, Young RF, Vermeulen SS, Yonemura KS, Kohler EP, Aldape HC, Simrell CR, Murphy GP (1998). Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. *Int J Cancer* 76, 451-458.
- Sehgal A, Ricks S, Warrick J, Boynton AL, Murphy GP (1999). Antisense human neuroglia related cell adhesion molecule hNr-CAM, reduces the tumorigenic properties of human glioblastoma cells. *Anticancer Res.* 19, 4947-4953.
- Seyfried TN (2001). Perspectives on brain tumor formation involving macrophages, glia, and neural stem cells. *Perspect. Biol. Med* 44, 263-282.
- Shimizu F, Watanabe TK, Shinomiya H, Nakamura Y, Fujiwara T (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochim. Biophys. Acta* 1354, 24-28.

- Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, Woda BA, Lu D, Dresser K, Mohanty S, Rock KL, Jiang Z (2008). IMP3 predicts aggressive superficial urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 14, 1701-1706.
- Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB (2004). Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem.* 50, 1986-1993.
- 5 Stoeckli ET, Landmesser LT (1995). Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the in vivo guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 14, 1165-1179.
- Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C, Paschen A, Rammensee HG, Schadendorf D (2000). Identification of a new HLA-A(\*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* 87, 399-404.
- 10 Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R, Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang HJ, Hoon DS (2003). c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases. *Clin Cancer Res.* 9, 1480-1488.
- Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS (2005). Expression of a novel apoptosis inhibitor-survivin in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 11, 4689-4692.
- 15 Trusolino L, Comoglio PM (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 289-300.
- Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF (2006). Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res.* 66, 159-167.
- 20 Tuck AB, Park M, Sterns EE, Boag A, Elliott BE (1996). Coexpression of hepatocyte growth factor and receptor (Met) in human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 148, 225-232.
- Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S (2005). Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J Neurooncol.* 72, 231-238.
- 25 van der Voort R, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M, Pals ST (1997). Paracrine regulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocyte growth factor/scatter factor pathway. *J Exp. Med* 185, 2121-2131.
- Veerkamp JH, Zimmerman AW (2001). Fatty acid-binding proteins of nervous tissue. *J Mol. Neurosci.* 16, 133-142.
- 30 Viapiano MS, Bi WL, Piepmeier J, Hockfield S, Matthews RT (2005). Novel tumor-specific isoforms of BEHAB/brevican identified in human malignant gliomas. *Cancer Res.* 65, 6726-6733.
- Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT (2008). BEHAB/brevican requires ADAMTS-mediated proteolytic cleavage to promote glioma invasion. *J Neurooncol.*
- Viapiano MS, Matthews RT (2006). From barriers to bridges: chondroitin sulfate proteoglycans in neuropathology. *Trends Mol. Med* 12, 488-496.
- 35 Volkmer H, Leuschner R, Zacharias U, Rathjen FG (1996). Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *J Cell Biol.* 135, 1059-1069.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.
- 40 Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE, Yarchoan R (2005). Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. *Cancer Res.* 65, 3299-3306.
- Wiranowska M, Ladd S, Smith SR, Gottschall PE (2006). CD44 adhesion molecule and neuro-glial proteoglycan NG2 as invasive markers of glioma. *Brain Cell Biol.* 35, 159-172.
- 45 Wu CW, Kao HL, Li AF, Chi CW, Lin WC (2006). Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancer tissues. *Cancer Lett.* 242, 95-103.
- Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006). Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br. J Cancer* 94, 108-114.
- Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, Haga Y, Murayama T, Ikei S, Kamei M, Takeno S, Kawahara K (2007). Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. *Anticancer Res.* 27, 2803-2808.

- Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB (2004). Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. *J Cell Biol.* 165, 881-891.
- 5 Yantiss RK, Cosar E, Fischer AH (2008). Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsies of pancreas. *Acta Cytol.* 52, 133-138.
- Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR, Kalos M, Whalen GF, Tada H, Andersen DK, Rock KL, Dresser K (2005). KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 29, 188-195.
- 10 Zacharias U, Norenberg U, Rathjen FG (1999). Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C. *J Biol. Chem.* 274, 24357-24365.
- Zarnegar R, Michalopoulos GK (1995). The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J. Cell Biol.* 129, 1177-1180.
- 15 Zeng Z, Weiser MR, D'Alessio M, Grace A, Shia J, Paty PB (2004). Immunoblot analysis of c-Met expression in human colorectal cancer: overexpression is associated with advanced stage cancer. *Clin Exp. Metastasis* 21, 409-417.
- Zhang H, Kelly G, Zerillo C, Jaworski DM, Hockfield S (1998). Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrix protein mediates glioma cell invasion *In vivo*. *J Neurosci.* 18, 2370-2376.
- 20 Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL (2005). Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* 104, 2775-2783.
- Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE, Jiang Z (2008). The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 32, 304-315.
- Ziu M, Schmidt NO, Cargioli TG, Aboody KS, Black PM, Carroll RS (2006). Glioma-produced extracellular matrix influences brain tumor tropism of human neural stem cells. *J Neurooncol.* 79, 125-133.
- 25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Composición de péptidos asociados a tumores y vacuna contra el  
5 cáncer relacionada con ellos para el tratamiento del glioblastoma  
(GBM) y de otros tipos de cáncer

<130> FB20731

10 <160> 13

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

20

Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala

1 5

<210> 2

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

30

Leu Thr Phe Gly Asp Val Val Ala Val

1 5

<210> 3

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Leu Asp Thr Leu Met Thr Tyr Val

1                    5

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 4

Ala Met Thr Gln Leu Leu Ala Gly Val

1                    5

15

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 5

Gly Leu Trp His His Gln Thr Glu Val

1                    5

25

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 6

Lys Ile Gln Glu Ile Leu Thr Gln Val

1                    5

35

<210> 7

<211> 9

ES 2 536 465 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

5

Ala Leu Trp Ala Trp Pro Ser Glu Leu

1 5

<210> 8

10

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

15

Thr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr

1 5 10 15

Gly

20

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 9

Ala Ile Ile Asp Gly Val Glu Ser Val

1 5

30

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 10

# ES 2 536 465 T3

Lys Val Phe Ala Gly Ile Pro Thr Val

1                    5

<210> 11

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

10

Ser Leu Trp Ala Gly Val Val Val Leu

1                    5

<210> 12

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

20

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn

1                    5                    10                    15

<210> 13

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

30 Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val

1                    5                    10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.Composición farmacéutica, que comprende un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 2, y un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 3, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 2.La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, comprendiendo, además, como mínimo otro péptido adicional constituido por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID N.º 1, y las SEQ ID N.º 4 a SEQ ID N.º 12.
- 10 3.La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en la que al menos un péptido incluye enlaces no peptídicos.
- 4.La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la selección, el número y/o cantidad de péptidos presentes en la composición es/son específicos de tejido, de cáncer y/o de paciente.
- 15 5.La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, un adyuvante adecuado, seleccionado del grupo consistente en 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870. 893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vector PepTel, micropartículas PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas
- 20 pseudovíricas, YF-17D, QS21 stimulon de Aquila, Detox de Ribi. Quil, Superfos, adyuvante de Freund, GM-CSF, toxina del cólera, adyuvantes inmunitarios, MF59 y citocinas.
- 6.La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 5, en la que el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), o imiquimod o resiquimod.
- 25 7.La composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que, además, contiene al menos una célula presentadora de antígeno.
- 8.La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7, en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.
- 30 9.La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 7 u 8, en la que al menos una célula presentadora de antígeno es
- a) expuesta a pulsos o cargada con el péptido, o
- b) comprende un constructo de expresión que codifica el péptido.
- 35 10.La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición está destinada a la administración por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, dérmica, nasal, yugal, rectal, vaginal, por inhalación o tópica.
- 11.Una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el uso en el tratamiento o en la prevención del cáncer en un paciente.
- 40 12.La composición farmacéutica para el uso de conformidad con la reivindicación 11, que es una vacuna contra el cáncer.
- 45 13. La composición farmacéutica para uso de conformidad con la reivindicación 12, en que el cáncer es un cáncer de la cavidad bucal o la faringe, cáncer del tubo digestivo, cáncer de colon, recto o ano, cáncer de las vías respiratorias, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, vagina o vulva, cáncer del cuerpo uterino y de ovario, cáncer de las vías genitales masculinas, cáncer de las vías urinarias, cáncer de hueso y tejido blando, sarcoma de Kaposi, melanoma cutáneo, melanoma ocular, y cáncer ocular no melanómico, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de tiroides y de otras glándulas endocrinas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano y mieloma, además de cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de estómago, GIST o glioblastoma.
- 14.La composición farmacéutica para el uso de conformidad con la reivindicación 13, en que el cáncer es cáncer colorrectal.

Figura 1: Inmunogenicidad in vitro de ejemplo de los TUMAP de clase I de IMA950

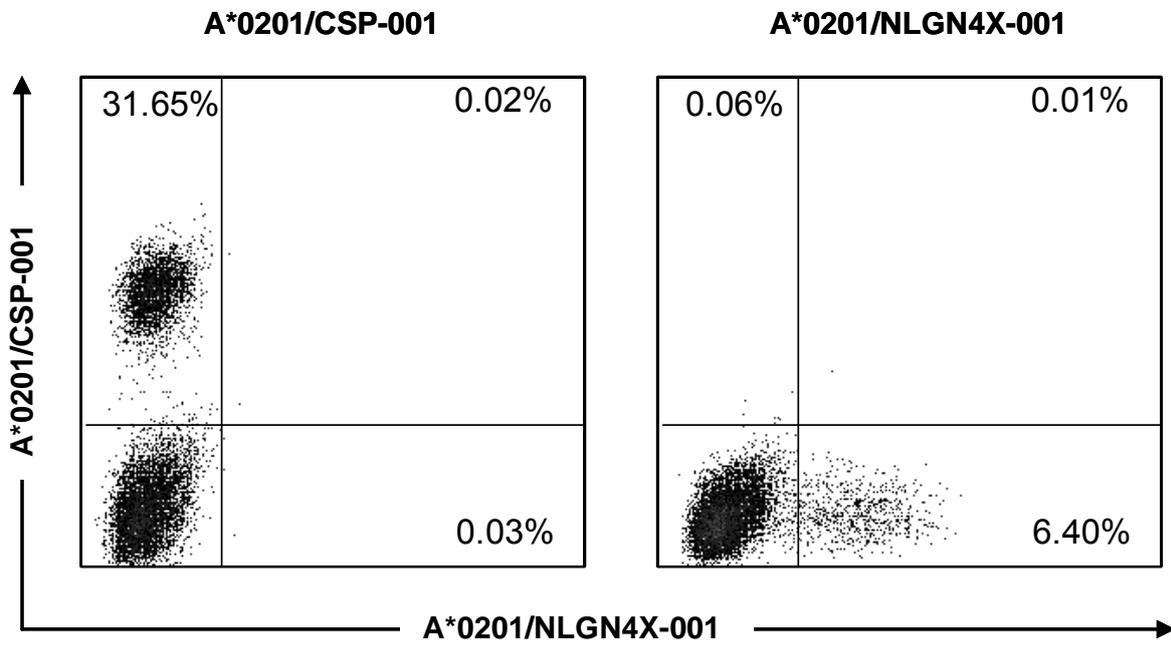


Figura 2: Unión *in vitro* de los péptidos de clase II de IMA950 a alelos HLA-DR

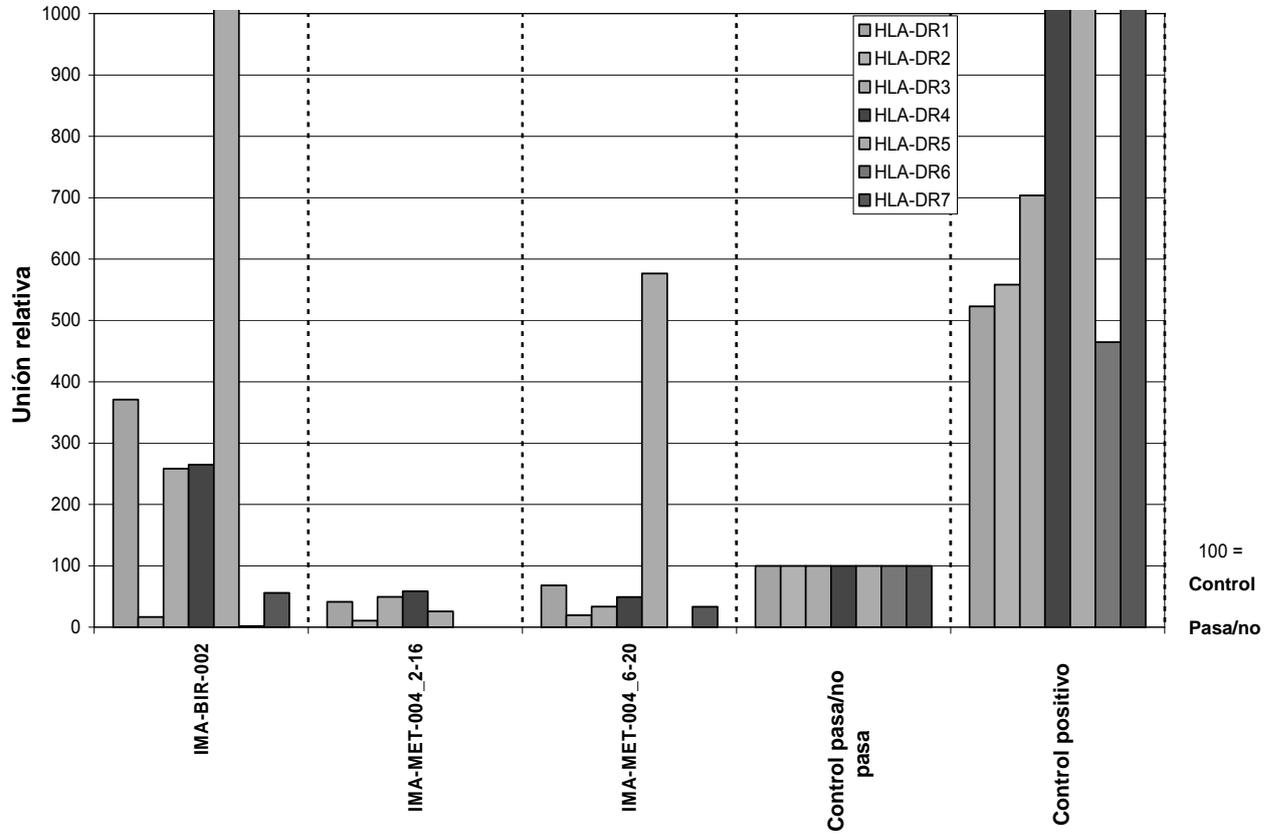


Figura 3: Afinidades de unión *in vitro* de los TUMAP de clase I de IMA950 aA\*02

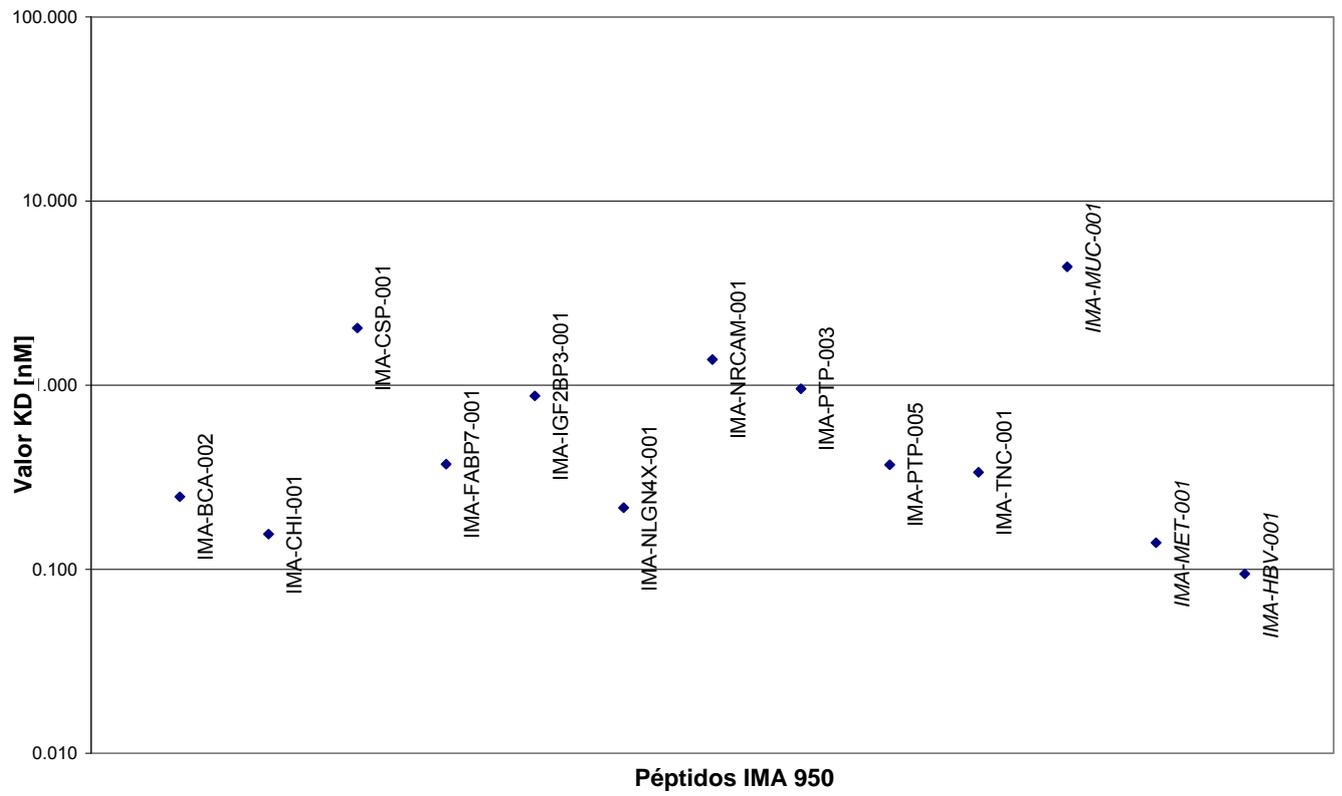


Figura 4: ELISpot para interferón gamma

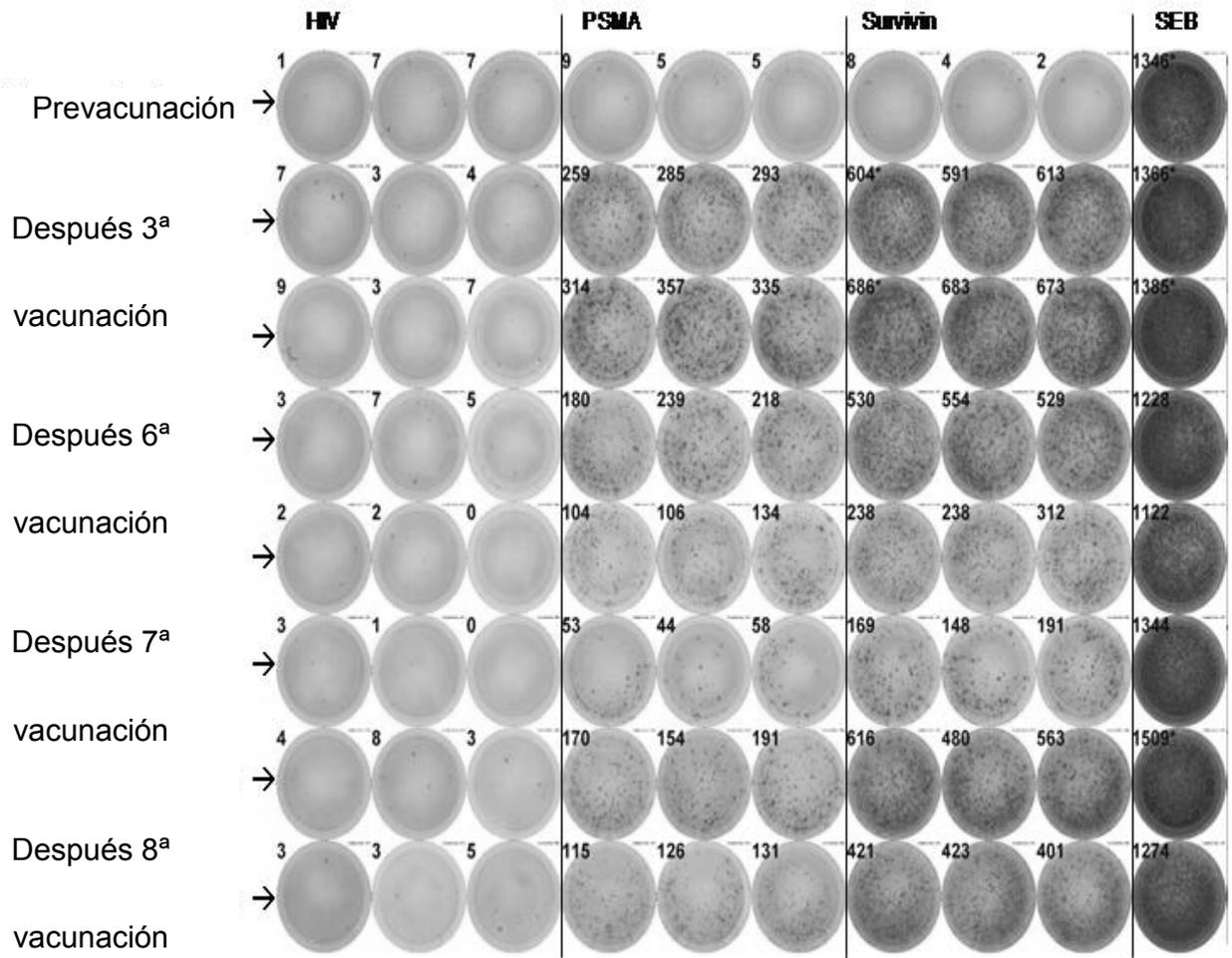


Figura 4b: ELISpot para interferón gamma

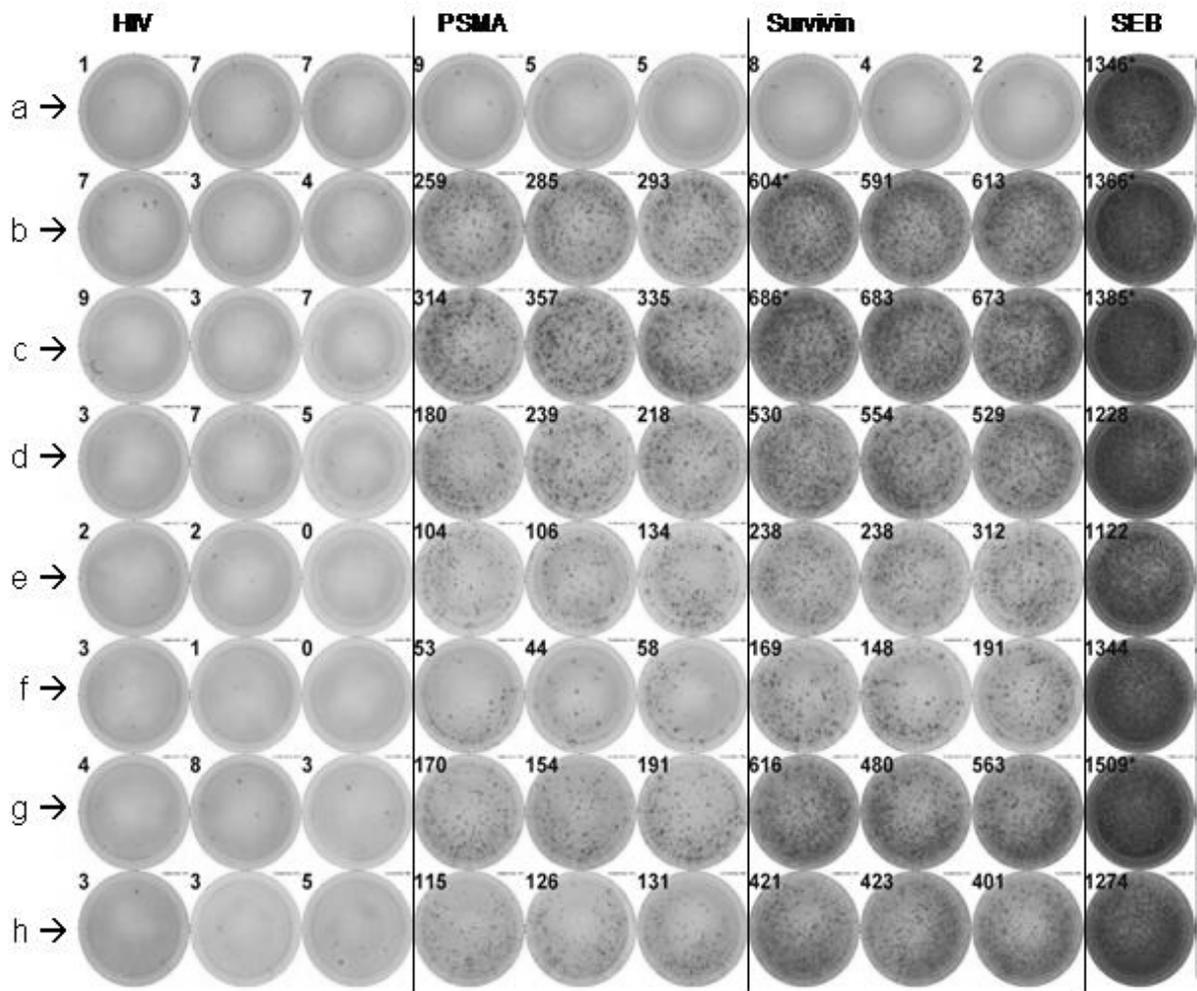


Figura 5

