

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 409**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2011 PCT/EP2011/053996**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11113872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2011 E 11708860 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2547691**

54 Título: **Composición de péptidos asociados a tumores y vacuna contra el cáncer relacionada con ellos para el tratamiento del cáncer gástrico y de otros tipos de cáncer**

30 Prioridad:

**19.03.2010 US 315715 P**  
**19.03.2010 GB 201004575**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.12.2016**

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)**  
**Paul-Ehrlich-Strasse 15**  
**72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**FRITSCH, JENS;**  
**WEINSCHENK, TONI;**  
**WALTER, STEFFEN;**  
**LEWANDROWSKI, PETER y**  
**SINGH, HARPREET**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 593 409 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composición de péptidos asociados a tumores y vacuna contra el cáncer relacionada con ellos para el tratamiento del cáncer gástrico y de otros tipos de cáncer

5 La presente invención se refiere a péptidos inmunoterapéuticos y su uso en inmunoterapia, en particular, en la inmunoterapia del cáncer. Se dan a conocer epítomos de péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T colaboradores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, que sirven como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales que estimulan respuestas inmunitarias antitumorales. En concreto, la composición de dichos péptidos puede ser utilizada en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales contra cánceres gástricos y otros tipos de cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

15 El cáncer gástrico es una enfermedad que se caracteriza por la aparición de células tumorales malignas en la mucosa que recubre el estómago. El cáncer de estómago o gástrico puede aparecer en cualquier parte del estómago y extenderse por todo él y a otros órganos, sobre todo al esófago, a los pulmones y al hígado. El cáncer de estómago es el cuarto cáncer más frecuente en el mundo con 930.000 casos diagnosticados en 2002. Es una enfermedad con una elevada tasa de mortalidad (~800.000 al año) que la convierte en la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo, solo superada por el cáncer de pulmón. Afecta con más frecuencia a los varones y sobre todo a los habitantes de los países asiáticos y de países en vías de desarrollo. (Información disponible en la OMS)

20 En Estados Unidos representa aproximadamente el 2% (25.500 casos) de los casos nuevos de cáncer cada año, pero es más frecuente en otros países. En Corea es el cáncer más importante, con el 20,9% de las neoplasias malignas. En Japón el cáncer gástrico sigue siendo el cáncer más común en la población masculina. Cada año en Estados Unidos se diagnostica cáncer de estómago a unos 13.000 hombres y 8.000 mujeres. La mayoría tienen más de 70 años.

25 El cáncer de estómago es el cuarto tipo de cáncer más frecuente en el mundo, por detrás del cáncer de pulmón, mama, colon y recto. Además, sigue siendo la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer. La Sociedad Americana contra el Cáncer (*American Cancer Society*) calcula que en 2007 se produjeron un millón de casos nuevos, cerca del 70% en países en vías de desarrollo, y unos 800.000 fallecimientos (véanse las publicaciones de la *American Cancer Society*).

30 La incidencia de la enfermedad presenta una enorme variación geográfica en el globo. La incidencia es máxima en Asia y en regiones de Sudamérica y mínima en Norteamérica. La mortalidad más elevada se registra en Chile, Japón, Sudamérica y la antigua Unión Soviética.

35 El cáncer gástrico se diagnostica a menudo en un estadio avanzado debido a la inexistencia de campañas de cribado en la mayor parte del mundo, excepto en Japón (y, de forma limitada, en Corea) donde la detección precoz es un hecho frecuente. Así pues, supone un desafío importante para los profesionales sanitarios. Los factores de riesgo del cáncer gástrico son la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), el tabaquismo, la abundante ingesta de sal y otros factores alimenticios. Una pequeña parte de los casos de cáncer gástrico (1% a 3%) está vinculada a síndromes de predisposición genética. Las mutaciones de la cadherina E están presentes en cerca del 25% de las familias con predisposición a la dominancia autosómica del cáncer gástrico de tipo difuso. Este subgrupo de tumores gástricos ha sido denominado cáncer gástrico difuso hereditario.<sup>12</sup> Puede ser útil ofrecer consejo genético y considerar la gastrectomía profiláctica en portadores jóvenes asintomáticos de mutaciones truncadoras en la línea germinal.

45 La pared del estómago está compuesta por tres capas de tejido: la mucosa (interna), la capa muscular (media) y la capa serosa (externa). El cáncer gástrico comienza en las células que recubren la mucosa y se extiende hasta las capas externas a medida que crece. Cuatro son los tipos de tratamiento estándar. El tratamiento del cáncer gástrico puede consistir en cirugía, quimioterapia, radioterapia y quimiorradioterapia. La cirugía es el tratamiento primario contra el cáncer gástrico. El objetivo es lograr la resección completa con márgenes negativos (resección R0). Sin embargo, cerca del 50% de los pacientes con cáncer gástrico locorregional no son aptos para la resección R0. R1 indica cáncer residual microscópico (márgenes positivos); y R2 cáncer residual macroscópico pero sin metástasis. El desenlace del paciente depende del estadio del cáncer en el momento del diagnóstico (*NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™*).

50 La supervivencia a 5 años tras la resección con finalidad curativa se sitúa entre el 30% y el 50% en los pacientes con estadio II y entre el 10% y el 25% en los pacientes con estadio III. Estos pacientes tienen un alto riesgo de recidiva local y sistémica. La metástasis aparece en el 80-90% de los individuos con cáncer de estómago, con una tasa de supervivencia a seis meses del 65% en los diagnosticados en estadios iniciales y de menos del 15% en los diagnosticados en estadios avanzados.

55 En definitiva, sigue existiendo la necesidad de nuevas opciones terapéuticas eficaces y seguras para los pacientes con cáncer gástrico, carcinoma prostático, carcinomas de la cavidad bucal, carcinoma escamoso oral (OSCC), leucemia mieloide aguda (LMA) (Qian et al., 2009), linfoma MALT inducido por *H. pylori* (Banerjee et al., 2000),

carcinoma de colon/cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cánceres de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de hígado, tumores cerebrales de diverso fenotipo, leucemias como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), cáncer de pulmón, sarcoma de Ewing, cáncer de endometrio, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer epitelial de laringe, carcinoma esofágico, carcinoma oral, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinomas ováricos, carcinoma de células renales, meningioma atípico, carcinoma papilar de tiroides, tumores cerebrales, carcinoma de los conductos salivales, cáncer de cuello de útero, linfomas de linfocitos T/NK extraganglionares, linfoma no hodgkiniano y tumores sólidos malignos del pulmón y la mama, y otros tumores. También existe la necesidad de opciones terapéuticas que mejoren el bienestar de los pacientes prescindiendo del uso de antineoplásicos y otros agentes que pueden causar efectos secundarios graves.

### **Carcinoma colorrectal**

Según la Sociedad Americana contra el Cáncer (*American Cancer Society*), el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más habitual en Estados Unidos puesto que afecta a más de 175.000 nuevos pacientes cada año. En Estados Unidos, Japón, Francia, Alemania, Italia, España y Reino Unido el número de pacientes afectados supera los 480.000. Ello lo convierte en una de las principales causas de muerte por cáncer en los países industrializados. Las investigaciones sugieren que el cáncer colorrectal tiene su origen en la interacción entre factores hereditarios y ambientales. En la mayor parte de los casos los pólipos adenomatosos parecen ser los precursores de los tumores colorrectales, aunque el proceso de transición puede durar muchos años. El principal factor de riesgo del cáncer colorrectal es la edad, ya que el 90% de los casos se diagnostican a partir de los 50 años. Otros factores de riesgo referidos por la *American Cancer Society* son el consumo de alcohol, la alimentación rica en grasas o carnes rojas y una ingesta insuficiente de frutas y verduras. La incidencia sigue aumentando especialmente en zonas como Japón, donde como posibles causas se barajan la adopción de la alimentación de estilo occidental, con la ingesta excesiva de grasas y carne y la reducción del consumo de fibra. Con todo, la incidencia no aumenta al mismo ritmo que en el pasado, lo cual se atribuye al aumento de las exploraciones preventivas y a la extirpación de los pólipos que de lo contrario se habrían convertido en tumores malignos.

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

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

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

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

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

### **Carcinoma de próstata y otros tumores a título de ejemplo**

Con una cifra estimada de 27.050 fallecimientos en 2007, el cáncer de próstata es la principal causa de muerte por cáncer en varones. Aunque los índices de deceso se han reducido entre la población blanca y afroamericana desde principios de los 90, el nivel registrado entre los varones afroamericanos duplica con creces el de los hombres de raza blanca. El cáncer de próstata es el más diagnosticado en los varones. Por motivos que siguen sin estar claros, la incidencia es significativamente mayor entre los varones afroamericanos que entre los de raza blanca. La incidencia del cáncer de próstata ha cambiado notablemente durante los últimos 20 años: experimentó un rápido incremento entre 1988 y 1992 para reducirse drásticamente entre 1992 y 1995 y volver a repuntar ligeramente desde

1995. Estas tendencias reflejan en gran parte el aumento de los programas de detección del cáncer de próstata mediante el análisis sanguíneo del antígeno específico de la próstata (PSA). El moderado incremento de la incidencia acaecido durante la última década probablemente pueda atribuirse a la generalización del reconocimiento preventivo del PSA entre los varones menores de 65 años. La incidencia del cáncer de próstata se ha estabilizado entre los mayores de 65 años. Los índices marcaron su máximo entre los hombres de raza blanca en 1992 (237,6 por cada 100.000 varones) y en 1993 entre los varones afroamericanos (342,8 por cada 100.000 varones).

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

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

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

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

#### **Cáncer de pulmón**

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

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

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

régimen un alto porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es duradera.

5 El índice de supervivencia relativa para el cáncer de pulmón después de 1 año se ha incrementado ligeramente desde el 37% en 1975-1979 hasta el 42% en 2002, en gran medida gracias a las mejoras en las técnicas quirúrgicas y las terapias combinadas. No obstante, el índice combinado de supervivencia a 5 años para todos los estadios es tan solo del 16%. El índice de supervivencia es del 49% en los casos que son detectados cuando la enfermedad aún está localizada. Pero solo el 16% de los cánceres de pulmón se diagnostica en este estadio inicial.

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

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

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

15

### **Descripción detallada de la invención**

La invención es la definida en las reivindicaciones.

20

En la presente memoria todos los términos corresponden a la definición indicada a continuación, salvo en los casos en que se indique otra cosa. El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes.

25

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

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces

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

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

10 Un «epítomo» de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I o clase II, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos. Los epítomos de linfocitos T que se unen a moléculas MHC de clase II suelen tener una longitud de entre 12 y 30 aminoácidos. En el caso de los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase II, el mismo péptido y el epítomo del linfocito T correspondiente pueden compartir un segmento central común pero en cambio diferir en la longitud total como consecuencia de secuencias de flanco de diferentes longitudes en dirección ascendente del extremo amino de la secuencia central y descendente con respecto a su terminal carboxílico, respectivamente. Los receptores MHC de clase II presentan una conformación más abierta; de la misma manera, los péptidos unidos a receptores MHC de clase II no se enclavan completamente en la estructura de la hendidura de unión al péptido de la molécula MHC de clase II, como ocurre con la hendidura de unión del péptido de la molécula MHC de clase I. Es de notar que éste no es el caso para el péptido con arreglo a la SEQ ID n.º 1, puesto que pequeñas variaciones en la longitud del péptido ocasionan un gran descenso de la actividad (véase más abajo).

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

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

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

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

(continuación)

Frecuencias de expresión de los serotipos HLA-DR y HLA*02 en subpoblaciones de Norteamérica				
Alelo HLA	Americanos de raza blanca	Afroamericanos	Americanos de origen asiático	Hispanoamericanos
DR7	24,8%	19,2%	13,4%	20,2%
DR8	5,7%	12,1%	12,7%	18,6%
DR9	2,1%	5,8%	18,6%	2,1%

5 **Tabla 3:** Frecuencias de expresión F del alelo HLA\*A024 y del serotipo HLA\*A02402. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas  $G_r$  en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg  $F=1-(1-G_f)^2$ . Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al., 2004).

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*2402	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*2402	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*2402	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	Sudamérica	20%
A*24	Europa	18%

**Tabla 3:** Frecuencias de expresión de los serotipos HLA\*02 y A\*2402 en todo el mundo

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

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

La región codificante puede formar parte de un gen normal, mutado o alterado, o incluso puede provenir de una

secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

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

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

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

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

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

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

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

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

35 Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan solo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se contempla expresamente la purificación del material de inicio o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

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

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

ejemplo, el ser humano. De forma alternativa, el «fragmento activo» también se puede usar para inducir una respuesta de linfocitos T *in vitro*.

5 Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Esto significa que cualquiera de esos fragmentos, necesariamente y como parte de su secuencia de aminoácidos, va a contener un segmento, fragmento o porción que es sustancialmente idéntica, si no lo es exactamente, a una secuencia de las SEQ ID n.º 1 a 20, que corresponde a la estructura natural, o a las proteínas «precursoras» de las SEQ ID n.º 1 a 20. Utilizados en relación con los polinucleótidos, dichos términos se refieren a los productos generados por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas habituales.

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

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

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

20 (I) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y  
(II) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y  
(iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia;

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

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

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

#### **Abordajes inmunoterapéuticos para el tratamiento**

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

50 Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T citotóxicos (CTL) entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. En concreto, en dicha respuesta desempeñan un papel importante los linfocitos T CD8-positivos, los cuales reconocen péptidos incorporados en las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que normalmente están compuestos por 8 a 10 residuos de aminoácidos procedentes de proteínas o productos ribosómicos defectuosos (DRIP) localizados en el citosol (Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR.; Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes; Nature 2000; 404(6779):770-774). Las moléculas MHC del ser humano también se denominan

antígenos leucocitarios humanos (HLA).

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

Los linfocitos T cooperadores CD4+ cumplen un importante papel en la organización de las funciones efectoras de la respuesta antitumoral de los linfocitos T y, por esta razón, la identificación de los epítomos derivados de los antígenos asociados a tumor (AAT) que reconocen los linfocitos T CD4+ puede tener gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Grnjatic, S., D. Atanackovic, E. Jager, M. Matsuo, A. Selvakumar, N.K. Altorki, R.G. Maki, B. Dupont, G. Ritter, Y.T. Chen, A. Knuth, and L.J. Old. 2003. Survey of naturally occurring CD4+ T-cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(15):8862-7). Los linfocitos T CD4+ pueden provocar un incremento local de los niveles de IFN-gamma.

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

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células del sistema inmunitario, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Con todo, los inventores han logrado descubrir recientemente cierto número de epítomos de MHC de clase II directamente en tumores (EP 1642905, EP 1760088; Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, Hennenlotter J, Wernet D, Stenzl A, Rammensee HG, Klingel K, Stevanovic" S.; Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas; *Clin Cancer Res.* 2006; 12:4163-4170).

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

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

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

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

Se han descubierto varios antígenos asociados a tumores. Además, se han invertido muchos esfuerzos en identificar nuevos antígenos asociados a tumores. Ciertos grupos de antígenos asociados a tumores, también denominados en la técnica como antígenos específicos de tumores, son específicos de tejido. Los ejemplos incluyen, sin ánimo de limitación, la tirosinasa en el caso del melanoma, el PSA y el PSMA en el del cáncer de próstata y translocaciones cromosómicas como bcr/abl en el linfoma. Sin embargo, muchos antígenos asociados a tumores identificados aparecen en múltiples tipos de tumores, y algunos, como las proteínas oncogénicas y/o los genes oncosupresores (estos últimos genes son revisados por ejemplo para el cáncer renal en Linehan WM, Walther MM, Zbar B. The genetic basis of cancer of the kidney. J Urol. 2003 Dec; 170 (6pt1):2163-72), que realmente causan el evento de transformación, están presentes en casi todos los tipos de tumores. Por ejemplo, proteínas celulares normales que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, como la p53 (un ejemplo de gen supresor de tumores), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones que ocasionan una regulación al alza de la expresión de estos productos génicos, lo que los convierte en oncogénicos {McCartey 1998} (McCartey et al. Cancer Research, 1998, 15:58 2601-5; Disis et al. Ciba Found. Symp. 1994, 187:198-211). Estas proteínas mutantes también pueden ser la diana de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor en múltiples tipos de cáncer.

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

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

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

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

Los primeros ensayos clínicos con péptidos asociados a tumores fueron iniciados a mediados de la década de 1990 por Boon y colaboradores, principalmente para el melanoma. Las mejores respuestas clínicas en los ensayos oscilaron entre el 10% y el 30%. En ningún ensayo clínico sobre una vacuna peptídica en monoterapia se han descrito efectos adversos graves o autoinmunidad severa. Se han descrito formas leves de vitíligo en algunos

pacientes que habían sido tratados con péptidos asociados a melanoma.

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

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

La tarea más importante en el desarrollo de una vacuna antitumoral no solo consiste en identificar y caracterizar nuevos antígenos asociados a tumores y los epítomos inmunogénicos para los linfocitos T colaboradores derivados de los mismos, sino también en combinar diferentes epítomos para aumentar las probabilidades de obtener una respuesta contra más de un epítomo en cada paciente. Por consiguiente, uno de los objetos de la presente invención consiste en ofrecer un antígeno asociado a tumor que tenga la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Otro objeto de la presente invención consiste en ofrecer una vacuna antitumoral eficaz.

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

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

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

De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve proporcionando un péptido asociado a tumor, consistente en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 2 (SYNPLWLR1).

Tal y como describe la presente memoria más abajo, se ha comprobado que el péptido que forma la base de la presente invención es presentado por células portadoras de MHC de clase I. Así pues, este péptido concreto desencadena una respuesta de linfocitos T específicos, aunque la magnitud de esa respuesta puede variar según el péptido de que se trate y según el paciente.

Los péptidos como los dados a conocer proceden de antígenos asociados a tumores, especialmente de antígenos asociados a tumores que intervienen en procesos como por ejemplo la proteólisis, angiogenia, crecimiento celular, regulación del ciclo celular, división celular, regulación de la transcripción, regulación de la traducción, invasión de tejidos, etc. La Tabla 4 expone los péptidos y la función de la proteína de la cual derivan.

**Tabla 4: Péptidos como los descritos y función de la proteína originaria, la SEQ ID N.º 2 es de la invención**

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen:	Se une a MHC
1	CDC2-001	LYQILQGIVF	CDK1	HLA-A*024

(continuación)

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen:	Se une a MHC
2	ASPM-002	SYNPLWLR	ASPM	HLA-A*024
3	UCHL5-001	NYLPFIMEL	UCHL5	HLA-A*024
4	MET-006	SYIDVLPEF	MET	HLA-A*024
5	PROM1-001	SYIIDPLNL	PROM1	HLA-A*024
6	UQCRB-001	YYNAAGFNKL	UQCRB	HLA-A*024
7	MST1R-001	NYLLYVSNF	MST1R	HLA-A*024
8	PPAP2C-001	AYLVYTDRL	PPAP2C	HLA-A*024
9	SMC4-001	HYKPTPLYF	SMC4	HLA-A*024
10	MMP11-001	VWSDVTPLTF	MMP11	HLA-A*024
20	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9	HLA-A*024
24	ERBB3-001	VYIEKNDKL	ERBB3	HLA-A*024

Tabla 5: Otros péptidos inmunogénicos útiles en una composición como la dada a conocer

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen:	Se une a MHC
11	BIR-002	<b>TLGEFLKDRERAKN</b>	BIRC5	HLA-DR y HLA-A*02
12	CDC42-001	DDPSTIEKLAKNKQKP	CDC42	HLA-DR
13	CDC42-002	NKQKPITPETAEKLARD	CDC42	HLA-DR
14	SPP1-001	NGAYKAIPVAQDLNAPS	SPP1	HLA-DR
15	BIR-002a	TLGEFLKDRERAKD	Survivina	HLA-DR y HLA-A*02
16	BIR-002b	FTELTGGEF	Survivina	HLA-A1
17	BIR-002c	LMLGFEFLKL	Survivina	HLA-A2
18	BIR-002d	EPDLAQCFY	Survivina	HLA-B35
19	NUF2-001	VYGIRLEHF	NUF2	HLA-A*024
20	AVL9-001	FYISPVNKL	AVL9	HLA-A*024
21	ABL1-001	TYGNLLDYL	ABL1	HLA-A*024
22	NUF2-002	RFLSGIINF	NUF2	HLA-A*024
23	(HBV-001)	FLPSDFFPSV	péptido de control	

## 5 Proteína 2 del ciclo de división celular (CDC2)

La CDC2, también conocida como p34cdc2 o CDK1 (cinasa 1 dependiente de ciclina), pertenece a las CDK, una familia de proteínas-cinasas de serina y treonina, y juega un papel clave en el control del ciclo celular. Se sabe que es el principal regulador de la transición de la fase G2 a la fase M. Al final de la interfase, se activa uniéndose a las ciclinas de tipo A y facilita el inicio de la mitosis. Tras la disgregación de la membrana nuclear, las ciclinas de tipo A son degradadas y reemplazadas por la ciclina B. El complejo trabado entre la CDC2 y la ciclina B forma el factor promotor de la mitosis (MPF), que es esencial para conducir a la célula a través de la mitosis.

La CDC2 activa fosforila más de 70 sustratos. Por ejemplo, la fosforilación de la histona de enlace H1 provoca una relajación de la estructura cromatínica y la transcripción de genes específicos, y la fosforilación de la ARN-polimerasa II potencia la transcripción (Cisek and Corden, 1989). La fosforilación de la BRCA2 estimula la reparación dependiente de la recombinación homóloga (Esashi et al., 2005) y la fosforilación de FOXO1 inhibe su actividad transcripcional, dando como resultado la proliferación de la célula y su supervivencia. La fosforilación de la separasa inhibe la separación prematura de las cromátidas hermanas (Stemmann et al., 2001). La actividad de la CDC2 se paraliza de nuevo durante la anafase, a medida que el complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) ubiquitina a la ciclina B, provocando su degradación.

La función de la CDC2 en la mitosis no es redundante y no puede ser compensada por la actividad de otras Cdk como las Cdk2, 4 y 6. En cambio, se ha descrito que la Cdc2 interviene en otras fases del ciclo celular como la transición entre las fases G1 y S, y es capaz de sustituir a las «Cdk de la interfase». Así pues, se ha considerado que la Cdc2 sería la única Cdk esencial para el ciclo celular.

Aparte de su expresión y función en el ciclo celular, se ha descrito que en ciertos casos la CDC2 se expresa en condiciones apoptóticas, y que la actividad exacerbada puede degenerar en una catástrofe mitótica. La sobreexpresión de CDC2 ha sido detectada en varios tipos de cáncer, aunque según la expresión de otras proteínas del ciclo celular como las ciclinas aparecen desreguladas con una frecuencia aún mayor. Entre los tipos de cáncer que sobreexpresan la CDC2 se hallan el carcinoma de próstata, los carcinomas de la cavidad bucal, el carcinoma epidermoide oral (OSCC), la leucemia mieloide aguda (LMA) (Qian et al., 2009), el linfoma MALT inducido por *H. pylori* (Banerjee et al., 2000) y el carcinoma de colon (Yasui et al., 1993). En varios casos, la sobreexpresión se correlacionó con un pronóstico malo. En el carcinoma gástrico se ha descrito la sobreexpresión y/o el incremento de la actividad (14 de 23 casos), y se ha sugerido que la sobreexpresión de CDC2 podría tener un papel causal. Asimismo, el CDC2 ha resultado formar parte de un conjunto de genes activos durante la mitosis que, si se sobreexpresan, provocan la inestabilidad cromosómica de los tumores. Los inhibidores de CDC2 y de otras Cdk han sido considerados como candidatos a fármacos para el tratamiento contra el cáncer (Shapiro, 2006).

#### 25 **Proteína de huso anormal asociada a microcefalia (ASPM)**

El gen de la proteína del huso anormal asociada a microcefalia es el ortólogo humano del gen *abnormal spindle* (*asp*) de *Drosophila* y el gen de la microcefalia primaria autosómica recesiva que aparece mutado con más frecuencia. En el ser humano, la neurogenia defectuosa causada por una mutación homocigótica del ASPM provoca microcefalia y retraso mental.

La causa más habitual de microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH) parece ser las mutaciones en el gen ASPM, que está implicado en la regulación de la neurogenia. La ASPM está localizada en los polos del huso durante la mitosis.

La inhibición de la ASPM mediante la reducción de la expresión (*knockdown*) por medio de ARNs*i* inhibe la proliferación de células tumorales y la proliferación de células madre neurales, lo cual convierte a la ASPM en una diana molecular potencial en el glioblastoma. La ASPM aparece sobreexpresada en el glioblastoma en comparación con el cerebro normal. La expresión de la ASPM podría servir como marcador de la malignidad del glioma y representa una diana terapéutica potencial. La sobreexpresión de la ASPM es un marcador molecular que predice el aumento del potencial invasivo/metastásico del carcinoma hepatocelular (CHC), un mayor riesgo de recidiva tumoral precoz (ETR) con independientemente del estado de mutación de la p53 y del estadio del tumor y, por ende, el pronóstico poco halagüeño. La ASPM también aparece regulada al alza en células inmortalizadas, células cancerosas, así como en tejidos de cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC) (Jung et al., 2009).

#### Ubiquitina hidrolasa carboxilo-terminal L5 (UCHL5)

La hidrolasa de ubiquitina carboxi-terminal L5 (UCHL5), también conocida como hidrolasa de ubiquitina C-terminal (UCH37) o INO80R, es una desubiquitinasa que está asociada con el proteosoma. Desmonta las cadenas de poliubiquitina unidas a proteínas en el extremo distal hidrolizando el enlace isopeptídico entre la Cys76 C-terminal y la Lys48 (Nishio y cols., 2009).

La UCHL5 se une a hRpn13 (también conocida como Adrm 1), un componente de la partícula reguladora 19S (PA700) del proteosoma, que activa su actividad isopeptidasa. La hRpn13 también funciona como un receptor de la ubiquitina, acoplado así el reconocimiento del sustrato con la desubiquitinización. La UCHL5 también se une a la Rpn10/S5a, otro componente de la partícula 19S localizado entre su «tapa» y su «base», pero esta interacción no puede activar a la UCHL5. La UCH37 podría evitar la proteólisis de los sustratos poco ubiquitinizados o de otros conjugados-Ub que son degradados lentamente. Alternativamente, también podría potenciar la degradación al facilitar el desprendimiento de los sustratos poliubiquitinizados de su zona inicial de unión en el complejo regulador 19S, tras lo cual serían translocados al centro proteolítico, la partícula 20S del proteosoma 26S. En el núcleo celular, la UCHL5 también está asociada con el complejo remodelador de la cromatina Ino80. Tras la unión de un proteosoma, se activa y podría contribuir a la regulación de la transcripción o a la reparación del ADN que se ha planteado como mediada por el Ino80 y el proteosoma. La función de la UCHL5 podría ser suplida al menos en parte por otras proteínas, ya que el *knockdown* mediante ARNi de la UCHL5 no tiene ningún efecto detectable en el

crecimiento celular, la estructura del proteosoma o su capacidad proteolítica, aunque acelera la degradación de las proteínas celulares.

5 Las proteasas específicas de la ubiquitina como la UCHL5 intervienen en varios procesos como el control de la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la replicación y la reparación del ADN, la transcripción, el control de calidad de las proteínas, la respuesta inmunitaria y la apoptosis. Existen como mínimo algunos indicios de que la UCHL5 contribuye a la transformación cancerosa. Así, se ha demostrado que su actividad está regulada al alza en el tejido de carcinoma cervicouterino humano respecto al tejido normal adyacente. Además, es capaz de desubiquitinar y, por tanto, de estabilizar el receptor del TGF-beta y sus mediadores posteriores, las proteínas Smad, intensificando así la vía de señalización del TGF-beta. La potenciación de la vía de señalización del TGF-beta puede actuar como un promotor tumoral en los estadios avanzados de la progresión del cáncer, aunque cumple una función doble y también puede actuar como un oncosupresor en los estadios iniciales y antes de la iniciación (Wicks et al., 2005; Wicks et al., 2006; Horton et al., 2007; Bieri and Moses, 2006).

#### c-Met

15 Véanse, por ejemplo, EP 08008292.8 y EP1507795B1. Además, se ha descubierto que la activación constitutiva de c-Met mediante fosforilación constituye un importante mecanismo de la oncogenia en el carcinoma renal de células claras humano (Nakaigawa y cols., 2006).

20 La sobreexpresión de MET, con frecuencia desatada por la hipoxia tumoral, conduce a la activación constitutiva del receptor y conlleva un pronóstico malo. El silenciamiento del gen MET endógeno, sobreexpresado en células tumorales, altera la ejecución de todo el programa de crecimiento invasivo en condiciones *in vitro*, anula el crecimiento tumoral y reduce la generación de metástasis experimentales *in vivo*. Un hecho destacable es que el silenciamiento de MET en metástasis consolidadas propicia su regresión casi completa (Corso y cols., 2008).

#### Receptor de la proteína estimuladora de los macrófagos (MST1R)

25 El receptor MST1R (o RON) pertenece a la familia Met de cinasas de tirosina asociadas a receptores de la superficie celular y se expresa principalmente en las células epiteliales y en los macrófagos. Como c-MET, RON se expresa en diversas líneas celulares cancerosas y tumores de origen epitelial y se cree que desempeña un papel en la carcinogénesis. Los estudios clínicos han demostrado que la sobreexpresión de MST1R está asociada tanto con un peor desenlace de los pacientes como con la aparición de metástasis. La expresión del MST1R es significativa en el tejido de carcinoma gástrico y en el tejido paraneoplásico correspondiente, pero en cambio es nula en la mucosa gástrica normal (Zhou y cols., 2008). El receptor MST1R puede inducir la migración, invasión, proliferación y supervivencia de la célula como respuesta a su ligando. Es más, el MST1R posee actividad oncogénica *in vitro*, en modelos animales *in vivo* y a menudo aparece desregulado en cánceres humanos (Dussault and Bellon, 2009). Los datos demuestran que la reducción de la expresión (*knockdown*) del MST1R en células de cáncer de próstata provoca una quimiotaxia significativamente menor de las células endoteliales en comparación con las células que lo expresan *in vitro*, así como un crecimiento tumoral reducido y una disminución de la densidad microvascular tras el trasplante ortotópico en la próstata *in vivo*. Se ha demostrado que el *knockdown* mediante ARN de interferencia de la cinasa MST1R en una línea celular de cáncer de colon muy oncogénica redujo la proliferación en comparación con las células control.

#### Proteína 4 de mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC4)

40 Las proteínas encargadas del mantenimiento estructural de los cromosomas (SMC) son ATPasas cromosómicas, proteínas muy conservadas desde las bacterias hasta la especie humana, que desempeñan funciones fundamentales en numerosos aspectos de la organización y la dinámica cromosómica de orden superior.

45 La proteína SMC4 es un componente central del complejo de la condensina que interviene en la condensación de la cromatina y también ha sido vinculada con la segregación de los nucléolos, la reparación del ADN y el mantenimiento del armazón de la cromatina. Los organismos eucariotas poseen como mínimo seis proteínas SMC que forman tres heterodímeros distintos con funciones especializadas: SMC2 y SMC4 actúan como el núcleo de los complejos de condensina que son esenciales para el montaje y la segregación de los cromosomas.

50 El análisis de los niveles de ARNm en 25 tejidos normales distintos mediante RT-PCR demuestra que este gen se expresa mucho en la próstata y en las glándulas salivales normales, muy poco en el colon, páncreas e intestino, y nada en otros tejidos. Los estudios con RT-PCR en muestras de cáncer humanas demostraron que el ARN se expresa mucho en numerosas líneas celulares cancerosas y muestras de tejidos cancerosos, incluidos 26 de 33 cánceres de mama, 3 de 3 cánceres de próstata, 3 de 3 cánceres de colon, y 3 de 3 cánceres de páncreas (Egland y cols., 2006).

#### AVL9

55 Resulta sorprendente que la proteína AVL9 se detectara como proteína originaria, ya que se disponen de pocos datos sobre ella y la función del gen correspondiente.

**Proteína del cinetocoro Nuf2**

El gen NUF2 (CDCA-1) codifica una proteína que es muy similar a la Nuf2 de levadura, un componente del complejo proteínico conservado y vinculado al centrómero. La Nuf2 de levadura desaparece del centrómero durante la profase meiótica cuando los centrómeros pierden su conexión con el cuerpo del polo del huso, y desempeña una función reguladora en la segregación de los cromosomas. Se ha demostrado que el *knockdown* temporal de los ARNm de la survivina y de la hNuf2 mediante ARNcsi provoca multinucleación y muerte celular por parada de la mitosis, respectivamente (Nguyen y cols., 2006). La Nuf2 y la Hec1 son necesarias para organizar los sitios de unión del extremo (+) estable de los microtúbulos en la placa externa, que son precisos para mantener las fuerzas dirigidas hacia los polos requeridas para la biorientación en los cinetocoros (DeLuca y cols., 2005).

El análisis inmunohistoquímico con una micromatriz de tejido de cáncer pulmonar confirmó altos niveles de las proteínas CDCA1 y KNTC2 en la gran mayoría de cánceres de pulmón de diversos tipos histológicos. La elevada expresión de ambas acarrió un pronóstico peor en pacientes con cáncer de pulmón amicrocítico. La inhibición de su unión por un péptido al que la célula es permeable y que es portador del péptido de 19 aminoácidos derivado de la CDCA1 (11R-CDCA1(398-416)), el cual corresponde al dominio de unión a la KNTC2, suprimió de manera efectiva el crecimiento de células de CPNM (Hayama y cols., 2006). Se ha comprobado que el *knockdown* mediante ARNsi contra la CDCA1 o la KNTC2 inhibe la proliferación celular y la inducción de la apoptosis en el CPNM, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer gástrico, cáncer colorrectal y glioma (Kaneko y cols., 2009). El gen CDCA 1 se expresa de modo diferencial en el cáncer cervicouterino (expresión del ARNm comprobada mediante PCR en tiempo real y de la proteína mediante inmunohistoquímica) (Martin y cols., 2009). La aplicación de la RT-PCR en tejidos de cáncer gástrico extirpados quirúrgicamente (tipo difuso, 6; tipo intestinal, 4) confirmó que dos variantes de la CDCA1 estaban reguladas al alza en los tejidos tumorales. En este estudio se detectaron variantes de ajuste alternativo, especialmente en la CDCA1, que podrían ser útiles como marcadores diagnósticos y/o nuevas dianas para el tratamiento antitumoral (Ohnuma y cols., 2009).

**Fosfohidrolasa lípido fosfato 2 (PPAP2C)**

La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de las fosfatasas del ácido fosfatídico (PAP). Las PAP convierten el ácido fosfatídico en diacilglicerol, e intervienen en la síntesis *de novo* de los glicerolípidos así como en la transducción de la señal activada por receptor mediada por la fosfolipasa D. Se han descrito tres variantes de ajuste alternativo que codifican diversas isoformas de la misma.

La PPAP2C es una nueva diana potencial que está regulada al alza en las células madre mesenquimáticas (MSC) adultas humanas primarias transformadas. El *knockdown* de la PPAP2C reduce la proliferación celular retrasando la entrada en la fase S del ciclo celular y está regulada transcripcionalmente por la p53. Algunos datos indican que la sobreexpresión de la PPAP2C, observada en numerosos tipos de cáncer humano, puede ser necesaria para aumentar la proliferación celular (Flanagan y cols., 2009). Un estudio demuestra que la PPAP2C es un regulador de la progresión del ciclo celular en los fibroblastos. La sobreexpresión de la PPAP2C, pero no de una variante mutante catalíticamente inactiva, causó la entrada prematura en la fase S, acompañada de la acumulación prematura de ciclina A. Estos fenómenos generan cambios sustanciales en la velocidad de entrada en la fase S que podrían repercutir en procesos como la mitogénesis, migración, cicatrización de heridas, desarrollo y carcinogénesis.

**Proteína unida a ubiquinol-citocromo c reductasa (UQCRB)**

El gen UQCRB codifica una proteína que forma parte del complejo de la ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa que contiene diez subunidades de codificación nuclear y una subunidad de codificación mitocondrial. La proteína codificada se une a la ubiquinona y participa en la transferencia de electrones cuando la ubiquinona está unida. Ciertas mutaciones de este gen se han asociado con la deficiencia en el complejo mitocondrial III. Se ha descrito un pseudogen en el cromosoma X.

El gen UQCRB podría actuar como oncogén o como gen oncosupresor en el adenocarcinoma ductal pancreático (Harada y cols., 2009). El gen UQCRB está sobreexpresado en el carcinoma hepatocelular (Jia y cols., 2007).

**Prominina 1 (Prom1)**

La prominina-1, también llamada CD133, se identificó inicialmente como una molécula específica de las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ y después ha demostrado ser un marcador de las células madre normales y de las células madre cancerosas (CSC) en diversos tejidos (Mizrak y cols., 2008). Sin embargo, poco se sabe sobre su función. Como está localizada principalmente en protrusiones de la membrana plasmática como las microvellosidades de las células epiteliales, a la prominina-1 se le ha asignado una función como 'organizadora' de la topología de la membrana plasmática. Dado que se ha comprobado que interactúa con el colesterol, podría ser importante para el mantenimiento de la composición adecuada de lípidos en la membrana plasmática.

La prominina-1 se utiliza como marcador de CSC en muchos tumores humanos. Solo un pequeño porcentaje de células tumorales suele ser positivo para la prominina-1, como cabe esperar de un marcador de CSC. Dependiendo del tipo de tumor, el número de células positivas por masa tumoral varía entre el 1% y el 15 % siendo mayoritariamente de en torno al 2 %. Los tumores con células que expresan la prominina-1 en los que se ha

demostrado que estas son CSC mediante pruebas funcionales (como la formación de esferas, elevada capacidad para iniciar el crecimiento de tumores en ratones inmunodeficientes y división asimétrica / autorrenovación / pluripotencia) son:

- 5 – cáncer de colon (2 – 2,5 % de la masa tumoral) (Todaro y cols., 2007; Ricci-Vitiani y cols., 2007)
- cáncer de hígado (Ma y cols., 2007; Suetsugu y cols., 2006; Yin y cols., 2007)
- cáncer de páncreas (Hermann 2007; Wang 2009)
- cáncer de próstata (1% de la masa tumoral) (Richardson y cols., 2004)
- tumores cerebrales de diferentes fenotipos (Singh y cols., 2003; Singh y cols., 2004)
- leucemias como la leucemia linfoblástica aguda, LLA (Cox y cols., 2009)
- 10 – melanoma (Monzani y cols., 2007; Rappa y cols., 2008)
- cáncer de pulmón (Chen and O'Shea, 2008; Eramo y cols., 2008; Tirino y cols., 2009)
- sarcoma de Ewing (Suva y cols., 2009)
- cáncer de endometrio (Rutella y cols., 2009)
- carcinoma epidermoide oral (Zhang y cols., 2009) y
- 15 – carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Harper y cols., 2007).

Es más, varios estudios han demostrado el aumento de la expresión de la prominina-1 en el tejido canceroso respecto al tejido sano, y la mayoría de ellos han confirmado una correlación entre la expresión de la prominina-1 con parámetros clínicos tales como la supervivencia total, el estadio tumoral o la presencia de metástasis. Algunos ejemplos son el cáncer de pulmón amicrocítico, melanoma maligno, retinoblastoma, neuroblastoma y carcinoma sinovial. La expresión de prominina-1 también estuvo correlacionada con un mal pronóstico en el glioma, cáncer de páncreas (hasta 15% de células PROM1+), cáncer colorrectal, rectal y de colon, y carcinoma ductal de mama. Un dato destacable es que el ARNm de PROM1 está regulado al alza en las PBMC de los pacientes con cáncer en fase metastásica, sobre todo en los pacientes con metástasis óseas, y la expresión de PROM1 en las PBMC es un factor pronóstico de la supervivencia total. No se ha hallado correlación con el pronóstico en el cáncer de ovario.

25 En el cáncer gástrico difuso, se ha sugerido la expresión de PROM1 basada en un análisis bioinformático (Katoh and Katoh, 2007) y se ha descrito la sobreexpresión proteica en el cáncer gástrico en comparación con el tejido gástrico normal (Smith y cols., 2008). Con todo, (Boegl, and Prinz, 2009) describieron que la expresión de la prominina-1 estaba reducida en el cáncer gástrico, sobre todo en los estadios avanzados, y afirmaron que su expresión se correlacionaba más con la angiogenia – que también aparece reducida en los estadios avanzados – que con el crecimiento tumoral. Un estudio realizado con líneas celulares de cáncer gástrico (Takaishi y cols., 2009) afirma que la CD44, pero no la prominina-1, es un marcador de CSC en el cáncer gástrico.

(Zhu y cols., 2009) aportaron pruebas de la implicación de las células que expresan la prominina-1 en la formación de tumores; este grupo de investigación describió que en un modelo de cáncer intestinal en ratón, todas las células neoplásicas surgieron a partir de células Prom1+, pero solo el 7% retuvo el fenotipo Prom1+. Aparte de lo anterior, se ha demostrado que las células prominina-1(+) contribuyen a la angiogenia tumoral. Como cabe esperar en las CSC, las células prominina-1(+) han demostrado ser quimiorresistentes gracias a la activación de la vía de supervivencia Akt (Ma 2008) (Bertolini y cols., 2009). Asimismo, son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL y Fas debido a la regulación al alza de FLIP. Y se protegen de la apoptosis mediante la secreción de IL-4. Pero a pesar de todo lo dicho, podrían ser accesibles al sistema inmunitario, ya que pueden ser destruidas por las células NK (Castriconi y cols., 2007; Pietra y cols., 2009) y los linfocitos T citotóxicos (Brown y cols., 2009).

### **Metaloproteinasa de matriz 11 (MMP11)**

A la metaloproteinasa de la matriz 11 (MMP11) se la ha implicado en varios procesos fisiológicos que requieren la remodelación de tejidos, tales como el desarrollo, la involución de la glándula mamaria al término de la lactancia, la curación de la herida y la formación de la cicatriz, así como en el ciclo menstrual. También se ha propuesto que podría regular negativamente la homeostasis de los lípidos reduciendo la diferenciación de los adipocitos. En contraste con otras MMP, no es capaz de degradar las moléculas típicas de la matriz extracelular, excepto el colágeno VI. No obstante, se han descubierto otros sustratos tales como la alfa 2-macroglobulina, ciertos inhibidores de proteasas de serina (serpinas) como la alfa-1-antitripsina, la proteína 1 de unión al factor de crecimiento insulinoide y el receptor de la laminina. La MMP11 fue descubierta como un gen que se sobreexpresa específicamente en las células estromales que rodean el carcinoma invasivo de mama. Estudios posteriores confirmaron su expresión en el estroma que envuelve el tumor del carcinoma de mama y otros tipos de cáncer, como el cáncer de piel, los carcinomas de pulmón micro y amicrocíticos, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, carcinoma de colon y colorrectal, cáncer epitelial de la laringe, carcinoma esofágico, carcinoma oral, carcinoma de páncreas, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinomas de ovario, carcinoma de células renales, meningioma atípico, carcinoma papilar de tiroides, tumores cerebrales (la MMP11 aparece expresada en los astrocitomas, pero poco en los oligodendrogliomas, y en los gliomas malignos), carcinoma de los conductos salivales, cáncer cervicouterino, linfomas extraganglionares de linfocitos T/células NK, linfoma no hodgkiniano y carcinoma de próstata. Se ha afirmado que la MMP11 se sobreexpresa en el estroma de la mayoría de los carcinomas invasivos humanos, pero raramente en los sarcomas y en otros tumores no epiteliales. En la mayoría de casos, aunque no en todos, la MMP11 se expresa en las células del estroma directamente adyacentes al tumor, mientras que las propias células

tumorales, los tejidos normales y las células estromales alejadas del tumor son negativas. No obstante, este rasgo no se puede generalizar puesto que en algunos casos la MMP11 se ha detectado en tejidos no cancerosos como en el de colon, así como en células tumorales, p. ej. en tumores de páncreas, mama, aracnoides y estómago. Las concentraciones elevadas de MMP11 están correlacionadas con un fenotipo maligno/invasividad elevada y un pronóstico malo. Con todo, en los carcinomas papilares de tiroides, la expresión de la MMP11 apareció inversamente relacionada con las características agresivas.

No es probable que la MMP11 tenga un papel en la angiogenia, pues su expresión no se ha correlacionado con la densidad microvascular. Más bien, parece aumentar la supervivencia de las células cancerosas y suprimir la apoptosis. Se ha propuesto que la MMP11 secretada por los fibroblastos propicia la estimulación de la vía del IGF-1R en las células de carcinoma, aumentando así su capacidad de proliferación. Su capacidad para propiciar la dediferenciación de los adipocitos avala la aparición del cáncer por la acumulación de células peritumorales similares a fibroblastos que facilitan la supervivencia de las células cancerosas y la progresión del tumor (Motrescu and Rio, 2008). La MMP11 se ha hallado tanto en el tejido tumoral como en el suero sanguíneo de pacientes con cáncer gástrico, y su expresión está correlacionada con la metástasis (Yang et al., 2008). Asimismo, (Deng et al., 2005) demostraron que la MMP11 se expresa con profusión en estirpes de células tumorales y en tumores primarios de cáncer gástrico –no solo en el estroma como sucede con otros tipos de cáncer – y aparentemente potencia la proliferación de las células tumorales.

### ABL1

El protooncogén ABL1 codifica una proteína cinasa de tirosina citoplasmática y nuclear de la familia Src que ha sido implicada en los procesos de diferenciación, división y adhesión celulares, así como en la respuesta al estrés (Yoshida, 2007). La c-Abl transita continuamente entre los compartimentos del núcleo y del citoplasma. La c-Abl nuclear participa en la inhibición del crecimiento celular y en la promoción de la apoptosis. En cambio, la función de la c-Abl citoplasmática es menos conocida. Respecto a esta última, existen indicios que apuntan a su participación en la morfogenia y en la dinámica de la actina F, y a un papel en la señalización desencadenada por estímulos extracelulares como factores de crecimiento y ligandos de integrina. Se ha descrito que la c-Abl citoplasmática promueve la mitogenia. Los sustratos mitógenos de la C-Abl no han sido descubiertos todavía, pero es probable que incluyan reguladores de GTPasas pequeñas de la familia Rho, sobre todo los miembros Vav y Sos.

La actividad de unión al ADN de la ubicua cinasa de tirosina ABL1 es regulada por la fosforilación mediada por la CDC2, lo que indica que la ABL1 desempeñaría una función en el ciclo celular. La actividad de la proteína c-Abl está regulada negativamente por su dominio SH3 y la delección de este dominio transforma el ABL1 en un oncogén. La cinasa de tirosina c-Abl no ligada a receptor regula las respuestas de la actina en células no hematopoyéticas. Algunos estudios señalan a la c-Abl como un actor clave en la cascada de señalización que conduce a la reorganización de la actina durante la activación de los linfocitos T (Huang y cols., 2008).

Las mutaciones del gen ABL1 están asociadas con la leucemia mielógena crónica (LMC). En la LMC, el gen se activa por su translocación dentro del gen BCR (*breakpoint cluster region*), situado en el cromosoma 22. Este nuevo gen de fusión, BCR-ABL, codifica una cinasa de tirosina citoplasmática no regulada que permite a las células proliferar sin estar reguladas por citocinas. Ello, a su vez, permite a la célula convertirse en una célula cancerosa (Zhao y cols., 2009). La cinasa tirosina de c-Abl activada, no como una proteína de fusión, desempeña una función importante en los tumores sólidos malignos de pulmón y mama (Lin and Arlinghaus, 2008).

Observaciones recientes indican que la c-Abl también está desregulada en los tumores sólidos. En los carcinomas de mama y en el CPNM se ha detectado una gran actividad cinasa en el citoplasma. La sobreexpresión, no obstante, no basta y la actividad cinasa constitutiva requiere la fosforilación de la proteína. En las células de cáncer de mama, la fosforilación de la c-Abl es inducida por las tirosina cinasas de la membrana plasmática, entre ellas la SFK, los miembros de la familia del EGFR y el receptor del IGF-1. No se han detectado proteínas de fusión ABL en tumores sólidos.

ABL1 y cáncer gástrico – En un estudio inmunohistoquímico de la expresión de ABL1, se examinó una amplia gama de tejidos humanos fetales y adultos normales y diversos tipos de tumores. La mayoría de los tumores manifestaron una inmunorreactividad focal o débil a la ABL. La tinción más intensa se observó en el condrosarcoma, el liposarcoma y en el adenocarcinoma gástrico difuso (anillo de sello). En los dos últimos casos, la ABL también aparece expresada en los microvasos tumorales, lo cual indica un posible papel en la angiogenia.

Estudios recientes han revelado que la infección por *Helicobacter pylori* cagA-positivo desempeña un papel esencial en el desarrollo del carcinoma gástrico. *H. pylori* bloquea la endocitosis y la degradación del EGFR con la infección prolongada de las células epiteliales gástricas. Además, esta inhibición se produce de una forma dependiente de CagA, pero la activación independiente de la fosforilación de CagA de la cinasa no ligada a receptor c-Abl, que a su vez fosforila la región diana pY1173 del EGFR (Bauer y cols., 2009). La inhibición selectiva de la actividad cinasa de la c-Abl mediante STI571 o ARNsh anula la fosforilación prolongada del gen A asociado a citotoxina (CagA) y la migración de la célula epitelial, hecho que indica el papel primordial de la c-Abl en la infección y la patogenicidad causada por *H. pylori* (Poppe y cols., 2007).

Un ejemplo de bloqueadores de cinasas es imatinib (Imatinib mesilato, Gleevec, STI571), el inhibidor de la oncoproteína Bcr/Abl, que se ha convertido en el tratamiento de primera línea para la leucemia mielógena crónica (Pytel y cols., 2009). El imatinib ha sido autorizado para el tratamiento de pacientes con tumor estromal gastrointestinal (GIST) avanzado, en el que KIT, un receptor de cinasa de tirosina, está expresado anormalmente (Croom and Perry, 2003). Otro inhibidor de cinasa utilizado recientemente como tratamiento contra el cáncer es el dasatinib (BMS-354825) que es específico de la ABL citoplasmática no ligada a receptor (Pytel y cols., 2009). El nilotinib es un TKI oral de segunda generación del bcr-abl indicado para el tratamiento en adultos de la leucemia mieloide crónica en fase crónica o aguda Ph+ resistente o intolerante a imatinib (Deremer y cols., 2008).

En el documento WO 2007/028574 se dan a conocer las secuencias SEQ ID n.º 13, SEQ ID n.º 14 y SEQ ID n.º 15, CDC42 (ciclo de división celular 42) es una proteína que participa en la regulación del ciclo celular. La proteína es una GTPasa pequeña de la subfamilia Rho que regula los sistemas de transducción de señales que controlan diversas funciones celulares como la morfología celular, la migración, la endocitosis y la progresión del ciclo celular. Se descubrió que CDC42 aparece muy sobreexpresada en el glioblastoma.

El documento WO 2004/067023 describe péptidos restringidos a MHC de clase I derivados del antígeno asociado a tumores survivina, que son capaces de unirse a moléculas HLA de clase I con una alta afinidad.

La fosfoproteína 1 secretada (SPP1), también conocida como sialoproteína ósea I (BSP-1), activación temprana de linfocitos T (ETA-1), y más frecuentemente como osteopontina (OPN), es un producto génico humano también conservado en otras especies. Se ha atribuido a la osteopontina el ser un factor importante en la remodelación ósea. En concreto, las investigaciones sugieren que desempeña una función en el anclaje de los osteoclastos a la matriz mineral de los huesos. La parte orgánica del hueso supone cerca del 20% del peso seco e incluye, además de la osteopontina, colágeno de tipo I, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína ósea y fosfatasa alcalina. El colágeno de tipo I supone el 90% de la masa proteica.

La OPN se une a varios receptores de integrina como  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  y  $\alpha 9\beta 4$ , expresados por los leucocitos. Se ha determinado con certeza que estos receptores intervienen en la adhesión, migración y supervivencia de estas células. Por lo tanto, las investigaciones más recientes se han centrado en el papel de la OPN para mediar tales respuestas.

La osteopontina se expresa en un amplio abanico de células inmunitarias, como los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas y los linfocitos T y B, con cinéticas variables. De hecho, se ha descrito que la OPN actúa como un modulador inmunitario de diversas maneras. En primer lugar, tiene propiedades quimiotácticas que promueven el reclutamiento de células a sitios inflamatorios. También actúa como una proteína de adhesión, implicada en el anclaje celular y la curación de heridas. Además, la OPN media la activación celular y la producción de citocinas, además de promover la supervivencia celular mediante la regulación de la apoptosis.

La IL-12 promueve la diferenciación de los linfocitos T activados hacia el tipo Th1, que producen citocinas como la IL-12 y el IFN $\gamma$ . La OPN inhibe la producción de la citocina de Th2 IL-10, lo que acaba potenciando la respuesta Th1. La OPN influye en la inmunidad celular y cumple funciones de citocina de Th1. Potencia la producción de las inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B así como su proliferación. Estudios del año 2008 sugieren que la OPN también induce la desgranulación de los mastocitos (Nagasaka, A., H. Matsue, H. Matsushima y cols. Febrero de 2008, Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells. Eur. J. Immunol., 38 [2]: 489–99). Los investigadores observaron que la anafilaxia mediada por la IgE estaba significativamente reducida en ratones con el gen de la OPN desactivado en comparación con ratones genéticamente intactos. La OPN también ha sido implicada en la activación de macrófagos en un estudio del cáncer en el que los investigadores descubrieron que los tumores productores de OPN eran capaces de inducir la activación de los macrófagos en comparación con los tumores deficientes en OPN.

La OPN se comporta como un importante factor antiapoptótico en muchas circunstancias. Bloquea la muerte celular inducida por la activación en los macrófagos y los linfocitos T, además de en los fibroblastos y las células endoteliales expuestas a estímulos dañinos. La OPN impide la muerte celular no programada en la colitis inflamatoria.

El hecho de que la OPN interactúe con múltiples receptores de la superficie celular expresados de forma ubicua la convierte en un participante activo de muchos procesos fisiológicos y patológicos, como la curación de heridas, el metabolismo óseo, la oncogenia, la inflamación, la isquemia y las respuestas inmunitarias. Por lo tanto, la manipulación de los niveles plasmáticos de OPN podría ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, metástasis, osteoporosis y algunas formas de estrés.

Se ha demostrado que la OPN dirige la producción de IL-17. La OPN está sobreexpresada en diversos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón, de mama, colorrectal, estómago, ovario, melanoma y mesotelioma. La OPN contribuye tanto a la glomerulonefritis como a la nefritis tubulointersticial. En las placas de ateroma de las arterias hay OPN. Por lo tanto, la manipulación de los niveles plasmáticos de OPN podría ser útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, metástasis tumorales, osteoporosis y algunas formas de estrés.

### Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (ERBB3)

El ERBB3 codifica un miembro de la familia de cinasas de tirosina de receptor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Es activado por las neuroregulinas, por otros receptores ERBB y no ERBB así como por otras cinasas, y a través de mecanismos novedosos. En pasos posteriores interacciona de forma destacada con la vía de supervivencia/mitógena de la la fosfoinositol 3-cinasa/AKT, pero también con GRB, SHC, SRC, ABL, rasGAP, SYK y el regulador de la transcripción EBP1 (Sithanandam and Anderson 413-48).

Los estudios de expresión del ERBB3 en tumores primarios y de sus contribuciones mecanicistas en células cultivadas lo han implicado, con diversos grados de certeza, en el origen o el mantenimiento de cánceres de mama, ovario, próstata, ciertas células cerebrales, retina, melanocitos, colon, páncreas, estómago, cavidad bucal y pulmón (Sithanandam and Anderson 413-48). La proteína ERBB3 se ha detectado mediante métodos inmunohistoquímicos en células epiteliales dispuestas a lo largo del tubo digestivo, incluido el epitelio escamoso de la orofaringe y el esófago, las células parietales del estómago y los enterocitos superficiales del intestino grueso y delgado. La ERBB3 ha manifestado una expresión elevada en cánceres gástricos (Poller y cols. 275-80; Sanidas y cols. 935-40). Todas las líneas celulares de cáncer gástrico expresaron ERBB3 y segregaron un producto truncado. Un estudio de carcinomas gástricos con células en sello poco diferenciadas aporta indicios sólidos del papel clave desempeñado por la ERBB3 en el cáncer gástrico (Kobayashi y cols. 1294-301). Zhang y cols. investigaron la expresión de la ERBB3 en el cáncer gástrico de dos tipos patológicos (tipo intestinal y difuso) mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). El tipo difuso de CG evidenció una tasa notablemente mayor de sobreexpresión de la ERBB3 que el tipo intestinal (26,2% frente a 5,0%,  $p < 0,01$ ). La sobreexpresión selectiva de la ERBB3 en los dos tipos histológicos de cáncer gástrico está estrechamente asociada a un pronóstico malo (Zhang y cols. 2112-18). La expresión de la ERBB3 estuvo asociada de manera significativa con parámetros implicados en la progresión tumoral, incluidos la profundidad de la invasión tumoral, afectación de los ganglios linfáticos, metástasis a distancia, estadio tumoral y enfermedad recurrente (Hayashi y cols. 7843-49). La expresión y coexpresión de EGFR, c-erbB-2 y c-erbB-3 en 21 cánceres gástricos y 20 gastritis crónicas se examinaron con métodos inmunohistoquímicos en tejidos frescos congelados teniendo en cuenta variables clínico-patológicas. En general, los pacientes con cáncer gástrico presentaron una mayor incidencia de sobreexpresión de EGFR, c-erbB-2 y d-erbB-3 que el grupo con gastritis crónica (81% y 43%; 38% y 45%; 35% y 20%, respectivamente), aunque solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en lo que concierne a la expresión del EGFR ( $p = 0,01$ ) (Slesak y cols. 2727-32).

Hasta ahora se han probado en condiciones experimentales diversas estrategias de tratamiento dirigido contra el ERBB3. El uso de aptámeros de ARN dirigidos contra el dominio extracelular del ERBB3 inhibió la heterodimerización ERBB3/ERBB2 inducida por NRG, la fosforilación de la ERBB2 y el crecimiento de células de cáncer de mama MCF7 (Chen y cols. 9226-31). La aplicación de un factor de transcripción de dedos de zinc sintético destinado a inhibir la expresión del gen ERBB3 en células de carcinoma epidermoide A431 propició la reducción de la proliferación y la migración, y la represión de la expresión de ERBB3 tuvo un efecto mayor que el cambio de la expresión de ERBB2 (Lund y cols. 9082-91). El isómero de la vitamina E  $\gamma$ -tocotrienol inhibió la proliferación de células mamarias mediante el bloqueo específico de la activación de la ERBB3 y de la estimulación subsiguiente de la vía PI3K/AKT (Samant and Sylvester 563-74). El micro-ARN 125a redujo el ARN y la proteína del ERBB3, la activación de la AKT y el crecimiento celular y la invasividad de células de carcinoma mamario SKBR3 (Scott y cols. 1479-86). La regulación a la baja de la ERBB3 mediante ARNsi en células de cáncer de mama anuló su resistencia secundaria a inhibidores de tirosincinasa y permitió la inducción de la apoptosis (Sergina y cols. 437-41). El uso de ARN inhibidores pequeños (ARNsi) contra la ERBB3 o la AKT ha ofrecido resultados prometedores como estrategia terapéutica para el tratamiento del adenocarcinoma de pulmón (Sithanandam y cols. 1847-59).

### Survivina (BIRC5)

La expresión de BIRC5 (survivina), miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), es elevada en tejidos fetales y en diversos tipos de cáncer humanos. El documento WO 2004/067023 describe péptidos restringidos a MHC de clase I derivados del antígeno asociado a tumores survivina, que son capaces de unirse a moléculas HLA de clase I con una alta afinidad. La survivina parece ser capaz de regular tanto la proliferación celular como la muerte celular apoptótica. Y sobre todo en el glioblastoma, pueden detectarse niveles muy altos de expresión de la survivina (Angileri et al., 2008). Se ha planteado que la sobreexpresión de la survivina en los gliomas cerebrales podría desempeñar un papel importante en la proliferación maligna, los mecanismos anti-apoptóticos y la angiogenia (Zhen et al., 2005; Liu et al., 2006b). Especialmente en el caso del glioblastoma, pero también en otras entidades tumorales, la expresión de survivina se ha asociado de forma significativa con el grado de malignidad (con la máxima expresión de survivina en el glioblastoma) y con tasas de supervivencia menores en comparación con los pacientes cuyos tumores son negativos para la survivina (Kajiwara et al., 2003; Saito et al., 2007; Uematsu et al., 2005; Mellai et al., 2008; Grunda et al., 2006; Xie et al., 2006; Sasaki et al., 2002; Chakravarti et al., 2002).

### Antígeno central de la hepatitis B

En el virus de la hepatitis B (HBV), son bien conocidos los péptidos inmunógenos HBc de la proteína central (Bertoletti et al., 1993; Livingston et al., 1997). En vacunas antitumorales basadas en la presente invención se puede incluir un péptido de diez aminoácidos de la HBc como control positivo a fin de verificar la inmunocompetencia de los pacientes y el éxito de las inmunizaciones.

Tabla 6: Funciones asociadas al cáncer de las proteínas originarias

La clasificación “-” < “(+)” < “+”; “?” indica que la situación se desconoce actualmente

Funciones asociadas al cáncer de las proteínas originarias/actividad del TUMAP	TUMAP de HLA de clase I													TUMAP de HLA de clase II
	ASPM-002	CDC2-001	MET-006	MST1R-001	PROM1-001	UCHL5-001	MMP 11-001	SMC4-001	PPAP2C-001	AVL9-001	UQCRCB-001	ABL1-001	NUF2-001	
Proteína oncofetal (OF)/Antígeno cáncer- testículo (CT)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	CT	OF	
Oncogenia (progresión del ciclo celular, proliferación)	+	+	+	+	+	?	+	-	+	?	-	+	+	
Invasión tumoral, migración, metástasis	+	-	+	+	+	?	+	-	-	?	+	-	-	
Vías de señalización asociadas al cáncer	Posterior al EGFR	Ciclo celular (G2/M)	Ras / MAPK, PI3K, PLC	Similar a MET	Akt	TGF-beta (potenciado)	Vía del IGF-1R	mitosis	Ciclo celular	?	-	EGFR, PI3K, STAT3, +1, Rac/JNK, Erk5, eta-catenin	División celular	Inhibición de la apoptosis
Efectos anti-apoptóticos	(+)	(+)	+	+	-	-	+	-	-	?	-	+	-	+
Angiogenia	-	-	+	(+)	(+)	-	-	-	-	?	-	+	-	-

Células cancerosas similares a células madre	-	-	-	-	+	-	-	(+)	(+)	?	-	-	-	+
Sobreexpresión en el CG	?	+	+	+	(+)	?	+	?	?	?	?	+	+	+

(continuación)

Sobreexpresión en otros tipos de cáncer	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	?	+	+	+	+
Pronóstico malo	+	+	+	+	+	?	+	-	?	?	-	+	+	+
Estadios avanzados	-	?	+	?	-	-	-	-	+	?	-	-	-	+

Como puede verse en la Tabla 6, el experto en la materia puede adaptar fácilmente la composición de la aplicación disponible a cada paciente y/o tumor específico y escoger los TUMAP en consonancia.

5 En una forma de realización preferida descrita en la presente memoria, la composición farmacéutica comprende al menos dos péptidos, uno de ellos contiene una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N.º 1 y el otro contiene además un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N.º 2.

10 En una forma de realización preferida descrita en la presente memoria, la composición farmacéutica comprende al menos dos péptidos, uno de ellos contiene una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N.º 3 y el otro contiene además un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N.º 2.

En una forma de realización preferida descrita en la presente memoria, la composición farmacéutica comprende al menos dos péptidos, uno de ellos contiene una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N.º 2 y el otro contiene además un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos conforme con la SEQ ID N.º 7 y, opcionalmente, la SEQ ID N.º 11.

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

20 Es sabido además que los péptidos presentados por el MHC de clase II están compuestos de una "secuencia central" dotada de un cierto motivo de aminoácidos específico del HLA y, opcionalmente, de extensiones N- y/o C-terminales que no interfieren con la función de la secuencia central (es decir, que se consideran irrelevantes para la interacción del péptido con el linfocito T). Las extensiones N y/o C-terminales pueden, por ejemplo, tener entre 1 y 10 aminoácidos de longitud, respectivamente. Estos péptidos se pueden utilizar directamente para cargar las moléculas MHC de clase II o bien la secuencia se puede clonar en vectores de acuerdo con la descripción ofrecida abajo en la presente memoria. Dado que estos péptidos constituyen el producto final del procesamiento de péptidos más grandes en el interior de la célula, también pueden utilizarse péptidos más largos.

25 Si un péptido tiene una longitud mayor de unos 12 residuos de aminoácidos es usado directamente para unirse a una molécula MHC de clase II. Se prefiere que los residuos que flanquean la región central de unión a HLA no afecten de forma sustancial a la capacidad del péptido para unirse específicamente a la hendidura de unión de la molécula MHC de clase II o de presentar al péptido al CTL. No obstante, como se ha indicado arriba, se apreciará que es posible usar péptidos más grandes, especialmente los codificados por un polipéptido, ya que estos péptidos  
30 más grandes pueden ser fragmentados por células presentadoras de antígeno adecuadas. Además, los aminoácidos flanqueantes también pueden reducir la velocidad de degradación del péptido in vivo de modo que la cantidad real de péptido disponible para los CTL sea superior en comparación con el péptido carente de aminoácidos flanqueantes, actuando así como un profármaco.

35 También es posible que los epítomos de MHC de clase I, aunque suelen tener entre 8 y 10 aminoácidos de longitud, sean generados por el procesamiento de péptidos más largos o proteínas que incluyen el epítomo real.

Por supuesto, el péptido según la presente invención tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC humano de clase I. La unión de un péptido o una variante a un complejo MHC puede ser analizada mediante métodos conocidos en la técnica, como por ejemplo los descritos abajo en los ejemplos ofrecidos en la presente descripción o los descritos en la bibliografía para diferentes alelos de MHC de clase II (p. ej. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, Martin R; Ligand motifs of HLA-DRB5\*0101 and DRB1\*1501 molecules delineated from self-peptides; J Immunol. 1994; 153(4):1665-1673; Malcherek G, Gnau V, Stevanovic S, Rammensee HG, Jung G, Melms A; Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands; J Immunol. 1994; 153(3):1141-1149; Manici S, Sturniolo T, Imro MA, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti MP; Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11; J Exp Med. 1999; 189(5): 871-876; Hammer J, Gallazzi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F; Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association; J Exp Med. 1995 181(5):1847-1855; Tompkins SM, Rota PA, Moore JC, Jensen PE; A europium fluoro-immunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC

glycoproteins; *J Immunol Methods*. 1993;163(2): 209-216; Boyton RJ, Lohmann T, Londei M, Kalbacher H, Halder T, Frater AJ, Douek DC, Leslie DG, Flavell RA, Altmann DM; Glutamic acid decarboxylase T lymphocyte responses associated with susceptibility or resistance to type I diabetes: analysis in disease discordant human twins, non-obese diabetic mice and HLA-DQ transgenic mice; *Int Immunol*. 1998 (12):1765-1776).

5 En una forma de realización de la presente invención, el péptido es una proteína de fusión que comprende los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "I") como la derivada del NCBI, número de acceso de GenBank X00497 (Strubin, M., Mach, B. and Long, E.O. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity *EMBO J*. 3 4 (869-872), 1984).

10 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende los péptidos de la presente invención.

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

20 Adicionalmente, todos los péptidos de la invención pueden ser sintetizados para alterar su configuración estérica. Por ejemplo, puede utilizarse el D-isómero de uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido en lugar del L-isómero habitual. Y aún más, al menos uno de los residuos de aminoácidos de los péptidos de la invención puede ser sustituido por uno de los consabidos residuos de aminoácidos no naturales. Alteraciones como éstas pueden servir para aumentar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la capacidad de unión de los péptidos de la invención.

25 De manera similar, un péptido o variante de la invención puede ser modificado químicamente mediante la reacción con aminoácidos específicos antes o después de la síntesis del péptido. Ejemplos de tales modificaciones son bien conocidos en la técnica y aparecen resumidos por ejemplo en R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005, que se incorpora en la presente memoria como referencia. La modificación química de aminoácidos incluye, sin ánimo limitativo, la modificación por acilación, amidinación, piridoxilación de lisina, alquilación reductora, trinitrobenilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenenosulfónico (TNBS), transformación de grupos carboxilo en grupos amida y oxidación del grupo sulfhidrilo con ácido per fórmico para convertir la cisteína en ácido cisteico, formación de derivados mercuriales, formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol, reacción con maleimida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamiloación con cianato a pH alcalino, aunque sin limitación a ello. A este respecto, se remite a las personas versadas en la técnica al Capítulo 15 de *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000), donde hallarán una metodología más extensa relacionada con la modificación química de proteínas.

35 La modificación de proteínas terapéuticas y péptidos con PEG se asocia a menudo con una prolongación de la semivida en circulación, mientras que la unión por entrecruzamiento de proteínas con glutaraldehído, diacrilato de polietilenglicol y formaldehído se emplea en la preparación de hidrogeles. La modificación química de alérgenos con fines de inmunoterapia se consigue a menudo mediante la carbamiloación con cianato potásico.

40 En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados p. ej. utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliamida, como muestra Lu et al. (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433 y las referencias que aparecen en el mismo.

45 La purificación puede efectuarse mediante una sola técnica o una combinación de varias como son la recristalización, la cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej. la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

50 El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

55 Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (p. ej. un polinucleótido) que codifica un péptido de la invención. El polinucleótido puede ser p. ej. ADN, ADNc, ANP, ANC o ARN, ya sea mono y/o bicatenario, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como p. ej. polinucleótidos con una estructura de fosforotioato, o combinaciones de los mismos, y puede contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, solo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión capaz de expresar un polipéptido conforme a la invención. En la técnica se conocen bien vectores de expresión para diferentes tipos de células que pueden ser seleccionados sin demasiada experimentación.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A  
5 continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. Se pueden hallar indicaciones p. ej. en Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

La cantidad óptima de cada péptido que ha de incluirse en la vacuna y la pauta posológica óptima pueden ser determinadas por una persona versada en la técnica sin demasiada experimentación. Por ejemplo, el péptido o su  
10 variante pueden ser preparados para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Las vías preferidas para la inyección del péptido son: s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Las vías preferidas para la inyección del ADN son: i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 1 y 500 mg y 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a  
15 500 µg de péptido o ADN. Dosis de este rango se han utilizado con éxito en varios ensayos (Brunsvig PF, Aamdal S, Gjertsen MK, Kvalheim G, Markowski-Grimsrud CJ, Sve I, Dyrhaug M, Trachsel S, Møller M, Eriksen JA, Gaudernack G; Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer; Cancer Immunol Immunother. 2006; 55(12):1553-1564; M. Staehler, A. Stenzl, P. Y. Dietrich, T. Eisen, A. Haferkamp, J. Beck, A. Mayer, S. Walter, H. Singh, J. Frisch, C. G. Stief; An open label study to evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Resumen N.º 3017).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede compilarse de modo que la selección, el número y/o cantidad de péptidos presentes en la composición sea/sean específicos de tejido, de cáncer y/o de paciente. Por ejemplo, la selección exacta de los péptidos puede estar guiada por los patrones de expresión de las proteínas originales en un tejido dado para evitar efectos secundarios. La selección puede depender del tipo específico de  
20 cáncer que el paciente padece así como del estado de la enfermedad, los regímenes terapéuticos previos, el estado inmunitario del paciente y, por supuesto, de su haplotipo HLA. Además, la vacuna conforme a la invención puede contener componentes individualizados, de acuerdo con las necesidades personales del paciente en cuestión. Ejemplos de esta personalización son el uso de diferentes cantidades de péptidos de acuerdo con la expresión de los AAT relacionados en el paciente, efectos secundarios indeseados causados por alergias u otros tratamientos, y ajustes de tratamientos secundarios después de una primera tanda o pauta de tratamiento.

En el caso de las composiciones a utilizar como vacuna contra el GBM por ejemplo, se evitarán los péptidos cuyas proteínas originales se expresen en grandes cantidades en los tejidos normales o bien se procurará que estén presentes en bajas cantidades en la composición de la invención. Por otra parte, si se sabe que el tumor del paciente expresa grandes cantidades de cierta proteína la composición farmacéutica para el tratamiento de ese  
30 cáncer podría contener grandes cantidades y/o contar con más de un péptido específico de esa proteína en particular o de la vía de esa proteína. La persona versada en la técnica será capaz de seleccionar las combinaciones preferidas de péptidos inmunogénicos analizando, por ejemplo, la generación de linfocitos T *in vitro* así como su eficiencia y presencia total, la proliferación, afinidad y expansión de ciertos linfocitos T frente a ciertos péptidos, y la funcionalidad de dichos linfocitos, por ejemplo analizando la producción de IFN-gamma (véanse también ejemplos abajo). Normalmente, los péptidos más eficientes se combinan después en una vacuna con los fines descritos arriba.

Una vacuna adecuada contendrá preferentemente entre 1 y 20 péptidos, más preferentemente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 péptidos diferentes, aún más preferentemente 6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13 o 14  
40 péptidos diferentes, y lo más preferible de todo 10, 11, 12, 13 o 14 péptidos diferentes.

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

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

Los vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico son bien conocidos y normalmente consisten en  
60

líquidos, con los que se formula un agente terapéutico activo. El vehículo generalmente no aporta ninguna actividad farmacológica a la formulación, pero puede proporcionar estabilidad química y/o biológica, características de liberación y similares. Ejemplos de formulaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en Alfonso R. Gennaro. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins 2000, e incluyen, sin ánimo limitativo, solución salina fisiológica, agua, agua tamponada, glicina al 0,3%, ácido hialurónico, dextrosa y similares. Recientemente se ha descubierto que ciertas emulsiones grasas que vienen siendo utilizadas desde hace muchos años para la nutrición intravenosa de pacientes también pueden actuar como vehículos para péptidos. Dos ejemplos de tales emulsiones son las emulsiones grasas comerciales conocidas con los nombres de Intralipid y Lipofundin. "Intralipid" es una marca registrada de Kabi Pharmacia, Suecia, y consiste en una emulsión grasa para nutrición intravenosa que aparece descrita en la Patente de EE.UU. N.º 3.169.094. "Lipofundin" es una marca registrada de B. Braun Melsungen, Alemania. Ambas contienen aceite de soja como grasa (100 o 200 g en 1.000 ml de agua destilada: 10% o 20%, respectivamente). Como emulsificantes, en Intralipid se utilizan fosfolípidos de la yema de huevo (12 g/l de agua destilada) y en Lipofundin la lecitina de yema de huevo (12 g/l de agua destilada). La isotonicidad se consigue añadiendo glicerol (25 g/l) tanto en Intralipid como en Lipofundin.

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

Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax<sup>®</sup>, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA<sup>®</sup>), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, Juvimmune<sup>®</sup>, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel<sup>®</sup>, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estimulación QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej. MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Aucouturier et al., 2001; Allison and Krummel, 1995). También se pueden usar citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF- $\alpha$ ), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos T<sub>H1</sub> y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta T<sub>H1</sub> provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta T<sub>H2</sub>. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen<sup>®</sup>, Hiltonol<sup>®</sup>, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimus, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y

concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, oligonucleótidos CpG y derivados, poli-(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, y formulaciones de partículas con PLG o virosomas.

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

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

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

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es la combinación de GM-CSF e imiquimod.

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas por vía parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular o intraperitoneal, o bien por vía oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, saborizantes, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed. 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press. La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas, preferiblemente del cáncer colorrectal (CCR).

Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2113253, por ejemplo.

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

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

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

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

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

Así pues, en una forma de realización preferida de la presente invención la composición farmacéutica contiene al menos una célula presentadora de antígeno que es expuesta a pulsos o cargada con el péptido, por ejemplo con el método mostrado en el ejemplo 5.

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

5 Para mayor conveniencia, un ácido nucleico de la presente invención puede estar comprendido en un polinucleótido viral o en un virus. Por ejemplo, se ha comprobado que células dendríticas transducidas con adenovirus inducen inmunidad antitumoral específica de antígeno en relación con MUC1 (véase Gong et al. (1997) Gene Ther. 4, 1023-1028). De manera similar, se pueden usar sistemas basados en adenovirus (véase, por ejemplo, Wan et al. (1997) Hum. Gene Ther. 8, 1355-1363); se pueden usar sistemas de retrovirus (Koch et al. (2006) J. Exp. Med. 186, 1213-1221 y Szabolcs et al. (1997) o también la transferencia a células dendríticas mediada por partículas sanguíneas (Tuting et al. (1997) Eur. J. Immunol. 27, 2702-2707); y también ARN (Ashley et al., 2007 J. Exp. Med. 186, 1177-1182).

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

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

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

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

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

40 La composición de la invención se puede utilizar en un método para tratar o ser utilizada como una vacuna contra el cáncer. El cáncer puede ser carcinoma de próstata, carcinomas de la cavidad bucal, carcinoma epidermoide oral (OSCC, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide aguda (LMA) (Qian y cols., 2009), linfoma MALT inducido por *H. pylori* (Banerjee y cols., 2000), carcinoma de colon/cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de pulmón amicrocítico, carcinoma cervicouterino, cáncer de mama humano, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de páncreas, adenocarcinoma ductal de páncreas, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de hígado, tumores cerebrales de diferentes fenotipos, leucemias como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), cáncer de pulmón, sarcoma de Ewing, cáncer de endometrio, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer epitelial de laringe, carcinoma esofágico, carcinoma oral, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinomas de ovario, carcinoma de células renales, meningioma atípico, carcinoma papilar de tiroides, tumores cerebrales, carcinoma de los conductos salivales, cáncer cervicouterino, linfomas extraganglionares de linfocitos T/células NK, linfoma no hodgkiniano y tumores sólidos malignos de pulmón y de mama y otros tumores.

55 En la forma de realización más preferida del método de tratamiento o vacuna conforme a la invención, la vacuna es una vacuna antitumoral mltipeptídica para el tratamiento del cáncer gástrico. Este conjunto incluye péptidos de HLA de clase I y clase II. El conjunto de péptidos también puede contener al menos un péptido, como el antígeno central del VHB (SEQ ID N.º 3), a modo de péptido de control positivo que actúe como marcador inmunitario para verificar la eficacia de la administración intradérmica. En una forma de realización particular, la vacuna consiste en 11 péptidos individuales (conforme a las secuencias SEQ ID n.º 1 a SEQ ID n.º 11) con entre 1500 µg y 75 µg aproximadamente; preferiblemente entre 1000 µg y 175 µg aproximadamente; más preferiblemente, entre 500 µg y 600 µg aproximadamente y, de mayor preferencia, unos 578 µg de cada péptido. Todos ellos pueden ser purificados por

HPLC y cromatografía de intercambio iónico y aparecer como polvo blanco o casi blanco. El liofilizado se disuelve preferentemente en hidrogenocarbonato de sodio, y se usa para la inyección intradérmica en los 30 minutos posteriores a su reconstitución a temperatura ambiente. De acuerdo con la presente invención, las cantidades preferidas de péptidos pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 y 100 mg, preferentemente entre 5 aproximadamente 0,1 y 1 mg, y aún más preferentemente entre aproximadamente 300 µg y 800 µg por 500 µl de solución. En la presente memoria, el término "aproximadamente" significa +/- 10 por ciento del valor dado, si no se indica otra cosa distinta. La persona versada en la técnica será capaz de ajustar la cantidad real de péptido que debe utilizarse en función de varios factores, como, por ejemplo, el estado inmunitario del paciente y/o la cantidad de TUMAP que presenta un tipo particular de cáncer. Los péptidos de la presente invención pueden proporcionarse en 10 otras formas adecuadas (soluciones estériles, etc.) en lugar de liofilizados.

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

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, 15 las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo –NH<sub>2</sub> neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej. ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, 20 ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en 25 forma de sales de ácido acético (acetatos), de amonio o de ácido clorhídrico (cloruros).

En otra forma de realización, una composición farmacéutica de la presente invención puede incluir azúcares, polioles, aminoácidos tales como glicina, arginina, ácido glutámico y otros en calidad de formadores de matriz. Los azúcares pueden ser mono, di o trisacáridos. Estos azúcares pueden emplearse solos o en combinación con polioles. Algunos ejemplos de azúcares son: glucosa, manosa, galactosa, fructosa o sorbosa como monosacáridos; 30 sacarosa, lactosa, maltosa o trehalosa como disacáridos; y rafinosa como trisacárido. Un poliol puede ser, por ejemplo, la manitosa. Los ingredientes preferidos son: sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, mannit y/o sorbit, y más preferentemente, manitol.

Asimismo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir excipientes que son bien tolerados fisiológicamente (véase Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th ed., editada por Raymond Rowe, Paul Sheskey y Sian Owen, Pharmaceutical Press (2006)), como por ejemplo antioxidantes como ácido ascórbico o 35 glutatión, conservantes como fenol, m-cresol, metil o propilparabeno, clorobutanol, tiomersal o cloruro de benzalconio, estabilizante, formador de matriz como sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, manitosa, mannit y/o sorbit, mannit y/o lactosa y solubilizante como polietilenglicoles (PEG), es decir PEG 3000, 3350, 4000 o 6000, o cyclodextrinas, es decir hidroxipropil-β-ciclodextrina, sulfobutiletil-β-ciclodextrina, o dextranos o poloxaómeros, esto es, poloxaómero 407, poloxaómero 188, o Tween 20, Tween 80. En una forma de realización preferente las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen uno o varios excipientes bien 40 tolerados, seleccionados del grupo consistente en antioxidantes, formadores de matriz y estabilizantes.

El intervalo de pH aceptable va de 2 a 12 para la administración intravenosa intramuscular, mientras que para la administración subcutánea se reduce entre 2,7 y 9,0 ya que la velocidad de dilución in vivo es menor, lo que ofrece 45 más posibilidades de irradiación en el punto de inyección. Strickley Robert G., Pharm. Res., 21, NO:2, 201-230 (2004).

La preparación farmacéutica de la presente invención comprende péptidos acordes con la presente invención que se administran a un paciente aquejado por una enfermedad adenomatosa o cancerosa que está asociada con el 50 respectivo péptido o antígeno. De ese modo, se puede desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T.

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

Se cree que la captación del ácido nucleico y la expresión del polipéptido codificado por parte de las células 55 presentadoras de antígeno especializadas como las células dendríticas puede ser el mecanismo de sensibilización de la respuesta inmunitaria; no obstante, aunque las células dendríticas no sean transfectadas, siguen siendo importantes porque pueden captar el péptido expresado por otras células transfectadas del tejido («sensibilización

cruzada», p. ej., Thomas AM, Santarsiero LM, Lutz ER, Armstrong TD, Chen YC, Huang LQ, Laheru DA, Goggins M, Hruban RH, Jaffee EM. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med.* 2004 Aug 2; 200(3):297-306.

5 La inmunización con polinucleótidos como tratamiento contra el cáncer aparece descrita en Conry et al. (1996) *Seminars in Oncology* 23, 135-147; Condon et al. (1996) *Nature Medicine* 2, 1122-1127; Gong et al. (1997) *Nature Medicine* 3, 558-561; Zhai et al. (1996) *J. Immunol.* 156, 700-710; Graham et al. (1996) *Int J. Cancer* 65, 664-670; y Burchell et al. (1996) 309-313 En: *Breast Cancer, Advances in biology and therapeutics*, Calvo et al. (Eds.), John Libbey Eurotext.

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

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

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

30 Los equipos descritos comprenden preferiblemente una formulación liofilizada de la presente invención en un contenedor adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej. viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el kit y/o envase contienen o van acompañados de folletos de instrucciones que indican el modo de reconstitución y/o de uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

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

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

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

50 Preferiblemente, los equipos descritos incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej. GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogenia, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente.

55 Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

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

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

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

**Breve descripción de las Figuras**

Figura 1: Análisis de los tetrámeros resultantes de la proliferación estimulada con microesferas de linfocitos CD8+ específicos de CDC2-001 y de ASPM-002 obtenidos de la sangre periférica de un donante sano.  $1 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas con CD8+ por pocillo se estimularon semanalmente con microesferas acopladas con anti-CD28 más antígeno tumoral A\*2402/CDC2-001 en alta densidad (panel izquierdo) o anti-CD28 más antígeno tumoral A\*024/ASPM-002 en alta densidad (panel derecho). Después de tres estimulaciones *in vitro*, todas las células se tiñeron con anticuerpo CD8 FITC, y con tetrámeros de A\*2402/CDC2-001 y A\*2402/ASPM-002-001 marcados por fluorescencia. Las células se seleccionan entre la población de linfocitos CD8+; las cifras de las gráficas indican el porcentaje de células halladas en los cuadrantes indicados entre los linfocitos CD8+ (células positivas para multímeros).

Figura 2: Unión relativa *in vitro* de los 15-ámeros derivados de IMA-BIR-002 y de IMA-MET-005 con los alelos HLA-DR más frecuentes. La tecnología ProlImmune REVEAL™ emplea ensayos *in vitro* de ensamblaje con HLA-DR para determinar las tasas de asociación (*on-rates*) del complejo MHC:péptido como uno de los principales determinantes de la constante de unión de cada péptido. El ensayo corrió a cargo de ProlImmune (Oxford, Reino Unido). Tras un intervalo de tiempo fijado, se mide la cantidad de complejos MHC:péptido intactos y se comparan con la cantidad en un control pasa/no pasa (ligando relativamente débil). Como control positivo se incluye un ligando de HLA-DR fuerte y promiscuo. Los valores indican el porcentaje de unión de cada péptido con las moléculas HLA-DR respecto al control de pasa/no pasa. Como la tecnología REVEAL™ está limitada a 15-ámeros, se analizaron dos 15-ámeros solapados (posiciones 2-16; 6-20) en lugar del MET-005 entero.

Las Figuras 3a y 3b muestran la presencia de linfocitos T CD4+ que segregan IFNγ específico contra PSMA y survivina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en varios intervalos de tiempo tras la vacunación del paciente, análisis realizado con EliSpot de IFNγ. Intervalos de tiempo: prevacunación (a) y al cabo de la 3ª (b), 6ª (c), 7ª (d), 8ª (e), 9ª (f), 10ª (g) y 11ª (h) dosis de vacuna.

La Figura 4 muestra la presencia de linfocitos T CD4+ que segregan IFNγ, IL-5, IL-10 y TNFα específicamente contra la survivina entre las PBMC en tres intervalos de tiempo distintos tras la vacunación del paciente, analizados con un ensayo de tinción intracelular (ICS). Intervalos de tiempo: tras la 1ª (a), 3ª (b) y 7ª (c) dosis de vacuna.

**Ejemplos**

**1. Síntesis**

Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida estándar con el contrastado método de Fmoc. Después de la purificación con RP-HPLC preparativa, se llevó a cabo un proceso de intercambio iónico para incorporar contraiones que fueran fisiológicamente compatibles (por ejemplo, acetato, amonio o cloruro). Por último, se los sometió a liofilización y se obtuvo una sustancia sólida casi blanca. Todos los TUMAP se administran preferentemente en forma de sales de acetato, aunque también es posible hacerlo en forma de otras sales.

Es importante destacar que la identidad y la pureza de cada péptido se determinaron con espectrometría de masas y RP-HPLC analítica. Tras el procedimiento de intercambio iónico se obtuvieron los péptidos en forma de liofilizados casi blancos y con las purzas indicadas en la tabla 7:

SEQ N.º	ID ID PÉPTIDO	DEL LONGITUD (N.º DE AMINOÁCIDOS)	DEL PÉPTIDO TIPO SAL	DE 1 PUREZA [ÁREA REL. %]
1	ASPM-002	9	ACETATO	92,5

SEQ N.º	ID ID PÉPTIDO	DEL LONGITUD (N.º DE AMINOÁCIDOS)	DEL PÉPTIDO	TIPO SAL	DE 1 PUREZA [ÁREA REL. %]
2	BIR-002	15		ACETATO	96,3
3	CDC2-001	10		ACETATO	94,8
4	MET-006	9		ACETATO	96,0
5	MMP11-001	10		ACETATO	96,1
6	MST1R-001	9		ACETATO	96,3
7	PPAP2C-001	9		ACETATO	94,4
8	PROM1-001	9		ACETATO	97,1
9	SMC4-001	9		ACETATO	90,7
10	UCHL5-001	9		ACETATO	95,1
11	UQCRB-001	10		ACETATO	97,3
12	(HBV-001)	10		ACETATO	99,5
20	AVL9-001	9		ACETATO	98,6
24	ERBB3-001	9		ACETATO	99,1

Todos los péptidos han sido analizados para determinar su estabilidad en distintas condiciones fisicoquímicas como diferentes temperaturas y valores de pH.

## 5 2. Componentes de la composición farmacéutica de ejemplo de IMA941

IMA941 está compuesta de un cóctel de péptidos sintéticos asociados a tumores (TUMAP) de los que la mayoría han sido identificados en células primarias de cáncer colorrectal. Los TUMAP incluyen 10 péptidos de unión a HLA de clase I con capacidad para activar linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CD8+) y un péptido de unión a HLA de clase II con capacidad para activar linfocitos T cooperadores (linfocitos T CD4+). Los linfocitos T cooperadores desempeñan un papel esencial porque facilitan la función de los linfocitos T citotóxicos liberando citocinas que potencian la acción citocida de los linfocitos T CD8+ y también podrían actuar directamente contra las células tumorales (Knutson and Disis, 2005). Además de esos 11 TUMAP, el IMA941 puede contener un péptido de control de origen vírico.

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

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

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

## 3. Presentación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) contenidos en IMA941 en muestras tumorales.

### 25 Muestras de tejido

Los tejidos tumorales de pacientes fueron facilitados por la Universidad de Medicina de la Prefectura de Kyoto (KPUM), Kyoto, Japón y la Facultad de Medicina de la Universidad de la Ciudad de Osaka (OCU), Osaka, Japón. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y permanecieron a -80°C hasta el aislamiento de los TUMAP.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

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

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

Las mezclas de péptidos HLA se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía en fase invertida (sistema Acquity UPLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas híbrido LTQ-Orbitrap (ThermoElectron) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron directamente en una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d.i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de 1,7 µm (Waters) aplicando un caudal de 400 nl por minuto. Posteriormente los péptidos se separaron con un gradiente binario de 180 minutos en dos fases con 10% al 33% de B con un caudal de 300 nl por minuto. El gradiente estaba compuesto por solvente A (ácido fórmico al 0,1% en agua) y solvente B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo). Para la introducción en la fuente nano-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap se hizo operar en el modo dependiente de datos con el método TOP5. En resumen, se inició un ciclo de barrido con un barrido completo de alta precisión de masa en el orbitrap (R = 30 000), al que siguieron barridos EM/EM también en el orbitrap (R = 7500) con los 5 iones precursores más abundantes y exclusión dinámica de los iones preseleccionados. Los espectros de masas en tándem se interpretaron con SEQUEST y control manual adicional. La secuencia peptídica identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el péptido natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de idéntica secuencia. La Fig. 1 muestra un ejemplo de espectro obtenido de tejido tumoral correspondiente al péptido asociado a MHC de clase I CDC2-001 y su perfil de elución en el sistema UPLC.

**Ejemplo 2****Perfiles de expresión de genes que codifican los péptidos dados a conocer**

25 No todos los péptidos identificados como presentes en la superficie de las células tumorales a través de las moléculas MHC son adecuados para la inmunoterapia, porque la mayoría de ellos proceden de proteínas celulares normales que se expresan en multitud de tipos de células. Muy pocos de esos péptidos están asociados a tumores y probablemente sean capaces de estimular los linfocitos T con una alta especificidad de reconocimiento contra el tumor del cual derivan. A fin de descubrirlos y de minimizar el riesgo de que la vacuna genere autoinmunidad los inventores se centraron en los péptidos derivados de proteínas que aparecen sobreexpresadas en las células tumorales en comparación con la mayoría de los tejidos normales.

30 El péptido ideal sería el derivado de una proteína que sea exclusiva del tumor y no esté presente en ningún otro tejido. Para identificar los péptidos que derivaban de los genes dotados con un perfil de expresión similar al ideal, los péptidos identificados se asignaron a las proteínas y después a los genes originarios y se generaron los perfiles de expresión de dichos genes.

**Fuentes de ARN y preparación**

Las muestras de tejido extirpado fueron facilitadas por dos centros clínicos (véase Ejemplo 1); todos los pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito. Las muestras de tejido tumoral se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la operación y se homogeneizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido. El ARN total se preparó a partir de estas muestras con TRI Reagent (Ambion, Darmstadt, Alemania) y después se purificó con RNeasy (QIAGEN, Hilden, Alemania); ambos métodos se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

45 El ARN total procedente de tejidos humanos sanos se obtuvo por vía comercial (Ambion, Huntingdon, Reino Unido; Clontech, Heidelberg, Alemania; Stratagene, Amsterdam, Países Bajos; BioChain, Hayward, CA, EE.UU.) El ARN de varios individuos (de 2 a 123 individuos) se mezcló de tal modo que el ARN de cada uno de ellos estuviera representado en la misma proporción. Cuatro voluntarios sanos donaron sangre de la que se extrajeron los leucocitos.

La calidad y la cantidad de las muestras de ARN se valoró con Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn, Alemania) y el RNA 6000 Pico LabChip Kit (Agilent).

50 **Experimentos con micromatrices**

El análisis de la expresión génica de todas las muestras de ARN de tejido tumoral y normal se efectuó con micromatrices oligonucleotídicas Affymetrix Human Genome (HG) U133A o HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Todos los pasos se llevaron a cabo siguiendo el manual de Affymetrix. En resumen, a partir de 5-8 µg de ARN total se sintetizó ADNc bicatenario con SuperScript RTII (Invitrogen) y el cebador oligo-dT-T7 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) siguiendo las indicaciones del manual. La transcripción *in vitro* se llevó a

cabo con el BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale, Nueva York, EE. UU.) en el caso de las matrices U133A y con el GeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix) en el de las matrices U133 Plus 2.0, y después se procedió a la fragmentación del ARNc, a su hibridación y tinción con estreptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (Molecular Probes, Leiden, Holanda). Las imágenes se analizaron con el Agilent 2500A GeneArray Scanner (U133A) o con el Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 (U133 Plus 2.0), y los datos se analizaron con el software GCOS (Affymetrix), aplicando los ajustes programados en todos los parámetros. Para la normalización se utilizaron 100 genes constitutivos (*housekeeping*) suministrados por Affymetrix. Los valores de expresión relativa se calcularon a partir de los ratios logarítmicos de señal dados por el software y la muestra normal de riñón se ajustó de forma arbitraria en 1,0.

10 Los perfiles de expresión de los genes originarios que aparecen altamente sobreexpresados en el cáncer gástrico se muestran en la Fig. 2. 2.

#### 4. Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I de IMA941

Para obtener información relativa a la inmunogenicidad de los TUMAP de la presente invención, llevamos a cabo análisis con una conocida plataforma de estimulación *in vitro* descrita por (Walter S., Herrgen L., Schoor O., Jung G., Wernet D., Buhning H.J., Rammensee H.G., and Stevanovic S.; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978). Con esta plataforma, se pudo demostrar la inmunogenicidad de los 10 TUMAP restringidos por HLA-A\*2402, lo cual demuestra que estos péptidos son epítomos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precursores CD8+ en el ser humano (Tabla 6).

20 Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo las estimulaciones *in vitro* con las células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos linfocitos T CD8+ de productos de leucoféresis HLA-A\*24 no congelados procedentes de donantes sanos obtenidos del Banco de Sangre de Tubinga.

25 Los linfocitos CD8+ habían sido directamente enriquecidos a partir del producto de leucoféresis o primero se aislaban las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) con un medio de separación en gradiente estándar (PAA, Cölbe, Alemania). Los linfocitos CD8+ o PBMC aislados se incubaron hasta su utilización en medio para linfocitos T (TCM) consistente en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) complementado con suero AB humano termoinactivado al 10% (PAN-Biotech, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml / estreptomina 100 µg/ml (Cambrex, Colonia, Alemania), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Oberdorla, Alemania), gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). En este paso al medio TCM también se le añadieron IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Novartis Pharma, Nuremberg, Alemania). El aislamiento de los linfocitos CD8+ se efectuó por selección positiva con microperlas MicroBeads CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Alemania).

35 La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros (Walter et al., 2003) con pequeñas modificaciones. En suma, se sintetizaron moléculas recombinantes HLA-A\*2402 cargadas con el péptido y biotiniladas desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada. El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3 (Jung et al., 1987), una IgG2a de ratón anti-CD28 humano se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas grandes de poliestireno de 5,6 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los complejos pMHC usados como controles fueron A\*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) y A\*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5), respectivamente.

40 Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800.000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng de pMHC-biotinilado relevante (microperlas de alta densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD8+ con  $2 \times 10^5$  microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3 o 4 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, los análisis de los múltímeros se llevaron a cabo tiñendo las células con el colorante vital Live/dead-Aqua® del IR cercano (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), con anticuerpo anti-CD8-FITC clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) y múltímeros pMHC fluorescentes. Para el análisis se equipó un citómetro BD LSRII SORP con los filtros y láseres adecuados. Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis multimérico se efectuó con el software FlowJo (Tree Star, Oregón, EE. UU.). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ múltímero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si al menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una línea de linfocitos T CD8+ específica después de la estimulación *in vitro* (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de múltímero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células múltímero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de IMA941

En el caso de los péptidos de HLA de clase I analizados, se puede demostrar la inmunogenicidad *in vitro* de los 14 péptidos con la generación de líneas de linfocitos T específicos de tales péptidos. En la Figura 3 se muestran a modo de ejemplo los resultados de la citometría de flujo de dos péptidos de la invención tras la tinción de multímeros específicos de TUMAP junto con la de los controles negativos correspondientes. Los resultados correspondientes a los péptidos se resumen en la Tabla 8, que proporciona la inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos de HLA de clase I. Los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* presentan el porcentaje de donantes y de pocillos que dieron positivo entre los péptidos evaluables. Como mínimo resultaron evaluables dos donantes y 24 pocillos de cada péptido.

**Tabla 8:** Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos HLA de clase I

Antígeno	Donantes positivos / donantes analizados [%]	Pocillos positivos / pocillos analizados [%]	SEQ ID N.º
CDC2-001	88	28	1
ASPM-002	63	31	2
MET-006	63	22	4
UHL5-001	75	14	3
MST1R-001	50	14	7
SMC4-001	75	9	9
PROM1-001	83	26	5
MMP11-001	33	11	10
ABL1-001	50	13	21
AVL9-001	100	50	20
NUF2-002	50	4	22
NUF2-001	100	25	19
PPAP2C-001	100	54	8
UQCRB-001	100	38	6
ERBB3-001	83	15	24

### 5. Inmunogenicidad del TUMAP de clase II BIR-002 de IMA941

Se llevó a cabo un estudio clínico para confirmar la inmunogenicidad del péptido con la SEQ ID N.º 11.

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

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

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

#### Población del estudio

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

de varias formas de administración de las estructuras antigénicas.

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

5

**Tabla 9: Características de la población del estudio**

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

#### Plan de tratamiento

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

15

Si se detectaba respuesta del tumor (remisión completa [PSA-CR] o remisión parcial [PSA-PR] o estabilización clínica [sin cambio, PSA-NC]), el paciente recibía la vacuna una vez al mes como tratamiento de mantenimiento con

la forma de administración seleccionada en cada caso. La respuesta del paciente al tratamiento de vacunación se evaluó detalladamente del modo indicado a continuación:

5 Remisión completa (PSA-CR): Normalización de la concentración de PSA inicialmente elevada, confirmada por la medición después de un intervalo mínimo de 4 semanas. La normalización se definió como un valor mínimo del PSA < 0,2 ng/ml, que cabría esperar después de la prostatectomía radical con extirpación completa del tumor o de la próstata.

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

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

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

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

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

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

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

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

- Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada con Montanide
- Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500  $\mu$ l de Montanide en combinación con la administración tópica de 225  $\mu$ l de GM-CSF con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria más potente gracias a la administración simultánea de factores de crecimiento
- Administración subcutánea de la vacuna peptídica emulsificada en 500  $\mu$ l de Montanide en combinación con

hipertermia local, esta última con el objetivo de lograr una respuesta inmunitaria más potente por el efecto térmico

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

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

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

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

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

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

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

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

### 35 Respuesta clínica

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

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

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

### 45 Respuesta bioquímica

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

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

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

**Estabilidad del PSA y aumento del TD**

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

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

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

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

**Aumento del TD del PSA sin estabilidad del mismo**

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

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

30 **Progresión del PSA**

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

**Tabla 10: Tiempo de duplicación del PSA en meses**

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

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

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

### Objetivo y resumen

El objetivo del análisis consistía en evaluar la afinidad de los péptidos de HLA de clase I a la molécula de MHC codificada por el alelo HLA-A\*0201 ya que este es un importante parámetro del mecanismo de acción de IMA941. Las afinidades hacia HLA-A\*0201 de los diez péptidos restringidos a HLA de clase I contenidos en IMA941 y de MET-001 se situaron en el intervalo medio a alto, en tanto que las constantes de disociación (KD) oscilaron en el intervalo de 0,14 (MET-001) a 2,05 nM (CSP-001). Todos los valores recaen en el intervalo definido por el 0,1 del ligando fuerte HBV-001 y el 4,4 del ligando intermedio MUC-001. Estos resultados confirman la fuerte afinidad de unión de todos los péptidos HLA de clase I del candidato a vacuna IMA941 y del MET-001 derivado de MET-005 al alelo HLA-A\*02.

### Principio de la prueba

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

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

### Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 2. Cuanto más bajo es el valor de KD mayor es la afinidad hacia el HLA-A\*0201. La mayoría de los péptidos de IMA941 presentaron afinidades similares y potentes hacia el HLA-A\*0201, con valores comprendidos entre 0,1 (HBV-001, ligando fuerte) y 44,4 nM (MUC-001, ligando intermedio). Por tanto, todos los TUMAP de clase I de IMA941 tienen una afinidad de unión media a alta por la molécula del MHC A\*02.

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

### Objetivo y resumen

Los TUMAP de clase II activan a los linfocitos T cooperadores, que desempeñan un papel esencial ayudando a los CTL activados por los TUMAP restringidos a clase I. Es importante que los péptidos de clase II de IMA941 se unan a varias moléculas HLA de clase II (unión promiscua) para asegurar que la mayoría de los pacientes tratados con el candidato a vacuna IMA941 puedan beneficiarse de la respuesta auxiliar de los linfocitos T cooperadores. El HLA-DR por ejemplo, la molécula HLA de clase II humana predominante, es muy polimórfico pues se le conocen varios cientos de alelos. Basándose en las frecuencias alélicas conocidas de los haplotipos HLA-DRB1 y algoritmos de unión contrastados, se puede predecir que los dos ligandos de HLA de clase II contenidos en IMA941 –IMA-BIR-002 e IMA-MET-005– son péptidos de unión a HLA-DR promiscuos. En concreto, la probabilidad de que un individuo de raza blanca positivo para HLA-A\*02 exprese como mínimo un alelo HLA-DR adecuado es >90% para los dos TUMAP de clase II de IMA941. Como los demás alelos humanos de clase II HLA-DQ y -DP quedaron excluidos de este cálculo debido a la carencia de datos de frecuencia o de algoritmos de predicción de la unión, seguramente promiscuidad real será superior. La promiscuidad calculada para los dos TUMAP de clase II de IMA941 recae en el mismo intervalo que la del epítipo pan-DR (PADRE, frecuencia genotípica F proyectada = 93,1%). Asimismo, la unión promiscua de estos péptidos quedó confirmada experimentalmente con ensayos de unión *in vitro*. Además se pudo demostrar la elevada inmunogenicidad *in vivo* de IMA-BIR-002 (véase arriba). En suma, estos resultados confirman que MET-005 y BIR-002 son péptidos que se unen con promiscuidad a HLA-DR.

### Principio de la predicción de la unión

Con el algoritmo SYFPEITHI desarrollado en la Universidad de Tubinga (Rammensee et al., 1997; Rammensee et al., 1999) se clasificó la unión de los TUMAP de clase II de IMA941 a varios alelos HLA-DR comunes. El algoritmo ha sido utilizado con éxito para identificar epítomos de clase I y II en una amplia gama de antígenos, por ejemplo de los antígenos asociados a tumores humanos TRP2 (clase I) (Sun et al., 2000) y SSX2 (clase II) (Neumann et al., 2004). El valor límite de unión se definió en la puntuación de 18 a partir del análisis de las puntuaciones de unión publicadas sobre ligandos de HLA-DR promiscuos.

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

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

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

**Principio del ensayo de unión *in vitro* (Prolimmune REVEAL™)**

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

**Resultados**

Según la predicción del algoritmo SYFPEITHI, IMA-BIR-002 tiene la probabilidad de unirse a 7/8 de los alelos HLA-DR con el motivo de unión conocido (Tabla 11). La probabilidad de que una persona de raza blanca positiva para HLA-A\*02 exprese al menos un alelo HLA-DRB1 adecuado para IMA-BIR-002 es del 92,6%. Por consiguiente, se predice que los dos péptidos de clase II de IMA941 son ligandos promiscuos de HLA-DR.

Aunque con este enfoque la frecuencia haplotípica de los alelos HLA-DRB1 que se unen se hubiera sobreestimado en un factor de dos, la frecuencia genotípica seguiría siendo >50% para todos los TUMAP de clase II contenidos en IMA941. Además, la confirmación experimental de la unión promiscua de IMA-BIR-002 a HLA-DR1, 3, 4 y 11 se obtuvo a partir de datos de unión *in vitro* (Figura 3).

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

En conclusión, el análisis informático de las propiedades de unión a HLA-DR de los dos péptidos de clase II contenidos en IMA941 y otros datos experimentales procedentes de ensayos *in vitro* y de un estudio clínico con BIR-002 indican con bastante claridad que estos TUMAP son ligandos promiscuos de las moléculas HLA de clase II humanas.

Tabla 11: Puntuaciones de unión de los TUMAP de clase II de IMA941 a alelos HLA-DR con motivo de unión conocido. Se muestran las puntuaciones de unión obtenidas con SYFPEITHI correspondientes a los alelos HLA-DRB1 más frecuentes en la población de raza blanca.  $p$  ofrece las frecuencias haplotípicas entre los individuos de raza blanca positivos para HLA-A\*02. Se consideró que el péptido se unía a una molécula HLA si la puntuación era igual o superior a 18. La acumulación de los valores  $p$  correspondientes a los alelos DRB1 que se unen da como resultado la frecuencia haplotípica mínima  $p_{\min}$ . La extrapolación de esas frecuencias a todos los alelos DRB1 incluidos aquellos con una matriz de predicción de la unión incompleta o datos de frecuencia incompletos da la frecuencia haplotípica proyectada  $p_{\text{proyectada}}$  que corresponde a la frecuencia genotípica  $F_{\text{proyectada}}$ . n.d. = sin datos

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

**Lista de referencias bibliográficas**

- Allison JP, Krummel MF (1995). The Yin and Yang of T cell costimulation. *Science* 270, 932-933.
- 5 Angileri FF, Aguenouz M, Conti A, La TD, Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008). Nuclear factor-kappa B activation and differential expression of survivin and Bcl-2 in human grade 2-4 astrocytomas. *Cancer* 112, 2258-2266.
- Ashley AC, Sargent DJ, Alberts SR, Grothey A, Campbell ME, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Goldberg RM (2007). Updated efficacy and toxicity analysis of irinotecan and oxaliplatin (IROX): intergroup trial N9741 in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Cancer* 110, 670-677.
- 10 Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V (2001). Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19, 2666-2672.
- Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J (2001). Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61, 6451-6458.
- 15 Banerjee SK, Weston AP, Zoubine MN, Campbell DR, Cherian R (2000). Expression of cdc2 and cyclin B1 in *Helicobacter pylori*-associated gastric MALT and MALT lymphoma: relationship to cell death, proliferation, and transformation. *Am J Pathol.* 156, 217-225.
- Bauer B, Bartfeld S, Meyer TF (2009). *H. pylori* selectively blocks EGFR endocytosis via the non-receptor kinase c-Abl and CagA. *Cell Microbiol.* 11, 156-169.
- 20 Bertoletti A, Chisari FV, Penna A, Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC, (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67, 2376-2380.
- Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo VS, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabro E, Pastorino U, Sozzi G (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD 133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 16281-16286.
- 25 Bierie B, Moses HL (2006). TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17, 29-40.
- Brown CE, Starr R, Martinez C, Aguilar B, D'Apuzzo M, Todorov I, Shih CC, Badie B, Hudecek M, Riddell SR, Jensen MC (2009). Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res* 69, 8886-8893.
- 30 Castriconi R, Dondero A, Negri F, Bellora F, Nozza P, Carnemolla B, Raso A, Moretta L, Moretta A, Bottino C (2007). Both CD133+ and C. *Eur. J Immunol.* 37, 3190-3196.
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS (2002). Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 20, 1063-1068.
- 35 Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, O'Hanlon TP (2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQA1 and -DRB1 Alleles in a Caucasian Population from Bethesda, USA. *Hum. Immunol.* 65, 1211-1223.
- Chen Z, O'Shea JJ (2008). Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 41, 71-78.
- Cisek LJ, Corden JL (1989). Phosphorylation of RNA polymerase by the murine homologue of the cell-cycle control protein cdc2. *Nature* 339, 679-684.
- 40 Corso S, Migliore C, Ghiso E, De RG, Comoglio PM, Giordano S (2008). Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* 27, 684-693.
- Cox CV, Diamanti P, Evely RS, Kearns PR, Blair A (2009). Expression of CD133 on leukemia-initiating cells in childhood ALL. *Blood* 113, 3287-3296.
- 45 DeLuca JG, Dong Y, Hergert P, Strauss J, Hickey JM, Salmon ED, McEwen BF (2005). Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol. Biol. Cell* 16, 519-531.
- Deng H, Guo RF, Li WM, Zhao M, Lu YY (2005). Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 326, 274-281.
- Deremer DL, Ustun C, Natarajan K (2008). Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for the

- treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Ther.* 30, 1956-1975.
- Egland KA, Liu XF, Squires S, Nagata S, Man YG, Bera TK, Onda M, Vincent JJ, Strausberg RL, Lee B, Pastan I (2006). High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 5929-5934.
- 5 Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di VA, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De MR (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 15, 504-514.
- Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598-604.
- 10 Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Flanagan JM, Funes JM, Henderson S, Wild L, Carey N, Boshoff C (2009). Genomics screen in transformed stem cells reveals RNASEH2A, PPAP2C, and ADARB1 as putative anticancer drug targets. *Mol. Cancer Ther.* 8, 249-260.
- 15 Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med* 2, 1096-1103.
- Grunda JM, Nabors LB, Palmer CA, Chhieng DC, Steg A, Mikkelsen T, Diasio RB, Zhang K, Allison D, Grizzle WE, Wang W, Gillespie GY, Johnson MR (2006). Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol.* 80, 261-274.
- 20 Harada T, Chelala C, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR (2009). Genome-wide analysis of pancreatic cancer using microarray-based techniques. *Pancreatology.* 9, 13-24.
- Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC (2007). Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol. Med* 36, 594-603.
- 25 Hayama S, Daigo Y, Kato T, Ishikawa N, Yamabuki T, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y (2006). Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis. *Cancer Res* 66, 10339-10348.
- Horton RA, Strachan EA, Vogel KW, Riddle SM (2007). A substrate for deubiquitinating enzymes based on timeresolved fluorescence resonance energy transfer between terbium and yellow fluorescent protein. *Anal. Biochem.* 360, 138-143.
- 30 Huang Y, Fan J, Yang J, Zhu GZ (2008). Characterization of GPR56 protein and its suppressed expression in human pancreatic cancer cells. *Mol. Cell Biochem.* 308, 133-139.
- Jia HL, Ye QH, Qin LX, Budhu A, Forgues M, Chen Y, Liu YK, Sun HC, Wang L, Lu HZ, Shen F, Tang ZY, Wang XW (2007). Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 1133-1139.
- 35 Jung G, Ledbetter JA, Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 4611-4615.
- Jung HM, Choi SJ, Kim JK (2009). Expression profiles of SV40-immortalization-associated genes upregulated in various human cancers. *J Cell Biochem.* 106, 703-713.
- 40 Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2003). Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 97, 1077-1083.
- Kaneko N, Miura K, Gu Z, Karasawa H, Ohnuma S, Sasaki H, Tsukamoto N, Yokoyama S, Yamamura A, Nagase H, Shibata C, Sasaki I, Horii A (2009). siRNA-mediated knockdown against CDCA1 and KNTC2, both frequently overexpressed in colorectal and gastric cancers, suppresses cell proliferation and induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 390, 1235-1240.
- 45 Knutson KL, Disis ML (2005). Augmenting T helper cell immunity in cancer. *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 5, 365-371.
- Koch M, Beckhove P, Op den WJ, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, Specht S, Antolovic D, Galindo L, SchmitzWinnenthal FH, Schirmacher V, Buchler MW, Weitz J (2006). Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann. Surg.* 244, 986-992.
- 50

- Krieg AM (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 471-484.
- Liu X, Chen N, Wang X, He Y, Chen X, Huang Y, Yin W, Zhou Q (2006). Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 905-913.
- Livingston BD, Crimi C, Grey H, Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, Sette A (1997). The hepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptide vaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. *J. Immunol.* 159, 1383-1392.
- Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132, 2542-2556.
- Martin CM, Astbury K, McEvoy L, O'Toole S, Sheils O, O'Leary JJ (2009). Gene expression profiling in cervical cancer: identification of novel markers for disease diagnosis and therapy. *Methods Mol. Biol.* 511, 333-359.
- Mellai M, Caldera V, Patrucco A, Annovazzi L, Schiffer D (2008). Survivin expression in glioblastomas correlates with proliferation, but not with apoptosis. *Anticancer Res.* 28, 109-118.
- Mizrak D, Brittan M, Alison M (2008). CD133: molecule of the moment. *J Pathol.* 214, 3-9. Molenkamp BG, Vuylsteke RJ, van Leeuwen PA, Meijer S, Vos W, Wijnands PG, Scheper RJ, de Grujil TD (2005).
- Matched skin and sentinel lymph node samples of melanoma patients reveal exclusive migration of mature dendritic cells. *Am. J Pathol.* 167, 1301-1307.
- Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CA (2007). Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur. J Cancer* 43, 935-946.
- Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM, Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North American population: the National Marrow Donor Program Donor Registry. *Transplantation* 64, 1017-1027.
- Nakaigawa N, Yao M, Baba M, Kato S, Kishida T, Hattori K, Nagashima Y, Kubota Y (2006). Inactivation of von Hippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clear cell renal carcinoma. *Cancer Res.* 66, 3699-3705.
- Neumann F, Wagner C, Kubuschok B, Stevanovic S, Rammensee HG, Pfreundschuh M (2004). Identification of an antigenic peptide derived from the cancer-testis antigen NY-ESO-1 binding to a broad range of HLA-DR subtypes. *Cancer Immunol. Immunother.* 53, 589-599.
- Nguyen QN, Chavli RV, Marques JT, Conrad PG, Jr., Wang D, He W, Belisle BE, Zhang A, Pastor LM, Witney FR, Morris M, Heitz F, Divita G, Williams BR, McMaster GK (2006). Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 394-403.
- Nishio K, Kim SW, Kawai K, Mizushima T, Yamane T, Hamazaki J, Murata S, Tanaka K, Morimoto Y (2009). Crystal structure of the de-ubiquitinating enzyme UCH37 (human UCH-L5) catalytic domain. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 390, 855-860.
- Ohnuma S, Miura K, Horii A, Fujibuchi W, Kaneko N, Gotoh O, Nagasaki H, Mizoi T, Tsukamoto N, Kobayashi T, Kinouchi M, Okabe M, Sasaki H, Shiiba K, Miyagawa K, Sasaki I (2009). Cancer-associated splicing variants of the CDCA1 and MSMB genes expressed in cancer cell lines and surgically resected gastric cancer tissues. *Surgery* 145, 57-68.
- Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, Kyo T, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, Yoshihara S, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S, Sasaki A, Udaka K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H (2004). Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13885-13890.
- Pietra G, Manzini C, Vitale M, Balsamo M, Ognio E, Boitano M, Queirolo P, Moretta L, Mingari MC (2009). Natural killer cells kill human melanoma cells with characteristics of cancer stem cells. *Int Immunol.* 21, 793-801.
- Poppe M, Feller SM, Romer G, Wessler S (2007). Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene* 26, 3462-3472.
- Pytel D, Sliwinski T, Poplawski T, Ferriola D, Majsterek I (2009). Tyrosine kinase blockers: new hope for successful cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 9, 66-76.
- Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, Reshmi SC, Young DJ, Stoddart A, Larson RA, Le Beau MM (2009). Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem. Biol. Interact.* Rammensee HG,

- Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S. (1997). MHC Ligands and Peptide Motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany).
- 5 Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 213-244.
- Rappa G, Fodstad O, Lorico A (2008). The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells* 26, 3008-3017.
- 10 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Signore M, Biffoni M, Pallini R, Parati E, Peschle C, De Maria R (2007). Human neural progenitor cells display limited cytotoxicity and increased oligodendrogenesis during inflammation. *Cell Death. Differ.* 14, 876-878.
- Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 117, 3539-3545.
- 15 Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, Eramo A, Napoletano C, Gallo D, Perillo A, Nuti M, Pierelli L, Testa U, Scambia G, Ferrandina G (2009). Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res* 15, 4299-4311.
- Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y, Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K (2007). Survivin subcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression in both nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. *J Neurooncol.* 82, 193-198.
- 20 Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA (2002). Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol.* 104, 105-109.
- Seeger FH, Schirle M, Gatfield J, Arnold D, Keilholz W, Nickolaus P, Rammensee HG, Stevanovic S (1999). The HLA-A\*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* 49, 571-576.
- 25 Shapiro GI (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 24, 1770-1783.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821-5828.
- 30 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, Zabinski RF, Sutherland MK, Gerber HP, Van Orden KL, Moore PA, Ruben SM, Carter PJ (2008). CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibodydrug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br. J Cancer* 99, 100-109.
- 35 Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107, 715-726.
- Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H (2006). Characterization of CD 133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 820-824.
- 40 Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C, Paschen A, Rammensee HG, Schadendorf D (2000). Identification of a new HLA-A(\*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen. *Int. J. Cancer* 87, 399-404.
- Suva ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, Suva D, Clement V, Provero P, Cironi L, Osterheld MC, Guillou L, Stamenkovic I (2009). Identification of Cancer Stem Cells in Ewing's Sarcoma. *Cancer Res.* Sylvester RK (2002). Clinical applications of colony-stimulating factors: a historical perspective. *Am J Health Syst. Pharm.* 59, S6-12.
- 45 Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27, 1006-1020.
- Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La RA, Viglietto G, Rocco G, Pirozzi G (2009). The role of CD 133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur. J Cardiothorac. Surg* 36, 446-453.
- 50 Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G,

- Medema JP, Stassi G (2007). Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin- 4. *Cell Stem Cell* 1, 389-402.
- 5 Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, Nishimaki K, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S (2005). Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J Neurooncol.* 72, 231-238.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhning HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J. Immunol.* 171, 4974-4978.
- 10 Wicks SJ, Grocott T, Haros K, Maillard M, ten DP, Chantry A (2006). Reversible ubiquitination regulates the Smad/TGF-beta signalling pathway. *Biochem. Soc Trans.* 34, 761-763.
- Wicks SJ, Haros K, Maillard M, Song L, Cohen RE, Dijke PT, Chantry A (2005). The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling. *Oncogene* 24, 8080-8084.
- Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006). Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin in primary and secondary human glioblastoma. *Br. J Cancer* 94, 108-114.
- 15 Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature.* Yasui W, Ayhan A, Kitadai Y, Nishimura K, Yokozaki H, Ito H, Tahara E (1993). Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int J Cancer* 53, 36-41.
- 20 Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J (2007). CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int. J Cancer* 120, 1444-1450.
- Zhang X, Kedl RM, Xiang J (2009). CD40 ligation converts TGF-beta-secreting tolerogenic CD4-8- dendritic cells into IL-12-secreting immunogenic ones. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 379, 954-958.
- 25 Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, Munchhof M, Vanarsdale T, Beachy PA, Reya T (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature.*
- Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL (2005). Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* 104, 2775-2783.
- 30 Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453, 236-240.
- Zhu KJ, Cen JP, Lou JX, Wang Q, Zhang X, Xu Y, Chen XZ, Cheng H (2009). Imiquimod inhibits the differentiation but enhances the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* 9, 412-417.

35 **Listado de secuencias**

<110> immatics biotechnologies GmbH

<120> Composición de péptidos asociados a tumores y vacuna contra el cáncer relacionada con ellos para el tratamiento del cáncer gástrico y de otros tipos de cáncer

<130> I31891PCT

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe  
1 5 10

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Tyr Asn Pro Leu Trp Leu Arg Ile  
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Tyr Leu Pro Phe Ile Met Glu Leu  
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu Phe  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu

ES 2 593 409 T3

1

5

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Tyr Asn Ala Ala Gly Phe Asn Lys Leu  
1 5 10

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Tyr Leu Leu Tyr Val Ser Asn Phe  
1 5

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Tyr Leu Val Tyr Thr Asp Arg Leu  
1 5

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9

His Tyr Lys Pro Thr Pro Leu Tyr Phe  
1 | 5

<210> 10  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10

Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Thr Phe  
1 5 10

<210> 11  
<211> 15  
<212> PRT

ES 2 593 409 T3

<213> Homo sapiens

<400> 11

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Asp Pro Ser Thr Ile Glu Lys Leu Ala Lys Asn Lys Gln Lys Pro  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asn Lys Gln Lys Pro Ile Thr Pro Glu Thr Ala Glu Lys Leu Ala Arg  
1 5 10 15

Asp

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asn Gly Ala Tyr Lys Ala Ile Pro Val Ala Gln Asp Leu Asn Ala Pro  
1 5 10 15

Ser

<210> 15 |

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asp  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 9

ES 2 593 409 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 16

Phe Thr Glu Leu Thr Leu Gly Glu Phe  
1 5

<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 17

Leu Met Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu  
1 5

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 18

Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Tyr  
1 5

<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 19

Val Tyr Gly Ile Arg Leu Glu His Phe  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 20

Phe Tyr Ile Ser Pro Val Asn Lys Leu  
1 5

<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 21

Thr Tyr Gly Asn Leu Leu Asp Tyr Leu  
1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 22

Arg Phe Leu Ser Gly Ile Ile Asn Phe

1

5

<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 23

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
1 5 10

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 24

Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido asociado a tumor, consistente en la secuencia de aminoácidos conforme a SEQ ID N.º 2 (SYNPLWLR1).
2. Proteína de fusión que comprende un péptido acorde con la reivindicación 1, y los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II);
- 5 3. Ácido nucleico que codifica un péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
4. Vector de expresión capaz de expresar el ácido nucleico conforme a la reivindicación 3.
5. Composición farmacéutica, que comprende el péptido conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 6. La composición farmacéutica conforme con la reivindicación 5, que además comprende al menos un adyuvante adecuado.
7. La composición farmacéutica conforme con la reivindicación 6, en que el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el GM-CSF, o imiquimod o resiquimod.
8. La composición farmacéutica conforme con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que además contiene al menos una célula presentadora de antígeno, como por ejemplo, una célula dendrítica.
- 15 9. El péptido asociado a tumor conforme con la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de enfermedades.
10. La composición farmacéutica conforme con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en que dicha composición farmacéutica es una vacuna contra el cáncer y en que dicha vacuna está destinada a la administración por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intratumoral, oral, dérmica, nasal, yugal, rectal, vaginal o tópica, o para inhalación.
- 20 11. Una vacuna contra el cáncer, que comprende el péptido conforme con la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente.
- 25 12. La vacuna contra el cáncer para el uso conforme con la reivindicación 11, en que dicho cáncer es seleccionado entre el carcinoma prostático, carcinoma de la cavidad bucal, carcinoma escamoso oral (OSCC), leucemia mieloide aguda (LMA), linfoma MALT inducido por *H. pylori*, carcinoma de colon/cáncer colorrectal, glioblastoma, cáncer de pulmón amicrocítico (NSCLC), carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama humano, cáncer de próstata, cáncer de colon, cánceres de páncreas, adenocarcinoma ductal pancreático, cáncer de ovario, carcinoma hepatocelular, cáncer de hígado, tumores cerebrales de diverso fenotipo, leucemias como la leucemia linfoblástica aguda (LLA), cáncer de pulmón, sarcoma de Ewing, cáncer de endometrio, carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, cáncer epitelial de la laringe, carcinoma esofágico, carcinoma oral, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinomas ováricos, carcinoma de células renales, meningioma atípico, carcinoma papilar de tiroides, tumores cerebrales, carcinoma de los conductos salivales, linfomas de linfocitos T/NK extraganglionares, linfoma no hodgkiniano y tumores sólidos malignos del pulmón y de la mama.
- 30 13. La vacuna contra el cáncer para el uso conforme con la reivindicación 11 o 12, en que dicho cáncer es un cáncer gástrico.

35

Figura 1: Inmunogenicidad *in vitro* de ejemplo de los TUMAP de clase I de IMA941

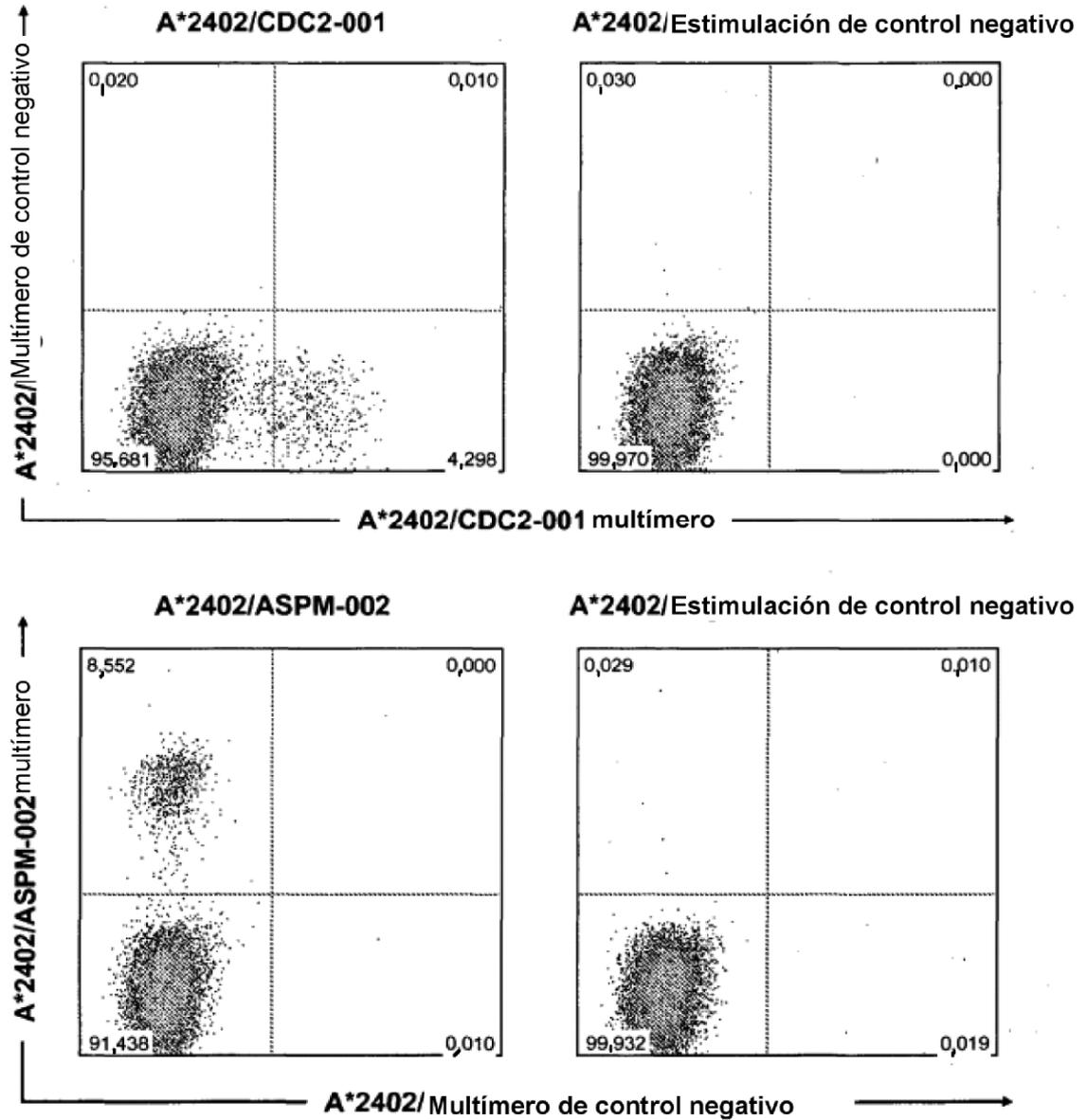


Figura 2: Unión *in vitro* de los péptidos de clase II de IMA941 a alelos HLA-DR

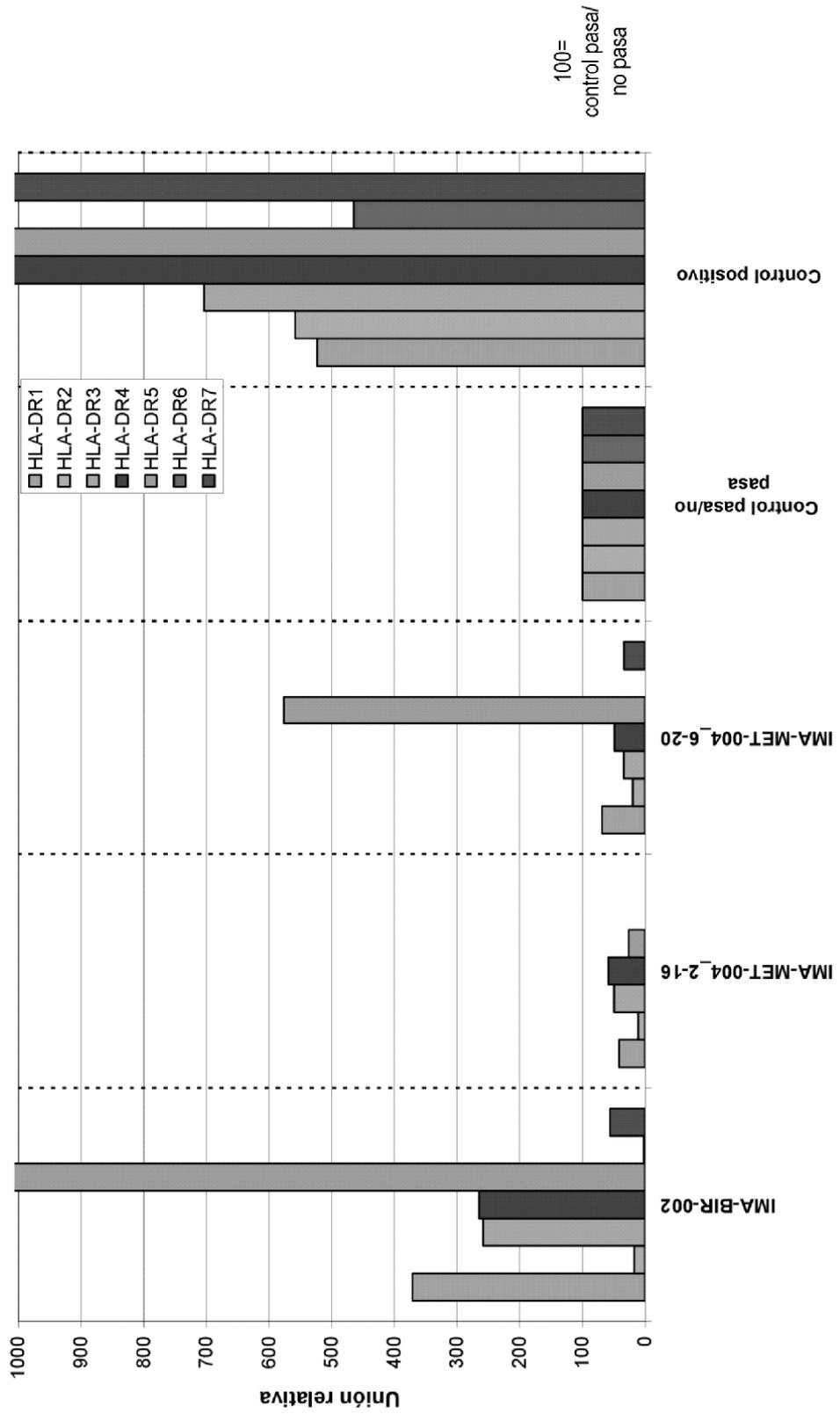


Figura 3a: ELISpot para interferón gamma

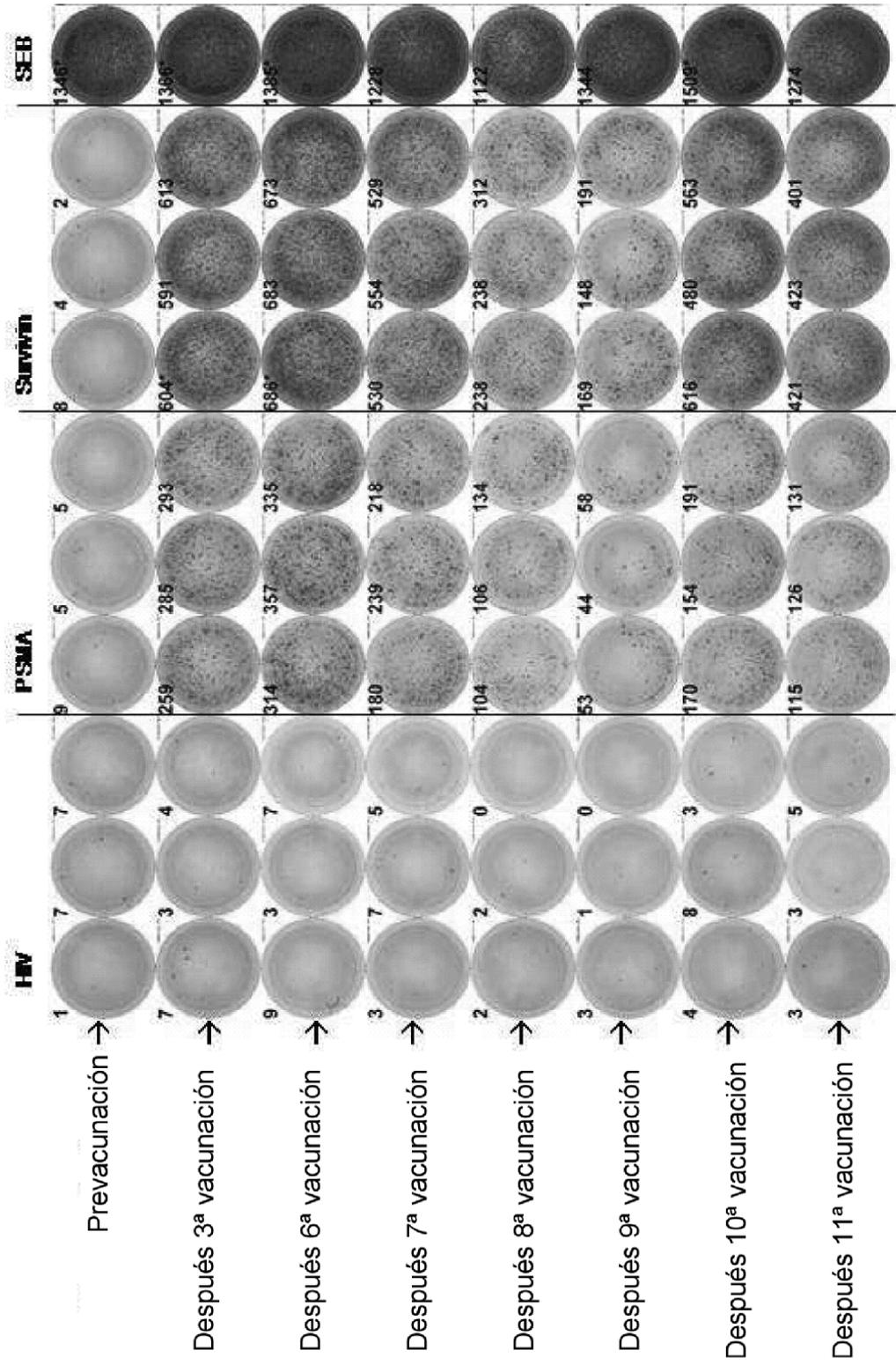


Figura 3b: ELISpot para interferón gamma

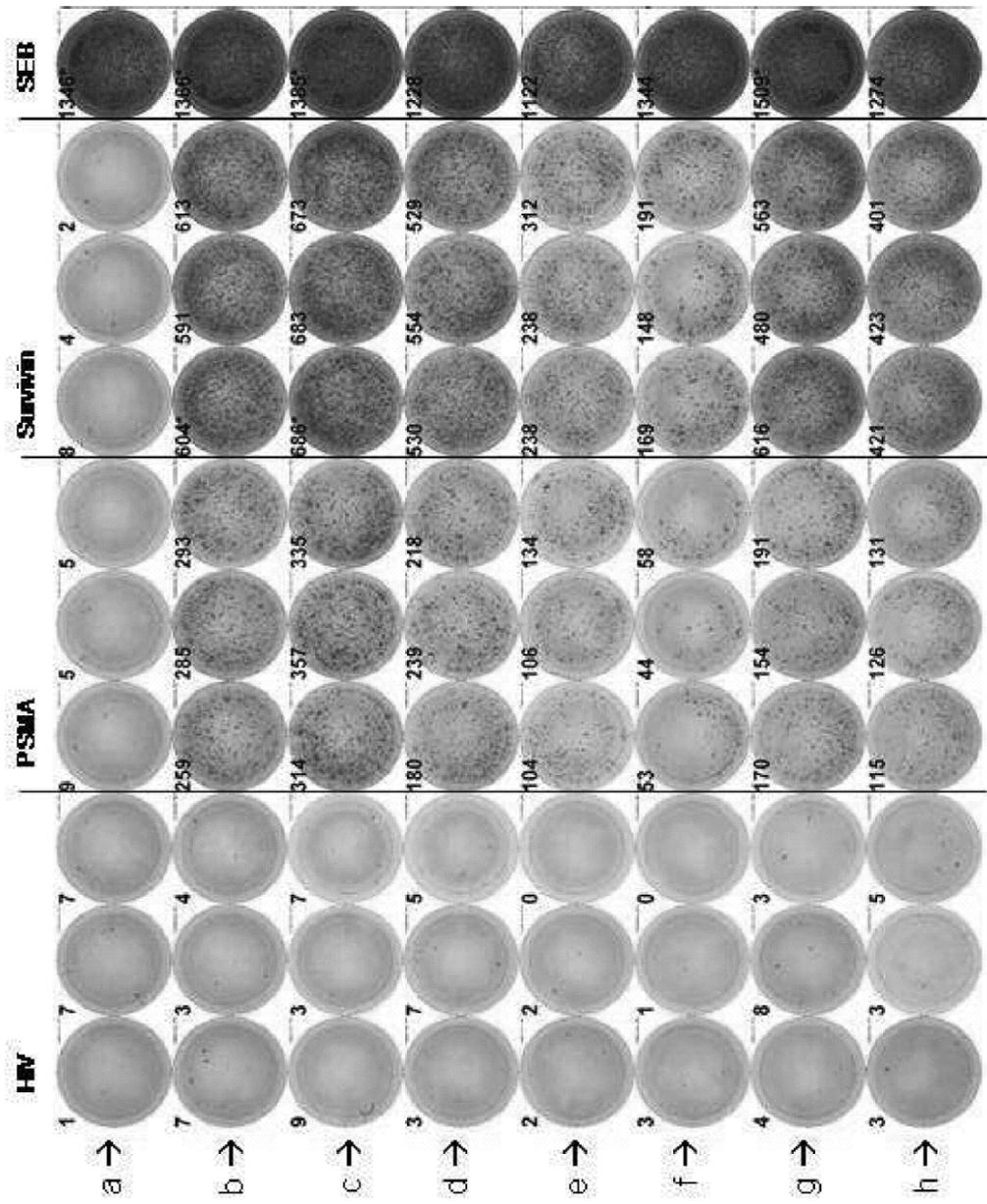


Figura 4

