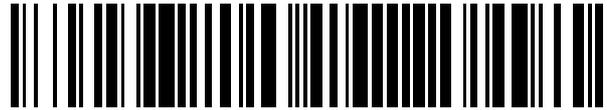


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 157**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2010 E 10744895 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2467155**

54 Título: **Vacuna multiepitópica contra los cánceres asociados con Her2/neu**

30 Prioridad:

18.08.2009 EP 09010627

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

02.03.2016

73 Titular/es:

**BIOLIFE SCIENCE QLD LIMITED (100.0%)
66 Eagle Street
Brisbane, QLD 4000, AU**

72 Inventor/es:

**KAMMER, ANDREAS;
AMACKER, MARIO y
ZURBRIGGEN, RINALDO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 562 157 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

Vacuna multiepitópica contra los cánceres asociados con Her2/neu

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos de fusión que comprenden fragmentos de la proteína relacionada con el cáncer Her2/neu, métodos de preparación de dichos péptidos fusión, virosomas que comprenden dichos péptidos de fusión, y usos de dichos péptidos de fusión y/o virosomas para la prevención, el tratamiento y/o la mejora de un
10 cáncer caracterizado por la expresión o la sobreexpresión de la proteína Her2/neu.

Antecedentes de la invención

15 El antígeno tumoral Her2/neu, codificado por el protooncogén erbB2/neu, es una proteína de 185 kDa que pertenece a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano. Consiste en un dominio extracelular rico en cisteína (ECD, desde el aminoácido 23 al 652) con varios sitios de glicosilación, un dominio transmembrana hidrófobo (desde el aminoácido 653 al 675) y un dominio tirosina quinasa intracelular (desde el aminoácido 676 al 1255). El receptor Her2/neu se expresa en la membrana celular de una variedad de tipos de células epiteliales, y regula aspectos de crecimiento y división celular a través de la unión de factores de crecimiento específicos.
20 Her2/neu se expresa a niveles bajos en muchas células normales, pero se sobreexpresa en una variedad de cánceres, incluyendo el cáncer de mama, de ovario, de endometrio, gástrico, de páncreas, de próstata y de glándula salival.

Por ejemplo, se ha demostrado que aproximadamente el 30 % de los cánceres de mama metastásicos sobreexpresan Her2/neu. Dicha sobreexpresión se asocia con un mal pronóstico para el paciente con cáncer de mama, ya que corresponde a una reducción de los períodos sin recaída y a un menor tiempo de supervivencia. En la actualidad, las formas más comunes de tratamiento del cáncer de mama implican cirugía, intervención química y/o radioterapia. A menos que el cáncer se restrinja a una zona definida, la cirugía sola no puede eliminar el cáncer. La radioterapia así como la quimioterapia pueden implicar graves efectos secundarios negativos.
25

En vista de las desventajas de las actuales terapias, se han hecho intentos por encontrar metodologías adicionales para el tratamiento, por ejemplo, del cáncer de mama. Una de dichas metodologías es la inmunoterapia. Una de las dianas para una metodología inmunoterapéutica es la proteína Her2/neu.
30

Las implicaciones clínicas de la sobreexpresión de Her2/neu en los tumores han hecho de Her2/neu una diana atractiva para la inmunoterapia mediada por anticuerpos como complemento a la quimioterapia convencional. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (comercializado como Herceptin[®]) solo es eficaz en el cáncer de mama, donde se sobreexpresa el receptor Her2/neu. Además, se requieren múltiples infusiones, que dan lugar a altos costes de tratamiento.
35

Además de la inmunoterapia a través de la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales, también se han centrado esfuerzos en la inmunización activa y la identificación de antígenos reconocidos por los linfocitos B y T humanos. Dicha inmunoterapia vacunal para el cáncer se ha basado en los antígenos contra los cuales se generan respuestas humorales y/o celulares. Lo ideal es que estos antígenos sean expresados o sobreexpresados exclusivamente por el tumor, y se denominan antígenos asociados con el tumor (TAA). Uno de los primeros TAA descritos para el cáncer de mama fue HER2/neu. Entretanto, se han ensayado diversos TAA que representan diferentes epítomos, pero, hasta la fecha, ninguno ha pasado con éxito la fase de desarrollo de productos.
40

En la vacunología, a veces se combinan los antígenos destinados a generar una respuesta inmune con uno o más adyuvantes, por ejemplo, conjugados o asociados de otro modo con uno o más sistemas de administración. Dependiendo del tipo de respuesta inmune prevista (respuesta de linfocitos B o T), se aplican diferentes estrategias.
45

Para inducir un linfocito B (es decir, anticuerpo), la respuesta de los antígenos debe ser epítomos de linfocitos B. Como se entiende generalmente en la técnica, un epítomo de linfocitos B es una parte de un antígeno que es reconocida y unida por un receptor de linfocitos B. Los lípidos, los polisacáridos y las proteínas/los péptidos pueden contener epítomos de linfocitos B que, tras la introducción en un organismo seleccionado, hagan que los linfocitos B produzcan anticuerpos que se unan específicamente al epítomo introducido. En algunos casos, la inmunogenicidad de algunos epítomos de linfocitos B se puede aumentar mediante el acoplamiento a un sistema de administración adecuado. El acoplamiento de antígenos destinados a funcionar como epítomos de linfocitos B a partículas en una disposición repetitiva, presumiblemente, permite la reticulación de los receptores de inmunoglobulina en los linfocitos B, lo que se sabe que es una señal de activación excepcionalmente potente. La disposición repetitiva se puede producir mediante la fusión del epítomo de linfocito B con un sistema de administración, incluyendo, por ejemplo, el núcleo de la hepatitis B (HBc), hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetánico (TT) y/o virosomas. Para algunos antígenos de linfocitos B, la ayuda de los linfocitos T también puede mejorar la producción de anticuerpos.
50
55
60
65

Una metodología prometedora de la actividad antitumoral se basa en la inducción de respuestas inmunes humorales específicas del tumor; numerosos anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular (ECD) de Her2/neu se han generado mediante la inmunización de ratones con células que expresan Her2/neu. El efecto biológico de estos anticuerpos parece específico del epítipo, es decir, que se basa en el reconocimiento específico de una subsecuencia corta dentro del ECD de Her2/neu. Algunos anticuerpos no tienen ningún efecto o incluso estimulan activamente el crecimiento del tumor. El anticuerpo monoclonal (mAb) 4D5 ha demostrado reducir el crecimiento de Her2/neu que expresa tumores en ratones a través de mecanismos directos e indirectos tales como la apoptosis, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Basándose en estos resultados, se ensayó una forma humanizada de este anticuerpo, denominada Trastuzumab (Herceptin®), en ensayos clínicos. Se observó el aumento de la supervivencia global de los pacientes con tumores de mama que sobreexpresaban HER2/neu tras el tratamiento citotóxico más Herceptin® en comparación con solo quimioterapia o Trastuzumab. Actualmente, Herceptin® se usa como monoterapia, pero muestra incluso una mayor eficacia en combinación con la quimioterapia citotóxica.

En la técnica, se conocen fragmentos individuales del ECD de Her2/neu. Por ejemplo, el documento WO 2002/068474 (EP 1236740) se refiere a una vacuna que comprende un péptido de 9 a 25 aminoácidos cuya secuencia se produce en la parte extracelular de la proteína Her2/neu. Además, el documento WO 2007/118660 (EP 1884788) describe una vacuna multi-peptídica que comprende una combinación específica de péptidos que presentan diferentes secuencias de aminoácidos como ocurre en la parte extracelular de la proteína Her2/neu. Los péptidos de dichas publicaciones se pueden administrar individual o conjuntamente, en forma de múltiples péptidos diferenciados, cada uno preferentemente conjugado por separado a un sistema de administración.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar mejores sustancias adecuadas para su uso como componentes activos de una vacuna, así como las propias vacunas correspondientes, para tratar, prevenir y/o mejorar el cáncer asociado con Her2. Lo ideal es que dichas sustancias mejoren el efecto protector conferido por las inmunoterapias existentes para dichos cánceres evitando, a la vez, la necesidad de técnicas de preparación laboriosas.

Sumario de la invención

Un péptido de fusión que comprende tres epítopos de linfocitos B no contiguos del dominio extracelular (ECD) de Her2/neu, o derivados de los mismos que conserven su cualidad como epítipo de linfocito B, en el que los tres epítopos de linfocitos B no contiguos están enlazados directamente entre sí o enlazados a través de una secuencia de péptido enlazador no natural en una sola cadena polipeptídica, y en el que los tres epítopos de linfocitos B no contiguos tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N° 12, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de preparación de un péptido de fusión como el anterior. El péptido de fusión se puede preparar mediante un método de síntesis de péptidos que comprende: (i) la formación secuencial de enlaces peptídicos que unen cada aminoácido a su aminoácido respectivamente vecino; y (ii) la recuperación de dicho péptido de fusión. Como alternativa, el péptido de fusión se puede preparar mediante un método recombinante que comprende: (i) proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de fusión que comprende tres epítopos de linfocitos B no contiguos del dominio extracelular (ECD) de Her2/neu, o derivados de los mismos, unidos entre sí en una sola cadena polipeptídica; (ii) transfectar dicho ácido nucleico a una célula hospedadora capaz de expresar dicha secuencia de ácido nucleico; (iii) incubar dicha célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico; y (iv) recuperar dicho péptido de fusión.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sistema de administración asociado de forma covalente y/o no covalente con un péptido de fusión como el descrito anteriormente o con un péptido de fusión que se puede obtener mediante el método anterior.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un péptido de fusión como el descrito anteriormente y/o un péptido de fusión que se puede obtener mediante el método anterior y/o un sistema de administración como el descrito anteriormente para su uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido de fusión como se describe anteriormente y/o un péptido de fusión que se puede obtener mediante un método como se describe anteriormente y/o un sistema de administración como el descrito anteriormente. En un aspecto relacionado, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y es una composición farmacéutica. La composición que comprende, por ejemplo, un péptido de fusión como el descrito anteriormente puede comprender además un inmunopotenciador.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un uso de un péptido de fusión como el descrito anteriormente, un péptido de fusión que se puede obtener de acuerdo con un método como el descrito anteriormente, un sistema de administración como el descrito anteriormente, una composición como se ha descrito anteriormente y/o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la preparación de un

medicamento para la prevención, el tratamiento y/o la mejora de un cáncer caracterizado por la expresión o la sobreexpresión de Her2/neu.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de prevención, tratamiento y/o mejora de un cáncer caracterizado por la expresión o la sobreexpresión de Her2 en un paciente que lo necesita o que se sospecha que lo necesita, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un péptido de fusión como el descrito anteriormente, un péptido de fusión que se puede obtener de acuerdo con un método como el descrito anteriormente, un sistema de administración como el descrito anteriormente, una composición como se ha descrito anteriormente y/o una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Demostración representativa de que los péptidos de fusión de acuerdo con la invención inducen niveles más altos de anticuerpos contra un epítipo de linfocitos B dado que los inducidos por un solo péptido que solamente contiene ese epítipo de linfocitos B. Los niveles de anticuerpos se midieron por ELISA realizado en suero combinado obtenido de ratones individuales inmunizados con las sustancias indicadas en la figura. Las placas de ELISA se recubrieron con PEV603 (SEC ID N° 3). La presencia del anticuerpo que se une específicamente a PEV603 en el suero se expresa como la absorbancia (DO) a 492 nm. Las curvas de absorbancia obtenidas usando sueros de ratones inmunizados con virosomas que comprenden péptidos de fusión de acuerdo con la invención (que comprenden múltiples epítopos de linfocitos B) se representan en línea continua, mientras que la obtenida usando suero de un ratón inmunizado con el fragmento peptídico de un solo epítipo PEV603 se representa en línea discontinua. Como puede verse en la figura, la respuesta de los anticuerpos contra PEV603 es mayor cuando PEV603 se incorpora como uno de varios epítopos de linfocitos B en un péptido de fusión de una sola cadena polipeptídica. Esto indica que la fusión de un solo fragmento dado, es decir, un solo epítipo de linfocitos B dado, con otros epítopos de linfocitos B dentro de una sola cadena polipeptídica puede generar una respuesta de anticuerpos más potente contra dicho epítipo dado que la generada por dicho epítipo solo.

Fig. 2 Respuestas de anticuerpos relativas a los fragmentos peptídicos individuales PEV601 (SEC ID N° 1; A), PEV602 (SEC ID N° 2; B) y PEV603 (SEC ID N° 3; C) cuando se administran a ratones por sí solos (barra situada más a la izquierda de cada una de las Fig. 2A-2C) o como parte de los péptidos de fusión de la invención PEV604 (SEC ID N° 4), PEV605 (SEC ID N° 5), PEV606 (SEC ID N° 6), PEV607 (SEC ID N° 7), PEV608 (SEC ID N° 8), PEV609 (SEC ID N° 9) y PEV610 (SEC ID N° 10). Las respuestas de anticuerpos observadas se han normalizado, en cada caso, con respecto a las obtenidas para el respectivo epítipo único.

Fig. 3 Sumas de las relaciones de DO normalizadas atribuibles a cada uno de los epítopos PEV601 (SEC ID N° 1, blanco), PEV602 (SEC ID N° 2, sombreado) y PEV603 (SEC ID N° 3, negro) representados en las Fig. 2A-C cuando se administran solos (barra situada más a la izquierda) o juntos en péptidos de fusión de acuerdo con la invención. La "suma" de las respuestas de los anticuerpos a cualquier péptido de fusión dado se puede ver como análoga a la respuesta inmunogénica total debida a todos los epítopos de linfocitos B *in vivo*. Si bien la respuesta de anticuerpos atribuible a un epítipo dado dentro de un péptido de fusión es, en algunos casos, inferior a la observada con el respectivo fragmento solo, la suma total de las respuestas de anticuerpos normalizada frente todos los fragmentos peptídicos de un péptido de fusión dado es, en casi todos los casos, significativamente superior a lo que cabría esperar sumando los correspondientes componentes epitópicos individuales. Por lo tanto, en comparación con la respuesta de los anticuerpos atribuible a epítopos individuales, la combinación de múltiples epítopos de linfocitos B individuales en un péptido de fusión de acuerdo con la invención da como resultado una potenciación sinérgica de la respuesta global de los anticuerpos.

Fig. 4 Demostración de que los péptidos de fusión PEV606 (SEC ID N° 6) y PEV608 (SEC ID N° 8) acoplados a un sistema de administración de virosoma (IRIV) inducen niveles más altos de anticuerpos contra un solo epítipo peptídico (PEV603, SEC ID N° 3) que cuando se acoplan a un sistema de administración de toxoide tetánico (TT). Los niveles de anticuerpos se midieron por ELISA realizado en sueros obtenidos de ratones inmunizados con las formulaciones indicadas en la figura. Se recubrieron placas de ELISA con PEV603 (SEC ID N° 3). La presencia del anticuerpo en el suero se expresa como la absorbancia (DO) a 492 nm.

Fig. 5 Demostración de que los péptidos de fusión PEV604 (SEC ID N° 4) y PEV607 (SEC ID N° 7) en formulaciones con sistemas de administración de virosoma inducen niveles de anticuerpos más altos contra un solo epítipo de linfocitos B (PEV603, SEC ID N° 3) que las formulaciones correspondientes con sistemas de administración Montanide™ o ISCOM. Los niveles de anticuerpos se midieron por ELISA realizado en sueros obtenidos de ratones inmunizados con las formulaciones indicadas en la figura. Se recubrieron placas de ELISA con PEV603 (SEC ID N° 3). La presencia del anticuerpo en el suero se expresa como la absorbancia (DO) a 492 nm.

Fig. 6 Secuencia nativa de Her2/neu humana accesible desde la base de datos SwissProt con número de acceso P04626 (ERBB2_HUMAN), designada en el presente documento como SEC ID N° 11. Los aminoácidos 23 a 652 corresponden al ECD de Her2/neu, y están subrayados para destacarlos en la Fig. 6.

5 Descripción detallada de la invención

Como se ha descrito anteriormente, un aspecto de la invención proporciona un péptido de fusión que comprende tres epítomos de linfocitos B no contiguos del dominio extracelular (ECD) de Her2/neu, o derivados de los mismos, unidos entre sí en una sola cadena polipeptídica.

10 Sorprendentemente, se ha encontrado que un péptido de fusión que comprende múltiples fragmentos, es decir, múltiples epítomos de linfocitos B, del ECD de Her2/neu puede generar una respuesta inmune protectora específica que es superior a la generada por los respectivos fragmentos de péptidos de un solo epítomo separados comprendidos en el mismo. Además, y de manera significativa, la magnitud de la respuesta inmune generada por un péptido de fusión que comprende al menos tres epítomos de linfocitos B no contiguos de forma natural del ECD de Her2/neu, o derivados de los mismos, es superior a la que se esperaría como la suma aditiva generada por sus partes constituyentes en aislamiento. Es decir, la unión de al menos tres epítomos de linfocitos B no contiguos de forma natural del ECD de Her2/neu, o derivados de los mismos, en una sola cadena polipeptídica produce un sinergismo ventajoso que permite la obtención de una respuesta inmunogénica del hospedador contra el ECD de la Her2/neu endógena que es más potente que la que se puede obtener mediante la administración de los epítomos correspondientes como fragmento/s peptídico/s individual/es.

25 Visto desde el punto de vista de un epítomo de linfocitos B solo dado dentro del ECD de Her2/neu (por ejemplo, epítomo A del fragmento A), esto significa que se puede obtener una respuesta inmune más potente contra el epítomo A cuando el fragmento A está unido a otro epítomo no contiguo de forma natural del ECD de Her2/neu (por ejemplo, fragmento B contiene el epítomo de B) en una sola cadena polipeptídica, que si los fragmentos A y B se administraron solos o juntos como dos péptidos diferenciados. La inducción de una respuesta potente de anticuerpos en un animal vacunado puede potenciarse aún más mediante la unión covalente y/o no covalente del péptido de fusión de la invención con un sistema de administración, por ejemplo, para mejorar la estimulación de los linfocitos B específicos de un antígeno.

35 Visto desde el punto de vista de la suma de las respuestas de anticuerpos totales atribuibles a todos los epítomos de linfocitos B dentro de un péptido de fusión - siendo dicha suma representativa de la fuerza de la inmunogenicidad total contra Her2/neu natural provocada por el péptido de fusión de la invención - dicha suma supera lo que cabría esperar como el resultado aditivo de las inmunogenicidades individuales observadas para los fragmentos peptídicos constituyentes individuales.

40 Por lo tanto, la inmunogenicidad total generada por el péptido de fusión de la invención sorprendente y ventajosamente es superior a la suma de sus partes, por lo que la unión de epítomos de linfocitos B del ECD de Her2/neu en un péptido de fusión de acuerdo con la invención permite ventajosamente aprovechar el potencial inmunogénico en estos fragmentos que, de otro modo, quedaría desaprovechado. Esto aumenta la estimulación inmune del hospedador y, por lo tanto, la eficacia de un régimen de vacunación que emplee dichos péptidos de fusión en la prevención, el tratamiento y/o la mejora del cáncer caracterizado por la expresión o la sobreexpresión de Her2/neu, por ejemplo, el cáncer de mama.

45 Sin embargo, el péptido de fusión de la invención también permite otras ventajas. Hasta ahora, el diseño de inmunoprevención y/o inmunoterapia para el cáncer que expresa Her2/neu o sobreexpresa Her2/neu basado en múltiples epítomos/péptidos ha implicado la administración de dichos péptidos como sustancias diferenciadas. Esto ha implicado ciertas desventajas. Por ejemplo, la administración simultánea de múltiples péptidos dentro de la misma solución corre el riesgo de que estos péptidos se agreguen entre sí, reduciendo así su disponibilidad final para el sistema inmune del hospedador. En casos extremos, la solubilidad de dichos agregados puede disminuir de manera que los agregados precipiten, volviéndose no disponibles para el sistema inmune del hospedador. Al mismo tiempo, la administración separada de dichos péptidos en diferentes soluciones y en diferentes puntos temporales disminuye la probabilidad de que los efectos inmunogénicos de dichos péptidos se puedan combinar de una manera ventajosa.

50 Se pueden presentar otras dificultades con los múltiples epítomos/péptidos individuales existentes cuando estos se usan con ciertos tipos de sistemas de administración tales como, por ejemplo, virosomas, liposomas o partículas de tipo virus (VLP). Para permitir la producción reproducible de vacunas, es necesario presentar los antígenos a concentraciones definidas. Sin embargo, cuando se acoplan (es decir, se asocian covalentemente) múltiples fragmentos de péptidos a un solo sistema de administración, tal como un único virosoma o liposoma, es difícil garantizar que se una el mismo número de fragmentos peptídicos/epítomos a cada sistema de administración. Siempre hay fluctuaciones en el número de acoplamiento por sistema de administración; aunque se puede estar bastante seguro de que cada sistema de administración viable se acople a, por ejemplo, cada uno de los epítomos A y B, algunos sistemas de administración se asociarán con un poco más de epítomo A de lo previsto, mientras que el epítomo B superará ligeramente las cantidades previstas en otros. Aunque la distribución de Gauss de los epítomos A

y B tenderá a centrarse en la proporción prevista de fragmentos de A:B, cualquier distribución de Gauss, por definición, contiene valores atípicos, y son estos valores atípicos los que potencialmente le restan eficacia inmunogénica máxima y son cada vez más costosos y laboriosos de excluir, pues los requisitos para el mantenimiento de la proporción de epítomos deseada en el sistema de administración se hacen más rigurosos. Se producen problemas similares cuando se combinan sistemas de administración, por ejemplo, virosomas, asociados con diferentes fragmentos de epítomo en un intento de realizar una proporción deseada de un fragmento de ECD de Her2/neu con respecto a otro.

El péptido de fusión de la invención supera las desventajas anteriores con elegancia.

Mediante la unión de al menos tres epítomos de linfocitos B no contiguos del ECD de Her2/neu, o derivados de los mismos, en una sola cadena polipeptídica, se puede obtener una formulación completamente homogénea en la que esté presente un solo tipo de cadena polipeptídica. Los elementos de dicho polipéptido, es decir, los epítomos del ECD de Her2/neu, que en el ECD natural no son contiguos, son iguales en cada péptido, y se pueden seleccionar (o seleccionar y modificar) de manera que se minimicen las interacciones no deseadas dentro de un polipéptido, así como entre polipéptidos.

Además, dado que una vacuna correspondiente contendrá solo un único tipo de polipéptido, a saber, el péptido de fusión de la invención, la proporción de epítomos peptídicos presentes está dictada en última instancia por la proporción de estos fragmentos en cualquier molécula de polipéptido dada. Esto significa que cualquier proporción deseada para generar una respuesta inmunogénica se puede fijar de manera fácil y fiable a nivel de la construcción y del diseño del péptido de fusión.

Por último, cuando se usan ciertos sistemas de administración, por ejemplo, virosomas, liposomas o VLP, para administrar el péptido de fusión de la invención, las preocupaciones relativas a la distribución relativa de los múltiples epítomos de Her2/neu, ya sea dentro de un miembro dado de la población del sistema de administración o en toda la población del sistema de administración, desaparecen eficazmente. En cualquier miembro dado, solo habrá un tipo de polipéptido: el propio péptido de fusión. Esto significa que la proporción de un epítomo Her2/neu con respecto a cualquier otro epítomo no contiguo de forma natural al mismo se mantendrá constante, independientemente de la cantidad de péptidos de fusión que estén asociados con un miembro dado de la población del sistema de administración ya que, como se ha mencionado anteriormente, dicha proporción se determina al nivel de un solo péptido de fusión. Aunque los sistemas de administración asociados con más péptidos de fusión serán probablemente más inmunogénicos que los sistemas de administración asociados con un menor número de péptidos de fusión, la inmunogenicidad atribuible a cualquier epítomo dado del ECD de Her2/neu permanece ventajosamente constante y predecible.

En resumen, el péptido de fusión de la invención potencia de manera sinérgica la respuesta inmune que se puede obtener a partir de epítomos Her2/neu volviéndolos fácilmente accesibles al linfocito B del hospedador específico de un epítomo. Esto genera una respuesta inmune de anticuerpos eficaz y predecible contra el correspondiente antígeno deseado que es más potente que la que se puede obtener usando epítomos separados individualmente, evitando al mismo tiempo los inconvenientes de (a) procesos de fabricación complejos que implican la mezcla de varios productos intermedios para obtener la vacuna final; y (b) las posibles interacciones químicas entre diferentes fragmentos de epítomos individuales que podrían degradar la eficacia de la formulación vacunal resultante. Por último, la construcción del péptido de fusión de la invención implica el aumento al máximo del número de epítomos disponibles para la estimulación inmune, a la vez que se disminuye al mínimo de manera simultánea el número de sitios de enlace necesarios para garantizar la estimulación inmune.

Como se usa en el presente documento, los términos "péptido" y "polipéptido" se usan en su sentido más amplio para referirse a una molécula de dos o más restos de aminoácidos, o análogos de aminoácidos. Los restos de aminoácidos pueden estar unidos por enlaces peptídicos, o como alternativa, por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc., pero, en la mayoría de los casos, estarán unidos por enlaces peptídicos.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" o la expresión "resto de aminoácido" abarcan tanto los aminoácidos naturales, como los no naturales o sintéticos, incluyendo tanto las formas D o L, como los análogos de aminoácidos. Un "análogo de aminoácido" se ha entender como un aminoácido de origen no natural que se diferencia de su correspondiente aminoácido de origen natural en uno o más átomos. Por ejemplo, un análogo de aminoácido de cisteína puede ser la homocisteína.

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido de fusión" se refiere a un péptido no natural compuesto de múltiples unidades peptídicas individuales, en este caso, epítomos de linfocitos B no contiguos del ECD de Her2/neu, unidos entre sí, por ejemplo, a través de enlaces peptídicos (amida). El péptido de fusión comprende al menos tres epítomos de linfocitos B del ECD de Her2/neu unidos de esta manera, no siendo dichos epítomos contiguos en su estado natural, es decir, en el ECD de Her2/neu.

Como se usa en el presente documento, la expresión "epítomo de linfocitos B" se refiere a una parte de una molécula que es reconocida por un receptor de linfocitos B (anticuerpo). En el contexto de la presente invención, el "epítomo

de linfocitos B" es uno de los al menos tres fragmentos epitópicos no contiguos de forma natural individuales del ECD de Her2/neu que comprenden el péptido de fusión. En su sentido más amplio, como se usa en el presente documento, un "epítipo de linfocitos B" se ha de entender como una subsecuencia pequeña de un antígeno, siendo dicha subsecuencia epitópica reconocida por un anticuerpo. Un antígeno puede contener múltiples epítipos de linfocitos B, y por lo tanto, puede estar unido por múltiples anticuerpos distintos, pero cualquier fragmento epitópico dado de dicho antígeno estará unido solamente por un anticuerpo específico. Por consiguiente, se ha de entender que cada fragmento peptídico comprendido en el péptido de fusión de la invención contiene un solo epítipo de linfocitos B. Por lo tanto, a fuerza de contener múltiples epítipos de linfocitos B del ECD de Her2/neu, el péptido de fusión de la invención puede considerarse como un péptido de fusión de múltiples epítipos, y una composición, por ejemplo, una composición vacunal que comprenda el péptido de fusión de la invención puede considerarse como una composición de múltiples epítipos o una composición vacunal de múltiples epítipos.

En general, se sabe cómo determinar si un péptido en cuestión es o no un "epítipo de linfocito B" en el sentido de la invención. Por ejemplo, un péptido en cuestión se puede identificar con un alto grado de exactitud como o que comprende un "epítipo de linfocito B" usando programas informáticos establecidos que comparan la secuencia del péptido en cuestión con una base de datos de secuencias conocidas y/o secuencias parciales que se sabe que son reconocidas por anticuerpos codificados por la línea germinal humana o de ratón. Como alternativa, un "epítipo de linfocito B" de una proteína dada se puede identificar mediante un análisis informatizado usando diversas combinaciones de equivalentes de la antigenicidad como la accesibilidad superficial, la flexibilidad de la cadena, los perfiles de hidropatía/hidrofilidad, la estructura secundaria predicha, etc. Como alternativa, un péptido en cuestión se puede identificar como aquel o que comprende un "epítipo de linfocito B" mediante la inmunización de un animal con el péptido en cuestión al menos una vez, lo que permite el ascenso de una respuesta inmune y, a continuación, el ensayo del suero del animal para determinar los anticuerpos que se unen específicamente a al menos una parte del péptido en cuestión. En el Ejemplo 14 que figura más adelante, se proporciona una descripción más detallada de cómo determinar si un péptido en cuestión es o no un "epítipo de linfocito B" en el sentido de la presente invención.

La Tabla 1 expone las secuencias que son "epítipos de linfocitos B" del dominio extracelular de la proteína Her2/neu en el sentido de la invención.

Epítipo de linfocito B	SEC ID N°
PESFDGDPASNTAPLQPGGGGGC	1
RVLQGLPREYVNARHC	2
YMPIWKFPDEEGAC	3
PESFDGDPASNTAPLQP	12
CAHYKDPFPCVARCPS	13
YGLGMEHLREVRVTS	14
LGSGLALIHNTLHLCF	15
EVTAEDGTQRCEKCSK	16
GASCVTACPYNLSTD	17
AAGCTGPKHSDCLACL	18
LEEITGYLYISAWPDS	19
TQRCEKCSKPCARVCY	20
GHCWGPPTQCVNCSQ	21
MPIWKFPDEEGACQPC	22
PASNTAPLQPEQLQVF	23
PEGRYTFGASCVTACP	24
ASTQVCTGTMKLRLP	25
ACHPCSPMCKGSRWGW	26
QDTILWKDIFHKNNQL	27
GPEADQCVACAHYKDP	28
SRCWGESSEDCQSLTR	29
PASPETHLDMLRHLYQ	30
YVNARHCLPCHPECQP	31
HSDCLACLFHFNHSGIC	32

Epítipo de linfocito B	SEC ID N°
ALTLIDTNRSRACHPC	33
ALAVLDNGDPLNNTTP	34
ALVTYNTDTFESMPNP	35
RCKGPLPTDCCHEQCA	36
QPCPINCTHSCVDLDD	37
VARCPSGVKPDLSEMP	38
VHTVPWDQLFRNPHQA	39
YISAWPDSLPLDSVFQ	40
CKKIFGSLAFLPESFD	41
NGDPLNNTTPVTGASP	42
LQDIQEVQGYVLIHVN	43
VCAGGCARCKGPLPTD	44
HPECQPQNGSVTCFGP	45
GVLIRNPQLCYQDTI	46
LQVIRGRILHNGAYSL	47
ESFDGDPASNTAPLQP	48
ACPYNLSTDVGSCTL	49
PVTGASPGGLRELQLR	50
CVDLDDKGCPAEQRAS	51
NHSGICELHCPALVTY	52
GSVTCFGPEADQCVAC	53
WGLLLALLPPGAASTQ	54
FLRGQECVEECRVLQG	55
GTQLFEDNYALAVLDN	56
GVKPDLSYMPIWKFPD	57

5 Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere al resultado de sustituir al menos un aminoácido en un epítipo de linfocitos B natural (es decir, de origen natural) del ECD de Her2/neu con otro aminoácido que no está presente en esa posición de Her2/neu, de manera que la sustitución del aminoácido permanece conservadora. Los derivados se pueden crear para aumentar la estabilidad del péptido de fusión en el producto intermedio y los productos finales o para aumentar la solubilidad del péptido de fusión en los productos intermedios y finales o para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos de fusión. Se puede emplear cualquier método de preparación de derivados tal como la síntesis de derivados o su producción recombinante usando una molécula de ácido nucleico mutado. Además, un "derivado" en el sentido de la presente invención mantendrá su calidad como "epítipo de linfocitos B", medida como se describe en el presente documento. Con respecto a esta característica, entonces, un "derivado" denota un "derivado funcional" en el que la sustitución no suprime o no suprime por completo la capacidad del "epítipo de linfocitos B" precursor para seguir siendo un "epítipo de linfocitos B".

15 La identificación de péptidos de fusión adicionales u optimizados de manera inmunoestimulante también puede incluir la etapa de comparar la estimulación de los linfocitos B por el péptido de fusión y la estimulación de los linfocitos B por el derivado como una determinación de la eficacia de la estimulación de las células efectoras inmunes por el derivado. Mediante la comparación del derivado con un péptido de fusión conocido, se pueden preparar péptidos con mayores propiedades estimulantes de las células inmunes.

25 Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservadora" se refiere al cambio de la identidad del aminoácido de una posición dada para sustituirlo con un aminoácido de un tamaño, una carga y/o una polaridad aproximadamente equivalentes. Los ejemplos de sustituciones conservadoras naturales de aminoácidos incluyen los 8 siguientes grupos de sustituciones (designados por el código de una letra convencional) (1) M, I, L, V; (2) F, Y, W; (3) K, R, H; (4) A, G; (5) S, T; (6) Q, N; (7) E, D; y (8) C, S.

Un "derivado", como se usa en el presente documento, también puede resultar de sustituciones de aminoácidos que son funcionalmente equivalentes. Como se usa en el presente documento, se ha de entender que dichas sustituciones son sustituciones de aminoácidos que, cuando se efectúan, dan lugar a un péptido de fusión que dará una lectura de ELISA idéntica o comparable (es decir, $\pm 10\%$) basada en suero de un animal al que se ha administrado el péptido de fusión que comprende un fragmento epitópico derivatizado o fragmentos epitópicos derivatizados, en comparación con un péptido de fusión sin las derivatizaciones correspondientes. La antigenicidad de un péptido de fusión de acuerdo con la invención se puede determinar, por ejemplo, midiendo el título de anticuerpos producidos por la inmunización de los animales mediante ELISA, como se describe en el Ejemplo 4.2. Se puede usar un proceso análogo para el ensayo de la equivalencia funcional de una sustitución de aminoácido, conservadora o de otra manera. En el presente documento, se compara la respuesta inmune generada por un péptido de fusión que comprende un fragmento "parental", no derivatizado, - usando el mismo ensayo - con la generada por un péptido de fusión que comprende el fragmento derivatizado. Si la respuesta inmune generada por el péptido de fusión que comprende el fragmento derivatizado es tan potente como la generada por el péptido de fusión con el fragmento no derivatizado, entonces, la sustitución del aminoácido se considerará funcionalmente equivalente. Si la respuesta inmune derivatizada es superior a la no derivatizada, entonces, la sustitución de aminoácido se considerará mejorada.

Como se usa en el presente documento, el término "enlace" y "enlazado/a" incluye la unión directa de dos epítomos de linfocitos B Her2/neu no contiguos mediante un enlace peptídico (es decir, el extremo C de un epítomo Her2/neu se une covalentemente mediante un enlace peptídico al extremo N del otro epítomo no contiguo de forma natural). También se incluye en el significado de este término, como se explica más adelante, la unión de dos epítomos Her2/neu no contiguos de forma natural a través de un elemento enlazador interpuesto.

En una realización del péptido de fusión, al menos dos de dichos epítomos de linfocitos B o sus derivados están unidos entre sí a través de una secuencia de péptido enlazador no natural.

Como se usa en el presente documento, el término "enlazador" se refiere a una secuencia polipeptídica corta interpuesta entre dos epítomos Her2/neu vecinos cualquiera o derivados de los mismos dentro del péptido de fusión. Si se incluye un enlazador, es preferentemente un enlazador polipeptídico de 1 a 10, preferentemente de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos (ambos inclusive) de cualquier tipo (es decir, de origen natural o no natural). El enlazador también puede ser un enlazador de hidratos de carbono, por ejemplo, ácido 5-aminopentanoico. También es posible incluir uno o más enlazadores peptídicos o polipeptídicos en el mismo péptido de fusión junto con uno o más de otros enlazadores no peptídicos o no polipeptídicos. Además, se pueden incorporar diferentes tipos de enlazadores, peptídicos o no peptídicos, al mismo péptido de fusión según se considere apropiado. En el caso de usarse un enlazador peptídico o polipeptídico para unir dos fragmentos epitópicos respectivos del ECD de Her2/neu, el enlazador se incorporará ventajosamente de manera que su extremo N se una mediante un enlace peptídico al extremo C de un fragmento, y su extremo C, mediante un enlace peptídico al extremo N del otro fragmento. Los fragmentos epitópicos de linfocitos B individuales dentro del péptido de fusión también pueden tener uno o más aminoácidos añadidos a uno o ambos extremos, preferentemente al extremo C. Así pues, por ejemplo, se pueden añadir aminoácidos enlazadores o espaciadores al extremo N o C de los péptidos, o a ambos, para enlazar los péptidos no contiguos y permitir el acoplamiento conveniente de los péptidos entre sí y/o a un sistema de administración tal como un virosoma a través de una molécula de lípido en el virosoma que sirva como ancla. Especialmente si se usa para el acoplamiento de un péptido de fusión a un sistema de administración tal como un virosoma a través de un enlazador, dicho acoplamiento mediado por el enlazador se efectúa preferentemente desde el extremo C del péptido de fusión, ya que el acoplamiento del enlazador desde el extremo N, en algunos casos, se ha observado que influye negativamente en la respuesta inmune que se desea generar.

Como se usan en el presente documento, los términos "nativo/a" y "natural" se refieren a la forma de una molécula como ocurre normalmente en la naturaleza. Como tal, la secuencia "natural" del ECD de Her2/neu se refiere a la secuencia de Her2/neu desde el aminoácido 23 al 652, ambos inclusive, (parte subrayada de la Fig. 6). La secuencia de Her2/neu natural es conocida y se encuentra disponible al público en la base de datos Swiss-Prot con el número de acceso P04626 (ERBB2_HUMAN) (<http://www.uniprot.org/uniprot/P04626>). Por el contrario, una secuencia "no natural", incluyendo un "enlazador no natural" es cualquier secuencia de aminoácidos que no pertenece al ECD de Her2/neu como se establece en la Fig. 6. Por consiguiente, un "enlazador no natural" peptídico no representa una extensión de ninguno de los fragmentos de HER2/neu con los que se conecta en la secuencia natural adyacente de Her2/neu.

De acuerdo con una realización adicional, los tres fragmentos no contiguos del ECD de Her2/neu comprendidos en el péptido de fusión de la invención se seleccionan de la lista que consiste en: PEV601 (SEC ID N° 1), PEV602 (SEC ID N° 2), PEV603 (SEC ID N° 3), PEV611 (SEC ID N° 12), SEC ID N° 13-57 y derivados de los mismos. Ninguno de estos péptidos son contiguos en la Her2/neu natural. Como se demuestra en los ejemplos adjuntos, la unión de uno cualquiera de estos tres fragmentos con otros dos cualquiera en una sola cadena polipeptídica genera una respuesta inmunogénica más potente cuando el péptido de fusión resultante se administra a un hospedador, que cuando el fragmento correspondiente se administra ya sea solo como un fragmento diferenciado, ya sea solo o junto con uno o más fragmentos epitópicos diferenciados.

Por ejemplo, dicho péptido de fusión puede comprender o consistir en tres de las secuencias de aminoácidos seleccionadas de la lista que consiste en: PEV601 o PEV611 (SEC ID N° 1 o SEC ID N° 12, respectivamente), PEV602 (SEC ID N° 2), PEV603 (SEC ID N° 3) y SEC ID N° 13-57 y/o derivados de los mismos. Se prefieren las combinaciones de PEV11 (SEC ID N° 12), PEV2 (SEC ID N° 2) y pEV3 (SEC ID N° 3). Por consiguiente, dicho péptido de fusión puede comprender o consistir en, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de PEV604 (SEC ID N° 4), PEV605 (SEC ID N° 5), PEV606 (SEC ID N° 6), PEV607 (SEC ID N° 7), PEV608 (SEC ID N° 8), PEV609 (SEC ID N° 9) y/o PEV610 (SEC ID N° 10). Como alternativa, estas secuencias de aminoácidos también pueden estar concatenadas dos o más veces en repetición en tándem dentro del mismo péptido de fusión y/o combinarse entre sí dentro del mismo péptido de fusión. Se prefieren los péptidos de fusión que comprenden o consisten en una secuencia de aminoácidos de PEV604 (SEC ID N° 4), PEV605 (SEC ID N° 5), PEV606 (SEC ID N° 6), PEV607 (SEC ID N° 7), PEV608 (SEC ID N° 8) y/o PEV610 (SEC ID N° 10), siendo más preferidos los péptidos de fusión que comprenden o que consisten en una secuencia de aminoácidos de PEV604 (SEC ID N° 4), PEV605 (SEC ID N° 5), PEV606 (SEC ID N° 6), PEV607 (SEC ID N° 7) y/o PEV608 (SEC ID N° 8). Lo más preferentemente, el péptido de fusión comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de PEV604 (SEC ID N° 4), PEV606 (SEC ID N° 6) y/o PEV607 (SEC ID N° 7).

La siguiente tabla (Tabla 2) resume los epítomos de linfocitos B seleccionados, así como diversas realizaciones preferidas del péptido de fusión (P604-P610) proporcionado por la presente invención:

Tabla 2

Péptido / Fragmento	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PEV601	PESFDGDPASNTAPLQPGGGGGC	1
PEV602	RVLQGLPREYVNARHC	2
PEV603	YMPIWKFPDEEGAC	3
PEV604	PESFDGDPASNTAPLQPRVLQGLPREYVNAR HSLPYMPIWKFPDEEGAC	4
PEV605	PESFDGDPASNTAPLQP RVLQGLPREYVNARHS YMPIWKFPDEEGAC	5
PEV606	PESFDGDPASNTAPLQP YMPIWKFPDEEGAS RVLQGLPREYVNARHC	6
PEV607	RVLQGLPREYVNARHS PESFDGDPASNTAPLQP YMPIWKFPDEEGAC	7
PEV608	RVLQGLPREYVNARHS YMPIWKFPDEEGAS PESFDGDPASNTAPLQPC	8
PEV609	YMPIWKFPDEEGAS PESFDGDPASNTAPLQP RVLQGLPREYVNARHC	9
PEV610	YMPIWKFPDEEGAS RVLQGLPREYVNARHS PESFDGDPASNTAPLQPC	10
PEV611	PESFDGDPASNTAPLQP	12

En los epítomos de linfocitos B individuales PEV611 y PEV601 expuestos anteriormente, PEV601 comprende un enlazador C-terminal adicional que termina en Cys no comprendido en PEV611. Este enlazador C-terminal del propio PEV601 termina en Cys, lo que permite el acoplamiento de este epítomo individual a sistemas de administración tales como virosomas en la realización de algunos de los experimentos de control expuestos más adelante en el presente documento. Cuando se usa como parte del péptido de fusión de la invención, el epítomo de linfocitos B de PEV601 está presente en este péptido de fusión en forma de PEV611 (SEC ID N° 12). En los experimentos en los que se emplea PEV601 como un control, es la parte de PEV601 correspondiente a PEV611 (SEC ID N° 12) la que funciona como el epítomo de linfocitos B.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de preparación del péptido de fusión

I. mediante un método de síntesis de péptidos que comprende

- (i) la formación secuencial de enlaces peptídicos que unen cada aminoácido a su aminoácido respectivamente vecino; y
- (ii) la recuperación de dicho péptido de fusión;

o

II. mediante un método recombinante que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de fusión como el descrito anteriormente;
- (ii) transfectar dicho ácido nucleico a una célula hospedadora capaz de expresar dicha secuencia de ácido nucleico;
- 5 (iii) incubar dicha célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico; y
- (iv) recuperar dicho péptido de fusión.

Los métodos de síntesis de péptidos de fusión se conocen en la técnica. En este sentido, se hace referencia a "Amino Acid and Peptide Synthesis" (Oxford Chemistry Primers), de John Jones (Autor), Oxford University Press. Los péptidos sintéticos se pueden fabricar mediante síntesis en fase líquida o síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) en diferentes soportes sólidos (por ejemplo, poliestireno, poliamida o PEG). Hay dos formas de SPPS mayormente usadas - F-moc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo) y *t*-Boc (*tert*-Butoxicarbonilo). Como el experto en la materia sabe, también hay péptidos personalizados disponibles en una serie de fabricantes industriales, por ejemplo, Bachem.

También se sabe en la técnica cómo preparar ácidos nucleicos que codifiquen una secuencia polipeptídica de interés basándose en el conocimiento del código genético, posiblemente optimizando los codones basados en la naturaleza de la célula hospedadora (por ejemplo, microorganismo) que se vaya a usar en la preparación, por ejemplo, la expresión y/o la secreción del polipéptido. También se conocen en la técnica células hospedadoras adecuadas para este fin, e incluyen células procariontas tales como, por ejemplo, *E. coli*, y células eucariotas tales como, por ejemplo, *P. pastoris*. En este sentido, se hace referencia, por ejemplo, al conocido manual de laboratorio: "Short Protocols in Molecular Biology", 5ª edición, 2 volúmenes: "A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology", de Frederick M. Ausubel (Autor, Editor), Roger Brent (Editor), Robert E. Kingston (Editor), David D. Moore (Editor), J. G. Seidman (Editor), John A. Smith (Editor), Kevin Struhl (Editor), J Wiley & Sons, Londres.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un sistema de administración asociado con un péptido de fusión como el descrito anteriormente, o como se obtiene o se puede obtener mediante un método descrito anteriormente.

Como se acepta en la técnica y se usa en el presente documento, un "sistema de administración" ha de entenderse como un adyuvante que es particulado, con el que el péptido de fusión puede asociarse (covalente y/o no covalentemente) y que, en el caso de dicha asociación, permanece asociado de ese modo en condiciones que prevalecen *in vivo*. Un sistema de administración potencia y/o efectúa la conducción del péptido de fusión a su ubicación deseada *in vivo*, por ejemplo, a un linfocito B, y, por lo tanto, da lugar a una mayor cantidad de péptido de fusión que alcanza las células responsables de la inducción de una respuesta inmune que si el péptido de fusión se administra en una forma no asociada con el sistema de administración.

En caso de que el péptido de fusión esté asociado covalentemente con el sistema de administración, esta asociación covalente adopta la forma de uno o más enlaces covalentes existentes entre los átomos del péptido de fusión y los átomos del sistema de administración. Los átomos que participan en el péptido de fusión y el sistema de administración pueden ser el mismo elemento o elementos diferentes, siendo el criterio importante para la clasificación del enlace como un "enlace covalente" el intercambio de pares de electrones entre los respectivos átomos, o entre estos átomos y otros enlaces existentes en el péptido de fusión y/o sistema de administración, de manera que la medida de la atracción con respecto a la repulsión entre los respectivos átomos del péptido de fusión y del sistema de administración es y se mantiene estable. La forma de un enlace covalente puede variar dependiendo de la configuración orbital de los electrones de los átomos que participan, e incluye, por ejemplo, el enlace σ , el enlace π , el enlace de metal a no metal y el enlace de tres centros de dos electrones (es decir, los enlaces en los que dos electrones son compartidos por tres átomos, tales como las interacciones agósticas entre un metal de transición insaturado coordinadamente y un enlace C-H, en el que dos electrones de un enlace C-H entran en el orbital *d* vacío de un metal de transición y, de ese modo, son compartidos por tres átomos). Aunque, en general, el enlace σ y el enlace π son los más comunes para los fines de la asociación covalente de un péptido de fusión y un sistema de administración en el presente documento, en la medida en que se alcance un contrapeso estable y permanente entre la atracción y la repulsión de los respectivos átomos como se ha mencionado anteriormente, cualquier enlace que tenga estas características ha de entenderse como un enlace covalente que asocia covalentemente el péptido de fusión a un sistema de administración.

En caso de que el péptido de fusión no esté asociado covalentemente con el sistema de administración, esta asociación no covalente no implicará el intercambio de pares de electrones (como ocurre anteriormente para los enlaces covalentes), sino que, más bien, implica tipos más dispersos de interacciones electromagnéticas entre uno o más átomos del péptido de fusión y uno o más átomos del sistema de administración. Por ejemplo, dicha asociación no covalente entre el péptido de fusión y un sistema de administración se puede efectuar, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno (es decir, la interacción de atracción entre un átomo de H ya unido covalentemente con otro átomo electronegativo al que no está unido covalentemente), enlace iónico (es decir, la atracción formada entre dos iones de carga opuesta en virtud de esta carga opuesta), fuerzas de Van der Waals (es decir, fuerzas entre dipolos

permanentes y/o inducidos de enlaces covalentes existentes en el péptido de fusión y el sistema de administración) e/o interacciones hidrófobas (fuerzas debidas a la tendencia de las partes hidrófobas/alifáticas del péptido de fusión descrito para asociarse con partes hidrófobas del sistema de administración). Por ejemplo, cuando el péptido de fusión se asocia no covalentemente con un sistema de administración que es una emulsión (por ejemplo, Montanide™, descrita en mayor detalle más adelante), la asociación no covalente se puede efectuar simplemente mezclando el péptido de fusión con la emulsión. En este caso, las interacciones hidrófobas mencionadas anteriormente producen la incorporación del péptido de fusión dentro de una gotita de aceite de la emulsión, con lo que el péptido de fusión permanecerá asociado de forma estable siempre que se mantenga junto a la emulsión en un medio acuoso. Además, el cercamiento físico/la encapsulación del péptido de fusión de la invención dentro del lumen de un sistema de administración, tal como un virosoma, un liposoma o un ISCOM también se ha de entender como una "asociación no covalente" en el sentido usado en el presente documento.

Cuando se asocia con un péptido de fusión de la invención, el sistema de administración puede servir para varios fines. En primer lugar, puede proteger al péptido de fusión de procesos potencialmente dañinos y de degradación *in vivo* que, de otro modo, pueden comprometer la capacidad del péptido de fusión para generar la respuesta inmune deseada antes alcanzar una diana adecuada, por ejemplo, un linfocito B. En segundo lugar, ciertos tipos de esta clase de adyuvante particulado no solo son transportadores pasivos de una carga antigénica asociada, sino que también potencian activamente la captación del péptido de fusión de una manera inmunogénicamente relevante. Por ejemplo, un virosoma (descrito en mayor detalle a continuación) no solo tiene el potencial de presentar de manera óptima un péptido de fusión de acuerdo con la invención a linfocitos B específicos del antígeno, sino también de portar en su superficie exterior proteínas de la envoltura viral que reconocen activamente los receptores apropiados de la superficie externa de las células inmunológicamente pertinentes, por ejemplo, los linfocitos B y las células presentadoras de antígenos, y por lo tanto, median activamente la captación del péptido de fusión asociado dentro de dichas células, donde, posteriormente, asciende la respuesta inmunogénica deseada.

Un sistema de administración también puede adoptar la forma de otra proteína o péptido al que el péptido de fusión de la invención esté unido o fusionado. En este caso, el sistema de administración no se origina a partir del ECD de Her2/neu, pero es responsable de aumentar la fuerza de la respuesta inmune deseada desde el mismo. En este sentido, las sustancias conocidas incluyen, por ejemplo, el polipéptido toxoide tetánico (TT) y el polipéptido hemocianina de lapa californiana (KLH). También se contempla el uso eficaz de dos o más sistemas de administración en combinación, por ejemplo, una fusión del péptido de fusión de acuerdo con la invención con, por ejemplo, TT para formar una cadena polipeptídica, siendo después dicha cadena polipeptídica encapsulada en o unida covalentemente a un virosoma, y proporcionada en una formulación de esta forma. En el escenario en el que el péptido de fusión-polipéptido TT se encapsula en un virosoma, el péptido de fusión se asocia covalentemente con un sistema de administración (en el presente ejemplo, TT), mientras que se asocia no covalentemente con otro (en el presente ejemplo, un virosoma). En el escenario en el que el péptido de fusión-polipéptido TT se une covalentemente a un virosoma, el péptido de fusión se asocia covalentemente con dos tipos diferentes de sistemas de administración. Dichas combinaciones ilustran, de una manera no limitante, el tipo de posibles asociaciones entre el péptido de fusión de la invención y uno o más de un sistema de administración como se ha establecido anteriormente, estando dichas asociaciones englobadas dentro del significado de un "sistema de administración que está asociado de forma covalente y/o no covalente con un péptido de fusión".

El sistema de administración puede ser, por ejemplo, un virosoma, un liposoma, una partícula similar a un virus (VLP), toxoide tetánico (TT), una hemocianina de lapa californiana (KLH), un complejo de inmunoestimulación (ISCOM), una emulsión (por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund (IFA), Montanide™, MF59 (Chiron) o IDEC-AF), antígeno del núcleo de la hepatitis B (HBc), una nano- o micropartícula (por ejemplo, una micropartícula de poliláctico co-glicida (PLG)), una sal de aluminio, fosfato de calcio, estearil-tirosina o un vector viral. Los ISCOM cuentan con una estructura en forma de jaula única, y se forman espontáneamente en un sistema pseudo-ternario acuoso de fosfolípidos, colesterol y saponina de Quillaja A (QuilA). Montanide™ es una mezcla de aceite, tal como oleato de manida y aceite mineral y agua.

En una realización especialmente preferida, el sistema de administración es un virosoma en el que se encapsula un péptido de fusión como el descrito anteriormente, o como se obtiene o se puede obtener mediante el método anterior, o al que un péptido de fusión como el descrito anteriormente, o como se obtiene o se puede obtener mediante el método anterior, se une de forma covalente y/o no covalente. Ciertas ventajas del uso de virosomas como sistema de administración para el péptido de fusión de la presente invención se han mencionado brevemente con anterioridad, y se exponen en mayor detalle más adelante.

Los virosomas son una forma ideal de presentar péptidos inmunogénicos para el reconocimiento por el sistema inmune del hospedador. Además, es posible preparar fácil y fiablemente virosomas que contengan la proporción deseada de un fragmento de Her2/neu con respecto a otro homogéneamente, pues la proporción de un fragmento con respecto a otro se fija por la composición del péptido de fusión en el que estos fragmentos están comprendidos, y no depende de la mezcla de virosomas que contienen diferentes fragmentos del ECD de Her2/neu.

Como se usa en el presente documento, el término "virosoma" se refiere a una vesícula producida por un procedimiento *in vitro* que se compone de lípidos y al menos una proteína de la envoltura viral. Los lípidos bien

5 tienen un origen biológico (por ejemplo, huevos, plantas, animales, cultivos celulares, bacterias, virus) o se producen sintéticamente (síntesis química). Un virosoma puede ser una envoltura viral reconstituida que se puede obtener de una variedad de virus, y que carece de las nucleocápsides infecciosas y del material genético del virus origen, por ejemplo, un virosoma de la gripe reconstituido inmunopotenciador (IRIV). Por lo tanto, un virosoma es un tipo especial de vesícula lipídica que comprende, en su membrana lipídica, al menos una proteína de la envoltura viral.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “proteína de la envoltura viral” se refiere a cualquier proteína codificada por un virus de la envoltura del que el virosoma procede parcial o totalmente y que está presente en la membrana lipídica viral. Las proteínas de la envoltura viral a veces funcionan como “proteínas de fusión viral”, cuando desempeñan un papel en la fusión de virus y virosomas con las membranas celulares diana. Dichas “proteínas de fusión viral” no se deben confundir con los “péptidos de fusión” de la presente invención. Los primeros median el proceso de fusión, es decir, la unión, de un virus (o virosoma) con una célula diana a través de un receptor apropiado en la superficie de la célula, mientras que los segundos se refieren a una fusión, es decir, enlace o conexión, de al menos tres epítopos de linfocitos B del ECD de Her2/neu, que en su estado natural no son contiguos, en una sola cadena polipeptídica.

15 La/s proteína/s de la envoltura viral se puede/n obtener de todo el virus propagado en huevos de ave o cultivo celular (por ejemplo, células de mamífero, células derivadas de vertebrado, células de insecto, levadura, células vegetales) o producirse como proteínas recombinantes usando métodos conocidos por los expertos en la materia, siempre que las propiedades bioquímicas de la proteína permitan su introducción física en una membrana lipídica. Estas proteínas de la envoltura son responsables de la funcionalidad virosomal, incluyendo la capacidad de los virosomas para potenciar la inmunogenicidad de un péptido de fusión comprendido. El virosoma usado en la presente invención también puede ser un virosoma quimérico, lo que significa que contiene las proteínas de la envoltura viral de al menos dos cepas de virus diferentes.

20 Como queda evidenciado por algunos de los resultados mostrados en el presente documento, los virosomas tienen un gran potencial en el diseño de sistemas destinados a generar una respuesta inmunogénica a partir de una sustancia deseada, por ejemplo, una sustancia peptídica o proteica. Además, se espera que las vacunas basadas en virosomas sean seguras, dado que las vacunas basadas en virosomas ya han mostrado un perfil de seguridad muy bueno en seres humanos (Glueck, R. “Vaccine” 1999, 17, 1782).

25 El virosoma también puede comprender en su membrana un lípido catiónico para la liofilización y reconstitución eficaces. En una realización preferida, el lípido catiónico utilizado es un derivado de colesterol catiónico, por ejemplo, cloruro de 3β[N-(N',N',N'-trimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (TC-Chol). Dicho virosoma que contiene un TC-Chol se denomina en el presente documento “TIRIV”. En una realización preferida, el virosoma es un TIRIV o un IRIV. En otra realización, se pueden usar múltiples tipos de virosomas, por ejemplo, tanto TIRIV como IRIV, juntos en proporciones diferentes según se considere oportuno o necesario para, por ejemplo, ajustar la capacidad de reconstitución del producto liofilizado. Los sistemas de administración de TIRIV y/o IRIV, junto con sus péptidos de fusión asociados, también se pueden combinar con uno o más sistemas de administración diferentes no virosomales. Por el contrario, los péptidos de fusión se pueden asociar con uno o más sistemas de administración no virosomales, que luego se asocian después con uno o más sistemas de administración virosomales, por ejemplo, IRIV y/o TIRIV.

30 Aunque la mayoría de los epítopos polipeptídicos se pueden unir a la superficie de un virosoma, no todos darán lugar a construcciones adecuadas para su uso como agentes activos en vacunas contra Her2. Por ejemplo, ciertos polipéptidos, cuando se conjugan a la superficie, dan lugar a una mayor propensión de los virosomas conjugados de ese modo para agregarse desventajosamente. Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que los péptidos de fusión de acuerdo con la invención se pueden unir a virosomas tales como, por ejemplo, un TIRIV, y que dichos virosomas muestran posteriormente características superiores tales como la estabilidad y la polidispersidad. La polidispersidad de un preparado virosomal es indicativa de la homogeneidad del tamaño de partícula en una solución acuosa, estando la polidispersidad más baja asociada con un mayor grado de homogeneidad de tamaño en todos los virosomas presentes en la composición. Dichos péptidos de fusión acoplados al virosoma también presentan una respuesta inmune potenciada. Ciertas características fisicoquímicas de determinadas realizaciones del péptido de fusión de la invención se resumen, por ejemplo, en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3

Parámetro	PEV601	PEV602	PEV603	PEV604	PEV605	PEV606	PEV607	PEV608	PEV609	PEV610
Solubilidad (I)IRIV (mg/ml)	2-3	0,5	2-3	0,5 - 1,5	sin datos	sin datos	0,5-1,5	sin datos	sin datos	sin datos
Estabilidad (I)IRIV	aceptable	limitada	limitada	limitada	limitada	limitada	limitada	limitada	limitada	limitada
pl	3,5	9,5	4,1	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7
Solubilidad TIRIV (mg/ml)	2-3	0,5	< 0,2	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Polidispersidad de TIRIV (con diámetro medio)	0,15 (185 nm)	0,22 (190 nm)	sin integración	0,15 (167 nm)	0,32 (230 nm)	0,07 (165 nm)	0,18 (175 nm)	0,07 (167 nm)	0,17 (202 nm)	0,20 (223 nm)

La tabla demuestra que la fusión de los fragmentos de péptido epitópico individuales PEV601, PEV602 y PEV603 en diversos péptidos de fusión da lugar, entre otras cosas, a un valor de pl muy uniforme para los péptidos de fusión resultantes en comparación con los valores correspondientes observados para cada uno de los fragmentos constituyentes del péptido. Esto simplifica en gran medida el acoplamiento de los péptidos de fusión a sistemas de administración tales como, por ejemplo, virosomas y/o TT.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un péptido de fusión como el descrito anteriormente o un sistema de administración asociado de forma covalente y/o no covalente con el péptido de fusión descrito anteriormente para su uso como un medicamento. En una realización preferida, el medicamento es una vacuna. En un aspecto relacionado, la presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido de fusión de acuerdo con la invención y/o un sistema de administración asociado de forma covalente y/o no covalente con un péptido de fusión de acuerdo con la invención. En una realización preferida, esta composición es una composición farmacéutica y además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, excipientes, diluyentes, etc.). En una realización especialmente preferida, la composición farmacéutica es una composición vacunal.

Cualquiera de los tipos anteriores de composiciones o medicamentos puede comprender un sistema de administración con el que el péptido de fusión descrito anteriormente está asociado de forma covalente y/o no covalente de la manera anterior.

Además, cualquiera de los tipos anteriores de composiciones o medicamentos puede comprender un inmunopotenciador en lugar de o además de un sistema de administración como se ha mencionado anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunopotenciador" se refiere a cualquiera de una clase de sustancias adyuvantes incluidas en una composición que aumentan la magnitud de la respuesta inmune generada por el péptido de fusión más allá de lo que cabría esperar, ya sea desde el péptido de fusión solo o desde el péptido de fusión asociado con un sistema de administración como se define anteriormente en el presente documento en ausencia de dicho inmunopotenciador. Muchos de los inmunopotenciadores activan las células mediante la interacción con sus receptores, incluyendo los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). A diferencia de un sistema de administración, un inmunopotenciador es no particulado, y como tal, existe en forma disuelta en solución con el péptido de fusión, o con el péptido de fusión asociado con un sistema de administración particulado. En algunos casos, se prefiere especialmente combinar, en la misma composición, composición farmacéutica, composición vacunal, medicamento o vacuna, uno o más sistemas de administración con uno o más inmunopotenciadores, para maximizar la magnitud de la respuesta inmune que se pueda obtener. Sin embargo, esto no necesita ser el caso, y también se contempla el empleo de un péptido de fusión con solamente un inmunopotenciador.

El inmunopotenciador se puede seleccionar entre uno o más de cualquiera de las sustancias o grupos de sustancias conocidos, tal como, por ejemplo, una toxina bacteriana (por ejemplo, enterotoxina termolábil de tipo II de *E. coli* (HLT), toxina del cólera (CT)), un lipopolisacárido de la superficie celular bacteriana (LPS), lípido A y/o un derivado sintético del mismo, un oligopéptido (por ejemplo, muramil dipéptido (MDP), muramil tripéptido y/o derivados sintéticos de los mismos), un patrón molecular asociado a un patógeno alternativo (PAMP; por ejemplo, flagelina), un lipopéptido (por ejemplo, MALP-2), una lipoproteína, un peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), un componente de la pared celular de la levadura, un glicolípido (por ejemplo, lipoarabinomanano), ADN viral o bacteriano, un oligonucleótido (por ejemplo, CpG, etc.), ARN bicatenario, ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), ARN viral monocatenario, un potenciador inmune de molécula pequeña (SMIP; por ejemplo, resiquimod, imiquimod), una citocina (por ejemplo, interleucina-2 (IL-2), IL-12, GM-CSF, etc.), una quimiocina (por ejemplo, RANTES), una saponina (por ejemplo, Quils, QS-21 (SmithKline Beecham)), un polifosfaceno, una estructura de cocleato, un supresor del ARN interferente pequeño de la señalización de citocinas (ARNip de SOCS) o un epítipo Pan DR (PADRE). Por supuesto, también se contemplan las mezclas de dos o más de los anteriores dentro de la misma composición, composición farmacéutica, composición vacunal, medicamento o vacuna, ya sea solas o con uno o más sistemas de administración como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido de fusión de acuerdo con la invención, opcionalmente asociado con un sistema de administración y/o junto con un inmunopotenciador como el descrito anteriormente, para la preparación de una composición y/o un medicamento para la prevención, el tratamiento y/o la mejora de un cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de Her2. En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica, y puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización especialmente preferida, la composición farmacéutica y/o el medicamento es una composición vacunal.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de prevención, tratamiento y/o mejora de un cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de Her2 en un paciente que lo necesita o se sospecha que lo necesita, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un péptido de fusión como el descrito anteriormente, un péptido de fusión que se puede obtener de acuerdo con un método como el descrito anteriormente y/o cualquiera de dichos péptidos de fusión asociados de forma covalente y/o no covalente a un sistema de administración como el descrito anteriormente. El péptido de fusión se puede administrar ya sea solo o

en asociación covalente y/o no covalente con un sistema de administración tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El péptido de fusión, ya sea solo o en asociación con un sistema de administración, puede estar presente en una composición, una composición farmacéutica, una composición vacunal, un medicamento o una vacuna como se ha descrito anteriormente, y la composición, la composición farmacéutica, la composición vacunal, el medicamento o la vacuna pueden comprender además un inmunopotenciador como el descrito anteriormente.

En una realización preferida, el cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de Her2/neu se selecciona entre el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de la glándula salival. Se prefiere especialmente que el cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de Her2/neu sea el cáncer de mama.

Como se usan en el presente documento, los términos "administración" o "administrar" se refieren a la introducción de un péptido de fusión de acuerdo con la invención, o una composición o medicamento o composición vacunal que contiene péptido de fusión de la invención, incluyendo aquellas en las que el péptido de fusión está comprendido en un virosoma, en el cuerpo de un paciente para que el sistema inmune del paciente genere una respuesta a los múltiples epítomos Her2 comprendidos en el péptido de fusión. Como se usa en el presente documento, un "paciente que lo necesita" incluye un individuo que ha sido diagnosticado de cáncer que sobreexpresa la proteína Her2. También incluye a las personas que todavía no han sido diagnosticadas de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, las personas que no hayan presentado ningún síntoma, pero que, por ejemplo, tienen antecedentes familiares y que, por tanto, se sospecha que tienen una predisposición genética a desarrollar cáncer que sobreexpresa Her2. En su sentido más amplio, entonces, la expresión "un paciente que lo necesita" engloba los individuos con una necesidad ya presente, así como aquellos en los que se sospecha o se prevé una necesidad en el futuro.

Como los términos usados en el presente documento, un medicamento que "previene" el cáncer reducirá el riesgo, a ser posible a cero, de desarrollar cáncer. Además, dicho término también se refiere a la prevención de volver a desarrollar cáncer, por ejemplo, tras la cirugía de un tumor primario. Un medicamento que "trata" el cáncer eliminará la enfermedad por completo mediante la eliminación de la causa subyacente de manera que, tras el cese de la administración del péptido de fusión, la enfermedad no se vuelva a desarrollar, sino que permanezca en remisión. Un medicamento que "mejora" el cáncer no elimina la causa subyacente de la enfermedad, pero reduce la gravedad de la enfermedad medida por cualquier sistema de clasificación establecido y/o medida por una mejora del bienestar del paciente, por ejemplo, reducción del dolor y malestar. Una "cantidad eficaz" es una cantidad de una preparación farmacéutica que, sola o junto con dosis adicionales de acuerdo con una pauta posológica establecida, efectúa la prevención, el tratamiento o la mejora deseadas como se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una preparación antigénica usada para generar inmunidad a una enfermedad o una capacidad para combatir la enfermedad al conferir al sistema inmune la capacidad de reconocer y eliminar específicamente las células asociadas con la enfermedad. Las vacunas pueden ser profilácticas (por ejemplo, para prevenir el desarrollo de una enfermedad aún no manifestada), terapéutica (para tratar o eliminar una enfermedad ya manifestada) o paliativa (para mejorar una enfermedad ya manifestada). Los significados previstos de estos términos se han explicado anteriormente.

Dicha vacuna que comprende un péptido de fusión de la presente invención como principio activo principal o parcial se puede administrar en una amplia variedad de formas de dosificación terapéuticas/profilácticas en los vehículos convencionales para la administración tópica, mucosa, sistémica y local.

Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden una solución de un péptido de fusión opcionalmente en combinación con uno o más de un inmunopotenciador adecuado como se ha descrito anteriormente y/o uno o más de un sistema de administración adecuado en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso aceptable. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos (farmacéuticamente aceptables), por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, glicina al 0,3 %, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso como tales o liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, sacarosa u otros hidratos de carbono, entre muchos otros. Los métodos actuales de preparación de compuestos administrables por vía parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia, y se describen más detalladamente en, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" ("Remington's Pharmaceutical Sciences") Gennaro A. R. ed. 20ª edición, 2000: Williams & Wilkins PA, EE.UU.

La vía de administración y la pauta posológica variarán dependiendo de la etapa o de la gravedad de la afección que se vaya a tratar, y se deben determinar por el médico experto. Por ejemplo, se pueden usar un péptido de fusión de acuerdo con la presente invención, un sistema de administración como el descrito anteriormente y/o composiciones

que comprenden dicho péptido de fusión y/o dicho sistema de administración descritas anteriormente para preparar una composición farmacéutica o un medicamento que se pueda administrar en forma subcutánea, intradérmica, intralinfática, o tópica o mucosa (nasal), o intramuscular. Todas estas formas son bien conocidas por los expertos habituales en las técnicas farmacéuticas.

5 Ventajosamente, las formulaciones adecuadas de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, en una sola dosis, que se puede repetir diaria, semanal o mensualmente. Además, los compuestos de la presente invención, en particular, los que contienen virosomas o liposomas, se pueden administrar en forma intramuscular, subcutánea, intralinfática, intranasal o intravaginal, o por vías transdérmicas conocidas por los expertos habituales en la materia. Para la administración en forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de las dosis, en general, será continua en lugar de intermitente durante toda la pauta posológica.

15 Los medicamentos profilácticos o terapéuticos de la presente invención son para la administración en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Además de los inmunopotenciadores descritos anteriormente, dichas preparaciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes de tamponamiento, conservantes, vehículos compatibles (como se ha descrito anteriormente) y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos.

20 Las preparaciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una cantidad eficaz es aquella cantidad de una preparación farmacéutica que, sola o junto con dosis adicionales, estimula la respuesta deseada. En general, las dosis de péptidos de fusión que varían de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kilogramo}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{kilogramo}$ de peso corporal, dependiendo del modo de administración, se consideran eficaces. Se cree que el intervalo preferido está entre 0,1 $\mu\text{g}/\text{kilogramo}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{kilogramo}$ de peso corporal. La cantidad absoluta dependerá de una variedad de factores, incluyendo la composición seleccionada para la administración, si la administración es en monodosis o multidosis, y los parámetros individuales del paciente incluyendo edad, condición física, tamaño, peso y etapa de la enfermedad. Estos factores son bien conocidos por los expertos habituales en la materia, y se pueden abordar de forma rutinaria.

30 La pauta posológica que utiliza las composiciones de la presente invención se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo, por ejemplo, la edad, el peso y el estado de salud del paciente, la etapa y la gravedad de la afección que se vaya a tratar, y el péptido de fusión en particular destinado a la administración. Un médico con experiencia normal puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de, por ejemplo, un medicamento que contenga un péptido de fusión que sea necesaria para prevenir, tratar o mejorar el progreso o la gravedad de una enfermedad maligna. La exactitud óptima para lograr la concentración de agente activo con el intervalo que produce eficacia bien sin toxicidad o con no más de la toxicidad aceptable requiere una pauta basada en la cinética de la disponibilidad del agente para los sitios diana. Este proceso implica considerar la distribución, el equilibrio y la eliminación del agente activo, por ejemplo, del péptido de fusión de la invención, y es competencia del experto en la materia.

40 En los usos de la presente invención, el péptido de fusión y/o el sistema de administración descritos en el presente documento con detalle pueden formar el agente activo, y normalmente se administran en mezcla con vehículos farmacéuticos adecuados tales como diluyentes o excipientes que se seleccionan adecuadamente con respecto a la forma deseada de administración, por ejemplo, comprimidos orales, cápsulas, elixires, jarabes, y similares, y en concordancia con las prácticas farmacéuticas convencionales. Cuando se desee o sea necesario también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen, sin limitación, almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o β -lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen, sin limitación, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, 50 goma de xantano y similares.

55 Para la administración parenteral, se desean suspensiones y soluciones estériles. Las preparaciones fisiológicas que pueden contener conservantes adecuados se emplean cuando se desea la administración intramuscular o subcutánea o intradérmica.

60 Como se ha descrito anteriormente, los sujetos pueden recibir una administración de una cantidad eficaz de un péptido de fusión en una forma asociada covalente y/o no covalentemente con uno o más sistemas de administración tales como un virosoma y/o uno o más adyuvantes adicionales tales como un inmunopotenciador según lo definido anteriormente, aunque también se contempla la administración de péptidos de fusión por sí mismos. Como alternativa, otro ejemplo de un sistema de administración es un liposoma. Los liposomas se pueden formar, por ejemplo, a partir de una variedad de compuestos, incluyendo, por ejemplo, colesterol, estearilamina y diversas fosfatidilcolinas.

65 Las dosis iniciales del péptido de fusión de la invención o sistemas de administración correspondientes tales como, por ejemplo, un virosoma, pueden ir seguidas de dosis de refuerzo, siguiendo protocolos de inmunización convencionales en la técnica. Para dichas dosis de refuerzo, se pueden aumentar más los efectos

inmunoestimulantes de, por ejemplo, las sustancias de la presente invención de la misma manera que se ha descrito anteriormente para la dosis inicial, por ejemplo, mediante la combinación de una sustancia de la presente invención con, por ejemplo, uno o más adyuvantes tales como uno o más inmunopotenciadores como se han definido anteriormente en el presente documento.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior, así como de los ejemplos. Se pretende que dichas modificaciones estén incluidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada. y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionen materiales específicos, esto será meramente con fines ilustrativos, sin pretender limitar la invención. A menos que se especifique lo contrario, se usan los procedimientos de biología bioquímica y molecular, tales como los expuestos en Voet, "Biochemistry", Wiley, 1990; Stryer 1995; "Peptide Chemistry. A Practical Textbook", 2ª ed., Miklos Bodanszky, Springer-Verlag, Berlín, 1993; Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory" (2001), Ausubel *et al.* (Eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons (2000). Un experto en la materia puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención. Se entenderá que se pueden realizar muchas variaciones en las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento, permaneciendo dentro de los límites de la presente invención. Del mismo modo, se entiende que, debido a las similitudes estructurales o químicas conocidas tales como la polaridad, el volumen o la orientación entre las cadenas laterales de aminoácidos, las secuencias peptídicas con aminoácidos o estructuras de reemplazo equivalentes a las desveladas en el presente documento conservarán una función similar. Es la intención de los inventores que dichas variaciones se incluyan dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Materiales

El octaetilenglicol-mono-(*n*-dodecil)éter (OEG, C₁₂E₈) se adquirió en Sigma (Buchs, Suiza), respectivamente. La sacarosa (*Eur. Phar.*) se adquiere en Merck (Dietikon, Suiza). La fosfatidilcolina de huevo (PC) se obtiene en Lipoid (Cham, Suiza). La 1-oleoil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfoetanolamina (PE) se obtiene en Bachem (Bubendorf, Suiza). Las perlas Bio-Bead SM2 se adquieren en Bio-Rad Laboratories (Glattbrugg, Suiza). La 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-[4-(*p*-maleimidometil)ciclohexano-carboxamida] (N-MCC-PE) se adquiere en Genzyme Pharmaceutical (Liestal, Suiza). El cloruro de colesteril-*N*-(trimetilamonioetil)carbamato (TC-chole) se adquiere en Merck Eprova (Schaffhausen, Suiza). Montanide ISA™ 51 (una emulsión de agua/aceite análoga al adyuvante incompleto de Freund FA, pero que contiene un aceite mineral más refinado que el adyuvante incompleto de Freund ("Handbook of cancer vaccines", 2004, Eds. Michael A. Morse, Timothy M. Clay, H. Kim Lysterly; Springer-Verlag Berlín) se adquiere en Seppic, Francia, y los ISCOM AbISCO®-100, en Isconova, Suecia.

Ejemplo 2

2.1 Síntesis de péptidos y péptidos de fusión

Los péptidos se sintetizaron químicamente en Bachem AG (Bubendorf, Suiza) o en GL Biochem Ltd. (Shanghai, China) con una pureza de HPLC > 90 %. Los péptidos se analizaron por espectrometría de masas para confirmar la masa molecular esperada.

Ejemplo 3

Análisis mediante transferencia Western

Se mezclaron las muestras que se iban a analizar por SDS-PAGE con el tampón de muestra apropiado proporcionado por Invitrogen (Basilea, Suiza) con o sin agente reductor (Invitrogen) y se incubaron a 85 °C durante 2 minutos. Se aplicaron de 5 a 10 µl de la muestra en un gel de poliacrilamida (Invitrogen, Basilea, Suiza) y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los geles bien se analizaron además mediante análisis de transferencia Western y/o se tiñeron con plata usando el Kit SilverQuest (Invitrogen, Basilea, Suiza) siguiendo el protocolo de "tinción rápida" suministrado por el fabricante.

Se transfirieron los geles a una membrana de nitrocelulosa con el instrumento iBlot (Invitrogen, Basilea, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se lavó la membrana brevemente en PBS que contenía Tween 20 al 0,2 % y se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos o los sueros mediante la incubación con leche al 5 % en PBS durante 2 h. Tras volver a lavar las membranas de nuevo en PBS/Tween 20 al 0,2 %, se incubaron las transferencias con el primer anticuerpo/suero diluido en leche al 0,5 % en PBS/Tween 20 al 0,2 % 1:100 hasta

1:10.000 en función del anticuerpo a TA durante 1-2 h. Se lavaron las membranas 3 veces durante 5 minutos en PBS/Tween 20 al 0,2 % y se incubaron en anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) apropiado diluido de 1:1.000 a 1:20.000 en leche al 0,5 % en PBS/Tween 20 al 0,2 %. Tras lavar las membranas durante 5 veces en PBS/Tween 20 al 0,2 %, se realizó la visualización por quimioluminiscencia usando el kit SuperSignal West Dura (Pierce, Lausanne, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4

En los siguientes experimentos, se usan métodos convencionales.

4.1 Inmunogenicidad de los péptidos de fusión

4.1.1 Animales

A lo largo de este estudio, se usaron ratones hembra Balb/c (6-8 semanas al inicio del experimento). Los animales se alojaron en centros de cuidado de animales apropiados y se trataron de acuerdo con las directrices internacionales.

4.1.2 Inmunización de los ratones

Se inmunizaron los ratones Balb/c por vía subcutánea con 1 µg de HA del virus gripal A/H1N1 inactivado. Tres semanas más tarde, los ratones se inmunizaron dos veces con formulaciones vacunales en un intervalo de 3 semanas. Se recogió sangre 2 semanas después de la inoculación final y los sueros se ensayaron en ELISA.

4.2 ELISA para detectar anticuerpos contra epítomos peptídicos

Se recubrieron placas Polysorp (Nunc) durante una noche a 4 °C con 100 µl de una solución a 10 µg/ml del conjugado de péptido-fosfatidiletanolamina PEV601 (SEC ID N° 1)-PE, PEV602 (SEC ID N° 2)-PE o PEV603 (SEC ID N° 3)-PE en PBS (pH 7,4). A continuación, se bloquearon los pocillos con leche en polvo al 5 % en PBS durante 2 h a TA, seguido de tres lavados con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %. Luego, se incubaron las placas con diluciones en serie del suero de ratón en PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % y leche en polvo al 0,5 % durante 2 h a 37 °C. Tras lavarlas, se incubaron las placas con anticuerpo de cabra contra Ig de ratón conjugado con HRP (BD Bioscience) durante 1 h a 37 °C. Tras volver a lavar, se añadió sustrato de OPD (comprimidos de O-fenilendiamina, Fluka), y se incubaron las placas a oscuras a temperatura ambiente hasta que la reacción colorimétrica hubo avanzado lo suficiente, y se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1 M, y se leyeron las densidades ópticas (DO) a 492 nm en un Spectra Max Plus (Molecular Devices).

Ejemplo 5

Los péptidos de fusión inducen niveles de anticuerpos más altos contra un solo epítomo de linfocitos B que los que se pueden inducir mediante el respectivo epítomo de linfocitos B solo

Se deseaba investigar la fuerza de la respuesta inmune atribuible a un solo epítomo (es decir, un solo fragmento del ECD de Her2/neu) generada en el contexto de un péptido de fusión de acuerdo con la invención en comparación con la generada usando solo el epítomo. Se inmunizaron ratones Balb/c por vía subcutánea con 1 µg de HA del virus gripal A/H1N1 inactivado. Tres semanas más tarde, se inmunizó cada uno de los respectivos ratones subcutáneamente con PEV601 (SEC ID N° 1), PEV602 (SEC ID N° 2), PEV603 (SEC ID N° 3), PEV604 (SEC ID N° 4), PEV605 (SEC ID N° 5), PEV606 (SEC ID N° 6), PEV607 (SEC ID N° 7), PEV608 (SEC ID N° 8), PEV609 (SEC ID N° 9) o PEV610 (SEC ID N° 10) acoplado a virosomas (IRIV) dos veces en un intervalo de 3 semanas. Se extrajo sangre 2 semanas después de la inoculación final, y los sueros se ensayaron en ELISA usando el epítomo único respectivo comprendido en el péptido de fusión. Los resultados representativos se muestran en la Fig. 1 para el ELISA realizado usando el epítomo único PEV603 (SEC ID N° 3).

Más concretamente para la Fig. 1, dicha figura demuestra que los péptidos de fusión de acuerdo con la invención inducen niveles más altos de anticuerpos contra un epítomo dado que los inducidos por un solo péptido que solo contiene ese epítomo. Se midieron los niveles de anticuerpos por ELISA realizado en suero obtenido de ratones individuales inmunizados con las sustancias indicadas en la figura. Se recubrieron placas de ELISA con PEV603 (SEC ID N° 3). La presencia de anticuerpo que se une específicamente a PEV603 en suero se expresa como la absorbancia (DO) a 492 nm. Las curvas de absorbancia obtenidas usando sueros de ratones inmunizados con virosomas (en concreto, IRIV) que comprenden péptidos de fusión de acuerdo con la invención (que comprenden múltiples epítomos) está en línea continua, mientras que la curva obtenida usando suero de ratones inmunizados con el fragmento peptídico de un solo epítomo PEV603 está en línea discontinua. Como se puede ver en la figura, la respuesta de los anticuerpos contra PEV603 es mayor cuando PEV603 se incorpora como uno de los varios fragmentos a un péptido de fusión en una sola cadena polipeptídica. Esto indica que la fusión de un solo fragmento dado, es decir, un solo epítomo de linfocitos B dado, con otros fragmentos dentro de una sola cadena polipeptídica puede generar una respuesta de los anticuerpos más potente contra este epítomo dado que la generada por ese

epítipo solo. Los puntos de datos obtenidos en la dilución de suero 1:100 (flecha de la parte superior izquierda de la Fig. 1) se usaron para generar la Fig. 2C, como se describe en más detalle a continuación.

Los datos de la Fig. 1 son los datos representativos de la respuesta inmune contra el epítipo individual, es decir, un solo fragmento de ECD PEV603 (SEC ID N° 3), tanto solo como en el contexto más amplio de un péptido de fusión de la invención. Se realizaron experimentos similares para investigar la respuesta inmune generada por los respectivos epítipos de linfocitos B individuales PEV601 (SEC ID N° 1) y PEV602 (SEC ID N° 2), tanto solos como formando parte de un péptido de fusión de la invención. Los datos de todos estos experimentos (en dilución de suero 1:100; flecha en la parte superior izquierda de la Fig. 1) se muestran en la Fig. 2 como las respuestas de los anticuerpos relativas a la respuesta inmune hacia el respectivo fragmento PEV601 (SEC ID N° 1; Fig. 2A), PEV602 (SEC ID N° 2; Fig. 2B) o PEV603 (SEC ID N° 3; Fig. 2C) solo, que, en cada caso, se ha normalizado hasta un valor de 1,0 (barra de datos situada más a la izquierda en las respectivas Fig. 2A, 2B y 2C). Las barras de datos posteriores hacia la derecha de cada una de las Fig. 2A, 2B y 2B muestran la relación de la magnitud de la respuesta de los anticuerpos hacia el epítipo PEV601, PEV602 y PEV603, respectivamente, cuando cada fragmento respectivo forma parte de los péptidos de fusión de la invención PEV604 (SEC ID N° 4), PEV605 (SEC ID N° 5), PEV606 (SEC ID N° 6), PEV607 (SEC ID N° 7), PEV608 (SEC ID N° 8), PEV609 (SEC ID N° 9) y PEV610 (SEC ID N° 10). Como se puede observar claramente en la Fig. 2, la magnitud de la respuesta de los anticuerpos hacia cada uno de estos tres fragmentos es, en la mayoría de los casos, superior a la observada cuando se administra el respectivo fragmento solo, fuera del contexto de la proteína de fusión de la invención.

La Fig. 3 es una interpretación acumulativa de los datos presentados en la Fig. 2. En la Fig. 3, se presentan los datos de la Fig. 2 como las sumas de las relaciones de DO normalizadas atribuibles a cada uno de los fragmentos PEV601 (SEC ID N° 1; blanco), PEV602 (SEC ID N° 2; sombreado) y PEV603 (SEC ID N° 3; negro) representados en la Fig. 2A-C cuando se administran solos (barra situada más a la izquierda de la Fig. 3) o juntos en diversos péptidos de fusión de acuerdo con la invención (7 barras de datos situadas a la derecha). El "suma" de las respuestas de los anticuerpos a cualquier péptido de fusión dado se puede ver como análoga a la respuesta inmunogénica acumulativa generada colectivamente por todos los fragmentos de péptidos epitópicos *in vivo* cuando están contenidos en un péptido de fusión de acuerdo con la invención. Si bien la respuesta de los anticuerpos atribuible a un fragmento epitópico individual dado dentro de un péptido de fusión es, en algunos casos, inferior a la observada con el respectivo fragmento solo, la respuesta colectiva atribuible a la suma total de las respuestas de los anticuerpos frente a todos los fragmentos de péptidos epitópicos de un péptido de fusión dado es, en casi todos los casos, significativamente superior a lo que cabría esperar como la suma simple de los correspondientes componentes de fragmentos individuales (representada en la Fig. 3 por la columna situada más a la izquierda, que muestra la suma de las respuestas inmunes de los fragmentos individuales normalizada como $1 + 1 + 1 = 3$). En comparación con la respuesta de los anticuerpos atribuible a fragmentos de epítipos individuales, la combinación de múltiples fragmentos de epítipos individuales en un péptido de fusión de acuerdo con la invención da lugar, por tanto, a una potenciación sinérgica de la respuesta general de los anticuerpos más allá de lo que cabría esperar en base a la suma aritmética de las partes constituyentes en cualquier péptido de fusión dado.

Ejemplo 6

Los péptidos de fusión se pueden acoplar a (es decir, asociar covalentemente con) diversos sistemas de administración: comparación de virosomas (IRIV) y toxoide tetánico (TT)

Se deseaba comparar el efecto de los sistemas de administración sobre la respuesta inmunogénica que puede ser generada por péptidos de fusión seleccionados de acuerdo con la invención. Para ello, se inmunizaron ratones Balb/c por vía subcutánea con 1 µg de HA del virus gripal A/H1N1 inactivado. Tres semanas después, se inmunizaron los ratones por vía subcutánea con PEV606 (SEC ID N° 6) y PEV608 (SEC ID N° 8) acoplados a (es decir, asociados covalentemente con) bien virosomas (IRIV) o toxoide tetánico (TT) dos veces con un intervalo de 3 semanas. Se extrajo sangre 2 semanas después de la inoculación final, y los sueros se ensayaron en ELISA. Se recubrieron las placas de ELISA con PEV603 (SEC ID N° 3). La presencia del anticuerpo en el suero se expresa como la absorbancia a 492 nm. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Los datos mostrados en la Fig. 4 demuestran que los péptidos de fusión PEV606 (SEC ID N° 6) y PEV608 (SEC ID N° 8) acoplados a un sistema de administración de virosoma (IRIV) inducen niveles altos de anticuerpos contra un solo epítipo peptídico (PEV603; SEC ID N° 3) comprendido en los péptidos de fusión que cuando se acoplan a un sistema de administración de toxoide tetánico (TT). Los niveles de anticuerpos se midieron por ELISA realizado en sueros obtenidos de ratones inmunizados con las formulaciones indicadas en la figura.

Ejemplo 7

Los péptidos de fusión se pueden asociar con diversos sistemas de administración: comparación de virosomas (IRIV), sistemas de administración Montanide™ e ISCOM

Se inmunizaron ratones Balb/c por vía subcutánea con 1 µg de HA del virus gripal A/H1N1 inactivado. Tres semanas después, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con PEV606 (SEC ID N° 6) y PEV608 (SEC ID N° 8) acoplados bien a virosomas (IRIV) o formulados con Montanide ISA™ 51 (Montanide ISA™ 51 es emulsión de

oleato de manida-agua y aceite mineral-agua) o ISCOM dos veces con un intervalo de 3 semanas. La sangre se extrajo 2 semanas después de la inoculación final, y los sueros se ensayaron en ELISA. Se midieron los niveles de anticuerpos por ELISA realizado en sueros obtenidos de ratones inmunizados con las formulaciones indicadas en la figura. Se recubrieron placas de ELISA con PEV603 (SEC ID N° 3). La presencia del anticuerpo en el suero se expresa como la absorbancia a 492 nm. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Los datos mostrados en la Fig. 4 demuestran que los péptidos de fusión PEV604 (SEC ID N° 4) y PEV607 (SEC ID N° 7) acoplados a un sistema de administración de virosoma inducen niveles más altos de anticuerpos contra un solo epítipo (PEV603; SEC ID N° 3) que los correspondientes péptidos de fusión formulados con un sistema de administración de Montanide™ o ISCOM.

10 Ejemplo 8

Acoplamiento de péptido de fusión con fosfoetanolamina

15 Para una preparación de virosoma de 4 ml, se proporciona la cantidad designada del péptido de fusión y se vuelve a suspender en 1 ml de OEG 100 mM en PBS. Se transfiere esta solución a 50 mg de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) inmovilizada sobre perlas de Amberlite (Merck Biosciences Novabiochem, Laeufelfingen, Suiza) y se incuba durante 30 min a TA. Se retiran las perlas y la solución se transfiere a 4 mg de N-MCC-PE recién preparado (aprox. 4,3 μmol; Genzyme Pharmaceuticals, Liestal, Suiza) y se incuba a 25 °C mientras se agita durante al menos 2 h. Finalmente, los grupos de maleimida sin usar de la fosfoetanolamina son consumidos mediante la adición de pequeñas cantidades de tampón Tris a pH 7,4. La solución se conserva a 4 °C hasta su uso.

Ejemplo 9

Composición vacunal que contiene péptido de fusión en combinación con un sistema de administración de virosoma

25 *9.1 Reactivos usados en los ejemplos de preparación y de trabajo*

30 Reactivos: el octaetilenglicol-mono-(*n*-dodecil)éter (OEG, C₁₂E₈) se adquirió en Fluka Chemie GmbH-(Buchs, Suiza). La sacarosa (*Eur. Phar.*) se adquirió en Merck (Dietikon, Suiza). La fosfatidilcolina de huevo (PC) se obtuvo en Lipoid (Cham, Suiza). La 1-oleoil-3-palmitoil-rac-glicero-2-fosfoetanolamina (PE) se obtuvo en Bachem (Bubendorf, Suiza). Las perlas Bio-Bead SM2 se adquirieron en Bio-Rad Laboratories (Glattbrugg, Suiza). El cloruro de colesterol-*N*-(trimetilamonioetil)carbamato (TC-chol) se adquirió en Merck Eprova (Schaffhausen, Suiza). Los virus de la gripe de la cepa A/Singapur/6/86 (A/Sing) y otras cepas de la gripe A, reproducidas en la cavidad alantoidea de huevos embrionados (Gerhard, W. (1976), *J. Exp. Med.* 144: 985-995), se obtuvieron en Berna Biotech AG (Bern, Suiza) y se purificaron como se describe (Skehel, J. *et al.*, (1971.). "Virology" 44: 396). La proporción de hemaglutinina/fosfolípido se determinó de acuerdo con Böttcher (Böttcher *et al.* (1961). *Anal. Chim. Acta* 24, 203) y la cuantificación de HA tras la SDS-PAGE se realizó usando el método de extracción con Coomassie según lo descrito por Ball (Bola (1986). *Anal. Biochem.* 155, 23).

40 *9.2 Preparación de virosomas*

45 Para la preparación del sistema de administración de virosoma (IRIV), se centrifugó una solución de hemaglutinina del virus gripal A/Singapur purificada (4 mg) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 min a 100.000 g, y se disolvió el sedimento en PBS (1,33 ml) que contenía octaetilenglicolmonodeciléter 100 mM (PBS-OEG). Se disolvieron fosfatidilcolina (32 mg; Lipoid, Ludwigshafen, Alemania) y fosfatidiletanolamina (6 mg) en un volumen total de 2,66 ml de PBS-OEG. Se mezclaron los fosfolípidos y las soluciones de hemaglutinina, y se sometieron a ultrasonidos durante 1 min. Se centrifugó esta solución durante 1 hora a 100.000 g, y el sobrenadante se filtró en condiciones estériles. A continuación, se formaron virosomas mediante la eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de SM2 perlas Bio-Bead húmedas (BioRad, Glattbrugg, Suiza) durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. La solución de virosoma se conservó a 4 °C.

9.3 Preparación de péptido de fusión acoplado a virosomas (péptido de fusión-IRIV)

55 Se prepararon IRIV con péptido de fusión mediante el método de eliminación de detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disolvieron 32 mg de PC de huevo y 4 mg de PE en 2 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG), y se añadió el conjugado de proteína-PE preparado (1 ml) a esta mezcla. Se centrifugaron 2 mg de HA de virus de la gripe A/Singapur/6/86 inactivado a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C, y el sedimento se disolvió en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclaron los fosfolípidos disueltos en detergente y los virus, y se sometieron a ultrasonidos durante 1 min. Se centrifugó esta mezcla a 100.000 g durante 1 hora a 18 °C, y se recogió el sobrenadante para las etapas posteriores. 60 A continuación, se formaron virosomas mediante la eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de SM2 perlas Bio-Bead húmedas durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. La solución de virosoma se conservó a 4 °C.

Ejemplo 10

Composición vacunal que contiene péptido de fusión en combinación con virosomas liofilizados como sistema de administración

5

10.1 Preparación de virosomas que contienen TC-Chol

Se prepararon virosomas que contenían TC-Chol mediante el método de eliminación de detergente. Para un volumen final de 4 ml, se disolvieron 32 mg de PC de huevo, 8 mg de OPPE y 5 mg de cloruro de colesterol-N-(trimetilamonioetil)carbamato (TC-chol) en 2,6 ml de PBS, OEG 100 mM (PBS/OEG). Se centrifugaron 2 mg de HA de virus de la gripe A/Singapur/6/86 inactivado u otro virus de la gripe A a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C, y el sedimento se disolvió en 1 ml de PBS/OEG. Se mezclaron los fosfolípidos disueltos en detergente y los virus con 0,4 ml de sacarosa al 50 % (p/v), y se sometieron a ultrasonidos durante 1 min. Se centrifugó esta mezcla a 100.000 g durante 1 hora a 18 °C. Se formaron virosomas mediante la eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de SM2 perlas Bio-Bead húmedas durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. Los virosomas recién formados se esterilizaron luego por filtración (0,22 µm) y se dividieron en alícuotas en viales de vidrio estériles. Se congelaron los viales cerrados a -70 °C y luego se liofilizaron a -40 °C durante 20 h y a 10 °C durante 2 h. Los viales cerrados se almacenaron congelados hasta su uso.

10.2 Preparación de péptido de fusión acoplado a virosomas liofilizables (péptido-TIRIV)

Para obtener un sistema de administración de TIRIV con péptido de fusión acoplado (es decir, asociado covalentemente) a un anclaje de fosfolípido, se acopla la proteína a PE como se ha descrito anteriormente y se disuelve en la solución que contiene PC de huevo, PE y TC-Chol en PBS/OEG, antes de combinar con la HA viral del virus de la gripe H1N1 inactivado disuelta en detergente. Se mezclan los fosfolípidos disueltos con detergente y los virus con sacarosa a una concentración final del 5 % (p/v) y se someten a ultrasonidos durante 1 min. Se centrifuga esta mezcla a 100.000 xg durante 1 hora a 18 °C. Entonces, se forman virosomas con el péptido de fusión acoplado a su membrana mediante la eliminación del detergente usando dos veces 1,5 g de perlas Bio-Bead SM2 húmedas durante 1 h cada vez a temperatura ambiente con agitación. Se esterilizan los virosomas por filtración (0,22 µm) y se dividen en alícuotas en viales de vidrio estériles. Se congelan los viales cerrados a -70 °C y luego se liofilizan a -40 °C durante 20 h y a 10 °C durante 2 h. Los viales cerrados se almacenan congelados hasta su uso.

La reconstitución de los TIRIV liofilizados se realizó con un volumen igual de agua estéril. El vial se mezcló brevemente durante aproximadamente 10 s en el vórtice a nivel intermedio y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

35

Ejemplo 11

Composición vacunal que contiene péptido de fusión en combinación con un sistema de administración de Montanide™

40

Se disolvieron péptidos en dimetilsulfóxido (DMSO) a 20 mg/ml, se diluyeron más en PBS a 1 mg/ml y se emulsionaron a una proporción 1:1 con Montanide ISA™ 51 (Seppic, Francia) para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml. Para preparar la emulsión, se agitó la mezcla en vórtice durante 30 segundos a 2.000 rpm seguido de la emulsificación mediante extrusión con jeringa. Para ello, se hizo pasar la mezcla 25 veces a través de un conector de calibre 18 entre dos jeringas.

45

Ejemplo 12

Composición vacunal que contiene péptido de fusión en combinación con un sistema de administración de ISCOM

50

Para un volumen final de 0,6 ml de formulación vacunal, se mezclaron 15 µl de la solución de péptido (20 mg/ml en DMSO) con 150 µl de AbISCO®-100 (Isconova, Suecia; 0,48 mg/ml; AbISCO® se compone de fracciones de saponina purificada obtenidas de un extracto en bruto de la planta *Quillaja saponaria* Molina, fosfatidilcolina y colesterol) y 435 µl de PBS para obtener una concentración final del péptido 0,5 mg/ml.

55

Ejemplo 13

Composición vacunal que contiene péptido de fusión en combinación con un sistema de administración de toxoide tetánico (TT)

60

Se disolvió sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC; Apolo Scientific Ltd, Reino Unido) en PBS a 5 mg/ml. Se diluyó toxoide tetánico (TT; Statens Serum Institute, Dinamarca) con PBS a 0,5 mg/ml. Se incubó 1 ml de solución de TT con 175 µl de la solución de sulfo-SMCC durante 30 min a temperatura ambiente. Se mezclaron 0,5 ml de esta solución de sulfo-SMCC/TT con 0,5 mg de péptido disuelto en 1 ml de PBS y se

incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Para la formulación final, se añadió PBS hasta un volumen final de 2 ml.

Ejemplo 14

5

Determinación de "epítomos de linfocitos B"

10

Los posibles epítomos de linfocitos B se pueden predecir mediante el análisis computacional de la secuencia de aminoácidos de Her2/neu usando el servidor de predicción ABCpred disponible gratuitamente en www.imtech.res.in/raghava/abcpred/, fijando el umbral en 0,51 y la longitud de la ventana de predicción en 16. La herramienta ABCpred sirve para la predicción de epítomos de linfocitos B en una secuencia de antígeno usando una red neuronal artificial descrita por Saha y Raghava, "Proteins" 65: 40-48, 2006.

15

<110> Pevion Biotech AG

<120> VACUNA BC multiepitópica

<130> PCT66309HVSZpau

20

<140> aún no asignada

<141> 18-08-2010

<150> 09 010 627.9

<151> 18-08-2009

25

<160> 57

<170> PatentIn versión 3.3

30

<210> 1

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Fragmento peptídico PEV601

<400> 1

Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln
1 5 10 15

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Cys
20

40

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

45

<220>

<223> Fragmento peptídico PEV602

<400> 2

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

50

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

55

<220>

<223> Fragmento peptídico PEV603

<400> 3

Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys
1 5 10

ES 2 562 157 T3

5
 <210> 4
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento peptídico PEV604
 <400> 4
 Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His
 20 25 30
 Ser Leu Pro Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala
 35 40 45
 Cys
 10
 <210> 5
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Fragmento peptídico PEV605
 <400> 5
 Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His
 20 25 30
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys
 35 40 45
 20
 <210> 6
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Fragmento peptídico PEV606
 <400> 6
 Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Ser Arg
 20 25 30
 Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 35 40 45
 30
 <210> 7
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Fragmento peptídico PEV607
 <400> 7

ES 2 562 157 T3

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Ser
 1 5 10 15

Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln
 20 25 30

Pro Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys
 35 40 45

<210> 8
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Fragmento peptídico PEV608

10

<400> 8

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Ser
 1 5 10 15

Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Ser Pro Glu
 20 25 30

Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Cys
 35 40 45

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

15

<220>
 <223> Fragmento peptídico PEV609

20

<400> 9

Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Ser Pro Glu
 1 5 10 15

Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Arg
 20 25 30

Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 35 40 45

<210> 10
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Fragmento peptídico PEV610

30

<400> 10

Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Ser Arg Val
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Ser Pro Glu
 20 25 30

Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Cys
 35 40 45

<210> 11
 <211> 1255

ES 2 562 157 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 5 <223> dominio extracelular de Her2/neu humano

<400> 11

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175

Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190

His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205

Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220

Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255

His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270

Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg

ES 2 562 157 T3

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605
 Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620
 Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640
 Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655
 Ala val val Gly Ile Leu Leu val Val Val Leu Gly val Val Phe Gly
 660 665 670
 Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
 675 680 685
 Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
 705 710 715 720
 Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
 725 730 735
 Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
 740 745 750
 Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
 755 760 765
 Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
 770 775 780
 Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
 785 790 795 800
 Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
 805 810 815
 Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
 820 825 830
 Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
 835 840 845
 Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
 850 855 860
 Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
 865 870 875 880

ES 2 562 157 T3

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala
915 920 925

Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro
930 935 940

Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met
945 950 955 960

Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe
965 970 975

Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu
980 985 990

Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser L
995 1000 1005

Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr
1010 1015 1020

Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly
1025 1030 1035

Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg
1040 1045 1050

Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu
1055 1060 1065

Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser
1070 1075 1080

Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu
1085 1090 1095

Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser
1100 1105 1110

Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val
1115 1120 1125

Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro
1130 1135 1140

Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro
1145 1150 1155

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
1160 1165 1170

ES 2 562 157 T3

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
 1175 1180 1185

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

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

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

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

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
 1250 1255

<210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Fragmento peptídico PEV11

10

<400> 12

Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln
 1 5 10 15

Pro

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Fragmento peptídico

20

<400> 13

Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Fragmento peptídico

30

<400> 14

Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 15

Leu Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
 1 5 10 15

40

<210> 16

ES 2 562 157 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 16
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 1 5 10 15

10

<210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 17
 Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
 1 5 10 15

20

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 18
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 1 5 10 15

30

<210> 19
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 19
 Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser
 1 5 10 15

40

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 20
 Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr
 1 5 10 15

50

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

55

<220>

ES 2 562 157 T3

<223> Fragmento peptídico

<400> 21

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

5 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 22

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys
 1 5 10 15

15 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 23

Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 1 5 10 15

25 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 24

Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro
 1 5 10 15

35 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 25

Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro
 1 5 10 15

45 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 26

Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly
 1 5 10 15

55 <210> 27
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 27
 Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu
 1 5 10 15

10 <210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 28
 Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro
 1 5 10 15

20 <210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 29
 Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
 1 5 10 15

30 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 30
 Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln
 1 5 10 15

40 <210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 31
 Tyr Val Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro
 1 5 10 15

50 <210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 32

ES 2 562 157 T3

His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys
 1 5 10 15
 <210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento peptídico
 10 <400> 33
 Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento peptídico
 20 <400> 34
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 1 5 10 15
 <210> 35
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento peptídico
 30 <400> 35
 Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento peptídico
 40 <400> 36
 Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala
 1 5 10 15
 <210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Fragmento peptídico
 50 <400> 37
 Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp
 1 5 10 15
 <210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

ES 2 562 157 T3

<220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 38
 Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro
 1 5 10 15

5
 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 39
 Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala
 1 5 10 15

15
 <210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 40
 Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln
 1 5 10 15

25
 <210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 41
 Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp
 1 5 10 15

35
 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 42
 Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro
 1 5 10 15

45
 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

50
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 43
 Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn
 1 5 10 15

55
 <210> 44
 <211> 16

<212> PRT
 <213> Artificial

5
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 44
 val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp
 1 5 10 15

10
 <210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

15
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 45
 His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro
 1 5 10 15

20
 <210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 46
 Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile
 1 5 10 15

30
 <210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 47
 Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu
 1 5 10 15

40
 <210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

45
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 48
 Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro
 1 5 10 15

50
 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

55
 <220>
 <223> Fragmento peptídico

<400> 49

ES 2 562 157 T3

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

<210> 50
<211> 16
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Fragmento peptídico

10 <400> 50
Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg
1 5 10 15

<210> 51
<211> 16
<212> PRT
15 <213> Artificial

<220>
<223> Fragmento peptídico

20 <400> 51
Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser
1 5 10 15

<210> 52
<211> 16
<212> PRT
25 <213> Artificial

<220>
<223> Fragmento peptídico

30 <400> 52
Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr
1 5 10 15

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> Fragmento peptídico

40 <400> 53
Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys
1 5 10 15

<210> 54
<211> 16
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> Fragmento peptídico

50 <400> 54
Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln
1 5 10 15

<210> 55
<211> 16
<212> PRT
55 <213> Artificial

<220>

ES 2 562 157 T3

<223> Fragmento peptídico

<400> 55

Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly
1 5 10 15

5

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Fragmento peptídico

<400> 56

Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn
1 5 10 15

15

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Fragmento peptídico

<400> 57

Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp
1 5 10 15

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido de fusión que comprende tres epítomos de linfocitos B no contiguos del dominio extracelular (ECD) de Her2/neu, o derivados de los mismos que conservan su cualidad como epítomo de linfocitos B, en el que los tres epítomos de linfocitos B no contiguos están enlazados directamente entre sí o enlazados a través de una secuencia de péptido enlazador no natural en una sola cadena polipeptídica, y en el que los tres epítomos de linfocitos B no contiguos tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N° 12, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3.
- 10 2. El péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido de fusión comprende una secuencia seleccionada entre cualquiera de SEC ID N° 4-10.
3. El péptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido de fusión consiste en una secuencia seleccionada entre cualquiera de SEC ID N° 4-10.
- 15 4. Un método de preparación de un péptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
- I. mediante un método de síntesis de péptidos que comprende
- 20 (i) la formación secuencial de enlaces peptídicos que unen cada aminoácido a su aminoácido respectivamente vecino; y
- (ii) la recuperación de dicho péptido de fusión;
- o
- 25 II. mediante un método recombinante que comprende las siguientes etapas:
- (i) proporcionar un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
- (ii) transfectar dicho ácido nucleico a una célula hospedadora capaz de expresar dicha secuencia de ácido nucleico;
- 30 (iii) incubar dicha célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico; y
- (iv) recuperar dicho péptido de fusión.
5. Un sistema de administración asociado covalente y/o no covalentemente con un péptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o un péptido de fusión que se puede obtener mediante un método de la reivindicación 4.
- 35 6. El sistema de administración de la reivindicación 5, en el que dicho sistema de administración se selecciona entre virosoma, un liposoma, una partícula similar a un virus (VLP), toxoide tetánico (TT), una hemocianina de lapa californiana (KLH), un complejo de inmunoestimulación (ISCOM), una emulsión, antígeno del núcleo de la hepatitis B (HBc), una nano- o micropartícula, una sal de aluminio, fosfato de calcio, estearil-tirosina o un vector viral; o una combinación de dos o más de los mismos.
- 40 7. El sistema de administración de la reivindicación 6, en el que el sistema de administración es un virosoma en el que el péptido de fusión está encapsulado o al que el péptido de fusión está unido covalentemente.
- 45 8. El sistema de administración de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el péptido de fusión está unido covalentemente a una proteína de la envoltura viral o a un componente lipídico del virosoma.
9. El sistema de administración de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el componente lipídico del virosoma es fosfatidiletanolamina.
- 50 10. El sistema de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el virosoma es un IRIV o un TIRIV.
11. Un péptido de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un péptido de fusión que se puede obtener mediante un método de acuerdo con la reivindicación 7 o un sistema de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-13 para su uso como un medicamento.
- 55 12. Una composición que comprende un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un péptido de fusión que se puede obtener mediante un método de acuerdo con la reivindicación 7 y/o un sistema de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-10.
- 60 13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además un inmunopotenciador.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el inmunopotenciador se selecciona entre una toxina bacteriana, un lipopolisacárido de la superficie celular bacteriana (LPS), lípido A y/o un derivado sintético del mismo, un oligopéptido, un patrón molecular asociado a un patógeno alternativo (PAMP), un lipopéptido, una
- 65

- lipoproteína, un peptidoglicano, ácido lipoteicoico (LTA), un componente de la pared celular de la levadura, un glicolípido, ADN viral o bacteriano, un oligonucleótido, ARN bicatenario, ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), ARN viral monocatenario, un potenciador inmune de molécula pequeña (SMIP), una citocina, una quimiocina, una saponina, un polifosfaceno, una estructura de cocleado, un supresor del ARN interferente pequeño de la señalización de citocinas (ARNip de SOCS) o un epítipo Pan DR (PADRE); o una combinación de dos o más de los mismos.
- 5
15. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14 y un vehículo farmacéutico aceptable.
- 10
16. Uso de un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un péptido de fusión que se puede obtener de acuerdo con un método de acuerdo con la reivindicación 4, un sistema de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-10 y/o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 12-15 para la preparación de un medicamento para la prevención, el tratamiento y/o la mejora de un cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de Her2.
- 15
17. El uso de la reivindicación 16, en el que el cáncer es cáncer de mama.
18. Un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un péptido de fusión que se puede obtener de acuerdo con un método de acuerdo con la reivindicación 4, un sistema de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-10 y/o una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15 para su uso en un método de prevención, tratamiento y/o mejora de un cáncer caracterizado por la expresión o sobreexpresión de Her2.
- 20
19. El péptido de fusión, sistema de administración y/o composición de la reivindicación 18, en la que el cáncer es cáncer de mama.
- 25
20. Un péptido de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, un péptido de fusión que se puede obtener de acuerdo con un método de acuerdo con la reivindicación 4 o un sistema de administración de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-10 para su uso como un medicamento.
- 30

Fig. 1

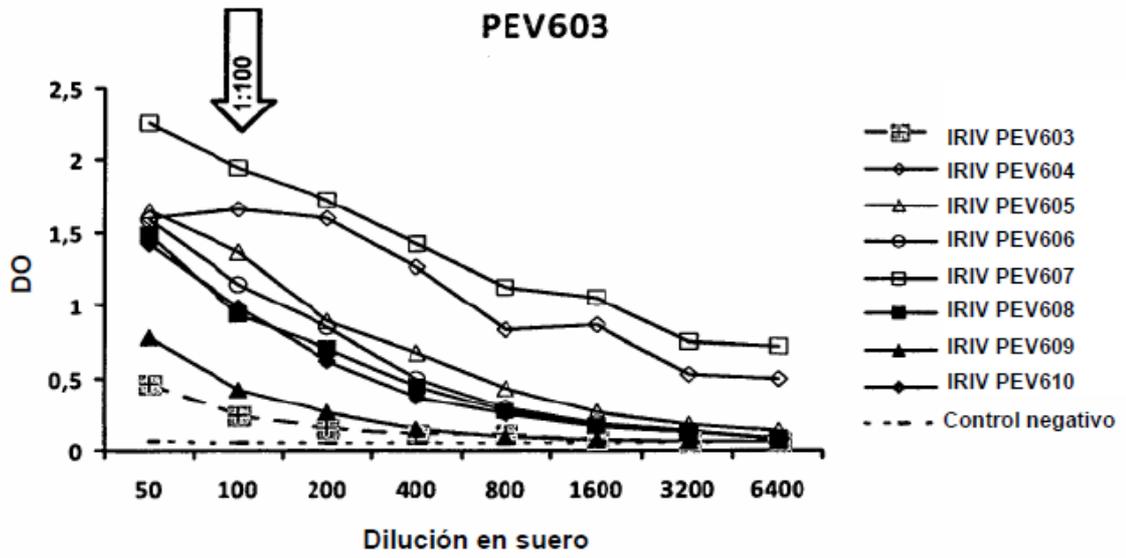
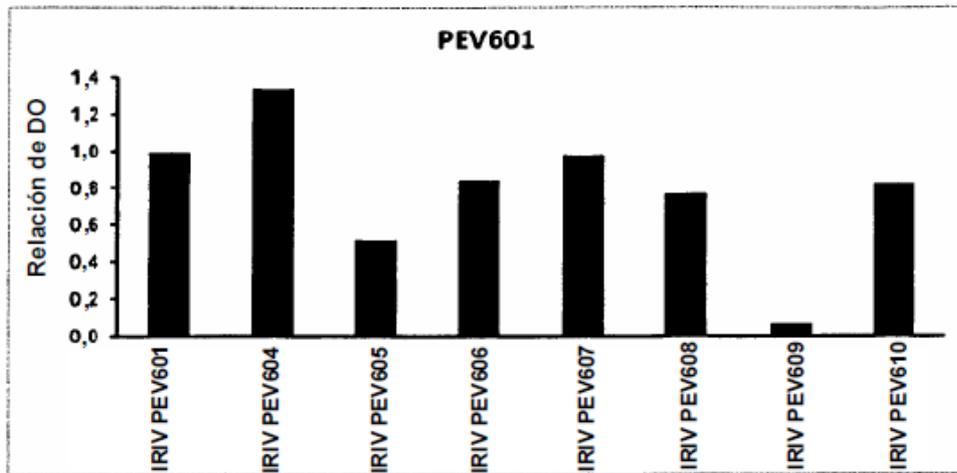
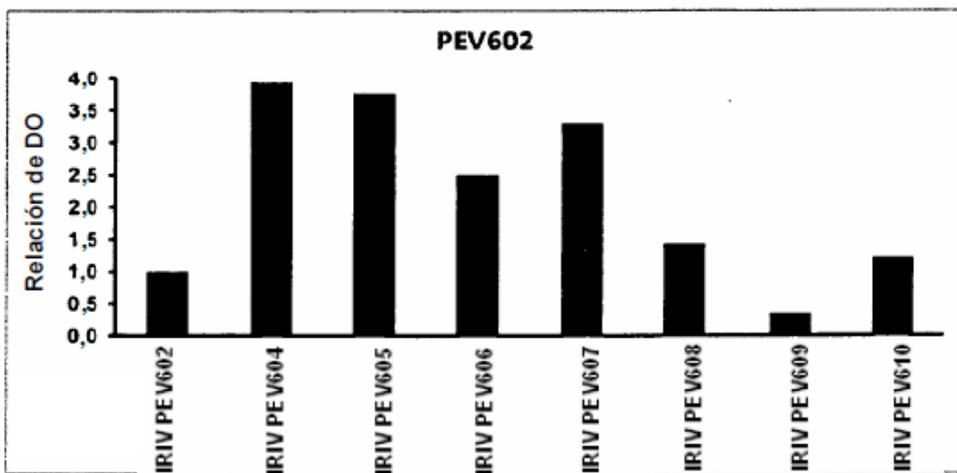


Fig. 2
A



B



C

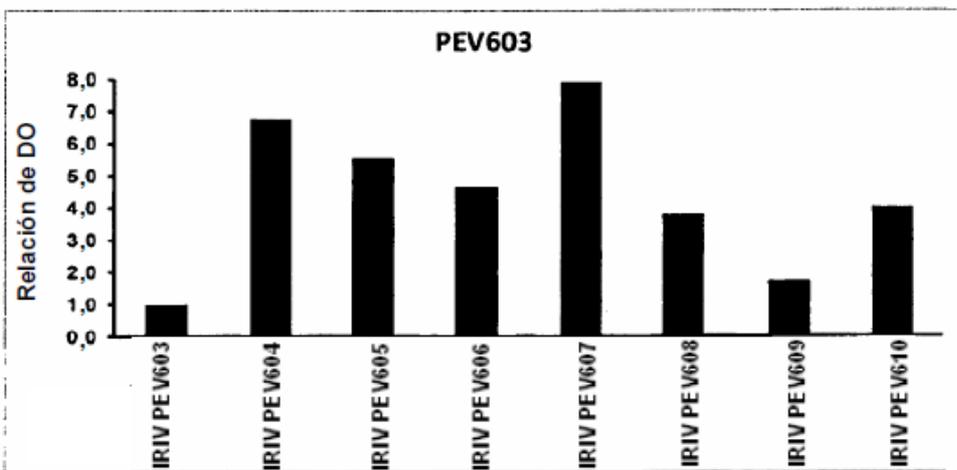


Fig. 3

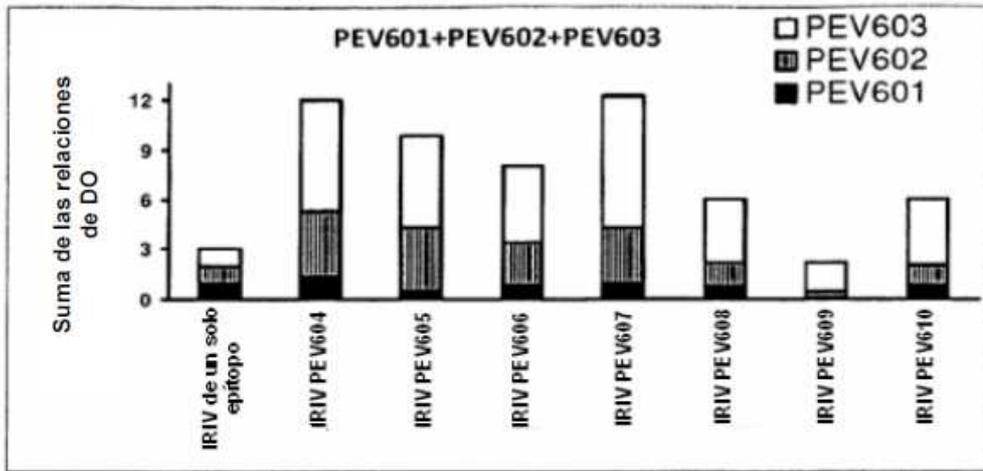


Fig. 4

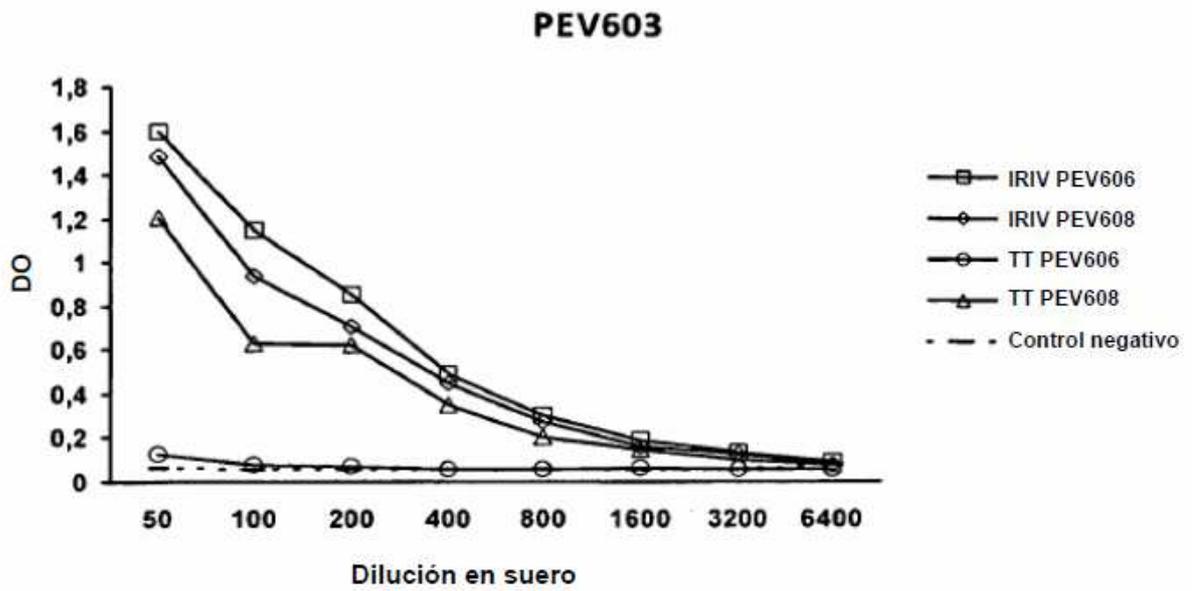


Fig. 5

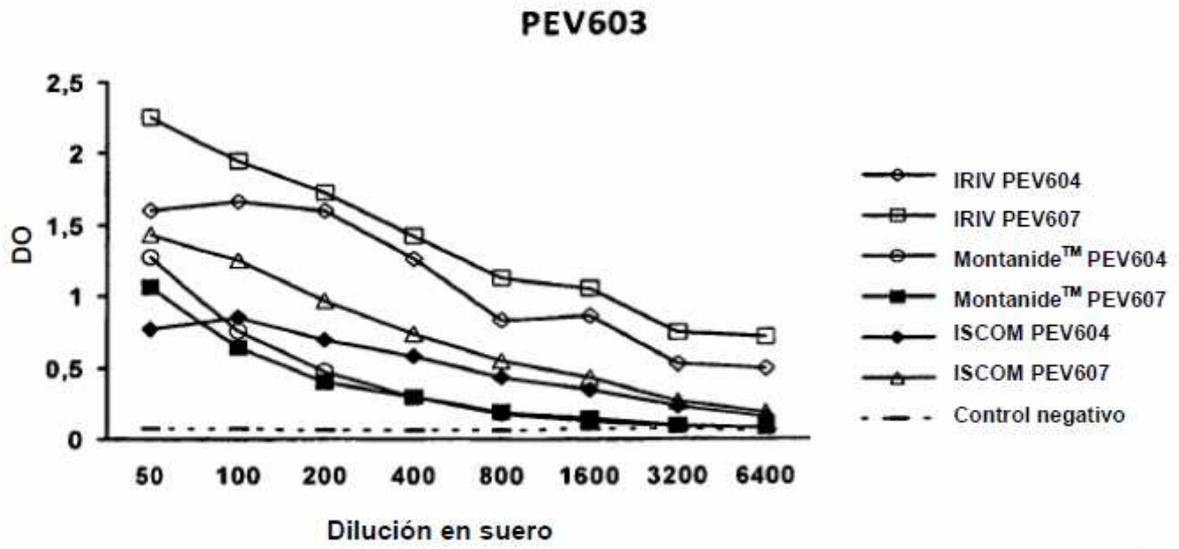


Fig. 6

MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTMKLRRLPAS PETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL
 ELTYLPTNASLSFLQDIOEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNG
 DPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNOLA
 LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQC
 AAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACP
 YNYLSTDVGSCTLVCPHNOEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRVTSAN
 IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEBITGYLYISAWPDSL
 DLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLOGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHHTHLFCVHTV
 PWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQEC
 VEECRVLOGLPREYVNARHCLPCHPECQPONGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARC
 PSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSII SAVVG
 ILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETEL
 RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGS
 YVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGLSODLLNWCMIKAGMSYLEDVR
 LVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPIKWMMALESILRRRFT
 HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWM
 IDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDA
 EEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEG
 AGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLOQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYV
 NQPDVRFQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLPKNGVVKDVFVAFGGAVENPEYLTPQ
 GGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVVP