

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 583**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 12187307 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2567707**

54 Título: **Composición de péptidos asociados a tumor y vacuna antitumoral relacionada**

30 Prioridad:

27.07.2007 EP 07014796
31.07.2007 US 953109 P
19.10.2007 US 981241 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 608 583 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 tumor y vacuna antitumoral relacionada

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 cooperadores, 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 los péptidos de la presente invención puede ser utilizada en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales contra el cáncer colorrectal.

Antecedentes de la invención

10 *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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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).

50 En estos momentos, alrededor de 16 ensayos están evaluando la seguridad y las posibilidades de nuevos abordajes inmunoterapéuticos destinados al tratamiento del cáncer colorrectal.

Abordajes inmunoterapéuticos para el tratamiento

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a

tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar los mecanismos de defensa humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

5 Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de los linfocitos T citotóxicos (CTL) entre poblaciones de células infiltradas en los tumores o a partir de la sangre periférica apunta a que dichos leucocitos desempeñan un papel importante en la defensa inmunitaria natural contra el cáncer (Cheever et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 1993 690:101-112; Zeh HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC; *J Immunol.* 1999, 162(2):989-94); High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy.). En concreto, en dicha respuesta
10 desempeñan un papel importante los linfocitos T CD8-positivos (T CD8⁺), 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, presentes en la mayoría de las células nucleadas y que presentan péptidos procedentes de la proteólisis de proteínas endógenas, DRIP y péptidos más grandes. Las moléculas de MHC de clase II, presentes mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan péptidos de proteínas exógenas que son captadas por las APC durante el curso de
20 la endocitosis y después son procesadas por las mismas. Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado.

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

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores sin el concurso de las células efectoras CTL (los linfocitos T CD8-positivos) a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN-γ) (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 a 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 las 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, www.syfpeithi.de).

Puesto que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II solo se da normalmente en las células del sistema inmunitario (Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.* 14:301-331), se creía imposible aislar péptidos de clase II directamente de los tumores primarios. 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) especializadas, 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 las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores de linfocito 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 oncosupresor), ras, c-met, myc, pRB, VHL y HER-2/neu, pueden acumular mutaciones que ocasionan una regulación al alza de la expresión de estos productos génicos, lo que los convierte en oncogénicos (McCartey et al. Cancer Research, 1998, 15:58 2601-5; Disis et al. Ciba Found. Symp. 1994, 187:198-211). Estas proteínas mutantes también pueden ser la diana de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor en múltiples tipos de cáncer.

La inmunoterapia en pacientes con cáncer tiene por objeto activar específicamente células del sistema inmunitario, sobre todo los llamados linfocitos T citotóxicos (CTL, también llamados «células asesinas» o linfocitos T CD8-positivos), contra las células tumorales pero no contra el tejido sano. Las células tumorales difieren de las células sanas por la expresión de proteínas asociadas a tumor. Las moléculas HLA situadas en la superficie de la célula presentan partes del contenido celular al exterior, lo cual permite a los linfocitos T citotóxicos distinguir una célula sana de una tumoral. Esto se lleva a cabo descomponiendo todas las proteínas del interior de la célula en péptidos cortos que a continuación se ligan a moléculas HLA y se presentan en la superficie celular (Rammensee HG, Falk K, and Rotzschke, O; Peptides naturally presented by MHC class I molecules, Annu. Rev. Immunol., 1993, 11, 213-244). 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 prerequisites. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, deben serlo en cantidades comparativamente pequeñas. Y no sólo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una célula tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación. En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerequisite 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 cooperadores del tipo Th1 apoyan las funciones efectoras de los CTL CD8+, que incluyen funciones

citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T colaboradores, 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.

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

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

15 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
20 trataba pacientes con melanoma avanzado. Con muy pocas excepciones, los pacientes que presentaron como mínimo tres respuestas distintas de linfocitos T, manifestaron respuestas clínicas objetivas o estabilización de la enfermedad (Banchereau, J, Palucka, AK, Dhodapkar, M, Burkeholder, S, Taquet, N, Rolland, A, Taquet, S, Coquery, S, Wittkowski, KM, Bhardwaj, N, Pineiro, L, Steinman, R, and Fay, J; Immune and clinical responses in
25 patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine, Cancer Res., 2001, 61, 6451-6458) 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 dichos linfocitos se les diagnosticó progresión de la enfermedad.

30 Efectos semejantes se han observado en un estudio de los solicitantes en que pacientes aquejados por un carcinoma de células renales 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
35 evaluate the safety and immunogenicity of the peptide based cancer vaccine IMA901, Reunión de ASCO 2007; Póster n.º 3017).

WO 2004/099247 da a conocer péptidos de 15 aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 613-627, 617-631, 621-635 y 625-639 del CEA. Estos péptidos solapados han demostrado ser epítomos del CEA que desatan una respuesta por parte de los CD4.

40 La tarea más importante en el desarrollo de una vacuna antitumoral no sólo estriba en identificar y caracterizar nuevos antígenos asociados a tumores y los epítomos inmunogénicos para los linfocitos T cooperadores derivados de los mismos, sino también en combinar diferentes epítomos para aumentar las probabilidades de obtener una respuesta contra más de un epítomo en cada paciente. Uno de los objetos de la presente invención consiste en ofrecer una secuencia de aminoácidos de tales péptidos que tenga la capacidad de unirse a una molécula del
45 complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II (HLA de clase II). Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar una vacuna antitumoral eficaz que esté basada en dicho péptido.

En la presente invención, los inventores aislaron y caracterizaron péptidos que se unen a moléculas HLA de clase II directamente a partir de tumores de mamíferos, esto es, de carcinomas colorrectales.

50 De acuerdo con la presente invención, el objeto se resuelve proporcionando un péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID N.º 8 (SPQYSWRINGIPQQHT). El péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II. El péptido también puede tener enlaces no peptídicos.

55 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 II. Así pues, este péptido concreto así como otros péptidos que contengan la secuencia (péptidos derivados) desencadenan una respuesta de linfocitos T específicos, aunque la magnitud de esa respuesta puede variar según el péptido de que se trate y según el paciente. Las diferencias, entre otras razones, podrían deberse a mutaciones en los péptidos. La persona versada en la materia conoce bien los métodos aplicables para determinar la magnitud de la respuesta que desata un péptido concreto, en particular si consulta los ejemplos expuestos en la presente memoria y en la bibliografía

correspondiente.

Los vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico son bien conocidos y normalmente consisten en líquidos, con los que se formula un agente terapéutico activo. El vehículo generalmente no aporta ninguna actividad farmacológica a la formulación, pero puede proporcionar estabilidad química 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 ó 200 g en 1000 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.

Los péptidos 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 1 expone los péptidos y la función de la proteína de la cual derivan.

Tabla 1: Péptidos dados a conocer y función de la proteína originaria

SEQ ID N.º	ID péptido del	Secuencia	Símbolo del gen:	Función	Se une a MHC
1	C20-001	ALSNLEVTL	C20orf42	Implicado en el anclaje del citoesqueleto de actina a la matriz extracelular	HLA-A*02
2	NOX-001	ILAPVILYI	NOX1	NADPH oxidasa	HLA-A*02
3	ODC-001	ILDQKINEV	ODC1	Ornitina descarboxilasa	HLA-A*02
4	PCN-001	KLMDLDVEQL	PCNA	Proteína auxiliar de la ADN-polimerasa delta	HLA-A*02
5	TGFBI-001	ALFVRL LALA	TGFBI	Factor de crecimiento transformante, beta-inducido	HLA-A*02
6	TOP-001	KIFDEILVNA	TOP2a/TOP2b	Topoisomerasa	HLA-A*02
7	TGFBI-004	TPPIDAHTRNLLRNH	TGFBI	Factor de crecimiento transformante, beta-inducido	HLA-DR

Marco de lectura abierto 42 del cromosoma 20

La C20orf42 es una proteína de adhesión focal que interviene en la fijación del citoesqueleto de actina a la membrana plasmática y en procesos celulares mediados por las integrinas. La deficiencia de C20orf42 como resultado de mutaciones que comportan la pérdida de función causa el síndrome de Kindler, una genodermatosis autosómica recesiva caracterizada por la aparición de ampollas cutáneas, atrofia progresiva de la piel, fotosensibilidad y, ocasionalmente, oncogenia (Herz, C, Aumailley, M, Schulte, C, Schlotzer-Schrehardt, U, Bruckner-Tuderman, L, and Has, C; Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes, J Biol Chem., 2006, 281, 36082-36090). En fecha reciente se ha descrito una afectación grave del tracto gastrointestinal con colitis hemorrágica en un paciente portador de una mutación que ocasiona la pérdida de función (Sadler, E, Klausegger, A, Muss, W, Deinsberger, U, Pohla-Gubo, G, Laimer, M, Lanschuetzer, C,

Bauer, JW, and Hintner, H; Novel KIND1 gene mutation in Kindler syndrome with severe gastrointestinal tract involvement, *Arch. Dermatol.*, 2006, 142, 1619-1624).

En el contexto del cáncer, el C20orf42 ha sido descrito en estudios que investigaban la expresión génica en entornos relevantes para el cáncer. Se ha hallado sobreexpresado en el 70% de los carcinomas de colon y en el 60% de los carcinomas de pulmón analizados (n = 10). La expresión en los tejidos normales, estudiada con electrotransferencia Northern, se limitó a tejidos neuromusculares (Weinstein, EJ, Boumer, M, Head, R, Zakeri, H, Bauer, C, and Mazzarella, R; URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, 1637, 207-216). Asimismo, el C20orf42 ha sido identificado como un gen implicado en la migración celular y la invasión tumoral mediadas por el TGF-beta (Kloeker, S, Major, MB, Calderwood, DA, Ginsberg, MH, Jones, DA, and Beckerle, MC; The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion, *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 6824-6833).

Homólogo 1 de la NADPH oxidasa (NOX1)

La NOX1 es una enzima que responde a factores de crecimiento y que cataliza la formación de las especies reactivas del oxígeno superóxido (O₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Su expresión se detectó inicialmente en el colon, la próstata y el útero, así como en los miocitos lisos vasculares en proliferación (Suh, Y. A. et al. 1999; Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999, 401, 79-82). Su expresión está vinculada a cierto número de respuestas biológicas como la proliferación celular, la angiogenia y la activación de vías de señalización celular (Harper, R. W., Xu, C, Soucek, K., Setiadi, H. & Eiserich, J. P. A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 435, 323-330).

La NOX1 presenta una elevada expresión en el colon pero su función en la fisiología y la patología del colon se conoce muy poco. En los tejidos normales, la expresión de NOX1 parece ser baja en el íleon, intermedia en el colon derecho y elevada en el colon izquierdo. No hubo diferencias estadísticas en la expresión de NOX1 entre muestras procedentes de adenomas y adenocarcinomas de colon diferenciados o poco diferenciados. NOX1 se expresa mucho en las células epiteliales del colon, tanto en las del interior de las criptas como en las de la superficie luminal. En conclusión, NOX1 es una enzima que se expresa constitutivamente en el epitelio del colon y no está directamente relacionada con la oncogénesis (Szanto, I. et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol.* 2005, 207, 164-176).

El análisis inmunohistoquímico ha demostrado que la NOX1 se expresa de forma constitutiva en las células mucosas superficiales. Los adenomas y los adenocarcinomas bien diferenciados presentan la expresión de NOX1 regulada al alza. El factor nuclear (NF)-kappaB se activó predominantemente en células de adenoma y adenocarcinoma que expresan NOX1 en abundancia, lo cual indica que la NOX1 podría estimular las vías antiapoptóticas que dependen del NF-kappaB en los tumores de colon (Fukuyama, M. et al. Overexpression of a novel superoxide-producing enzyme, NADPH oxidase 1, in adenoma and well differentiated adenocarcinoma of the human colon. *Cancer Lett.* 2005, 221, 97-104).

Se ha descrito que la señalización de Wnt3a/beta-catenina induce la expresión de NOX1 (Petropoulos, H. & Skerjanc, I. S. Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem.* 2002, 277, 15393-15399).

Recientemente se ha planteado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducen la apoptosis endotelial, fenómeno que a su vez induce la expresión de varias moléculas de adhesión para las células tumorales. Esto significaría que alterando la producción de ROS tal vez se podría impedir la recidiva del tumor en sitios distantes (Ten, KM, van der Wal, JB, Sluiter, W, Hofland, LJ, Jeekel, J, Sonneveld, P, and van Eijck, CH; The role of superoxide anions in the development of distant tumor recurrence, 2006, *Br J Cancer*).

Ornitina descarboxilasa 1 (ODC1)

La ODC es la enzima limitante en la vía biosintética de las poliaminas que cataliza la transformación de la ornitina en putrescina. El nivel de actividad de la enzima varía en respuesta a los estímulos promotores del crecimiento y exhibe un alto ritmo de recambio en comparación con otras proteínas de los mamíferos.

El metabolismo de las poliaminas es un componente integral del mecanismo de la carcinogenia en los tejidos epiteliales. Los incrementos de la ODC1 suelen estar vinculados con el inicio del crecimiento de las células normales y con el crecimiento sostenido de las células neoplásicas. Los inhibidores de la ODC1 suprimen la formación de tumores en modelos experimentales de la carcinogenia de vejiga, mama, colon y piel. La sobreexpresión de la actividad de ODC1 es un rasgo bien conocido en muchos cánceres y el ODC1 ha sido considerado como un protooncogén (Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C. and Holtta, E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 1992, 360, 355-358).

Las mutaciones germinales en el gen de la poliposis adenomatosa del colon (PAC) constituyen una de las predisposiciones heredadas más claramente definidas del cáncer de colon. Las mutaciones en la PAC causan un incremento sustancial de los niveles de catenina P libre, que viaja hasta el núcleo, donde forma un complejo con

miembros de la familia del factor potenciador linfoide (LFD)/factor de linfocitos T (Tcf) de factores de transcripción específicos de secuencia. El oncogén c-myc es uno de los genes diana Tcf (He, T. C. et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, *Science* 281, 1509-1512, 1998). El ARN y la proteína de c-Myc se sobreexpresan en los estadios iniciales y posteriores de la oncogenia colorrectal. El ODC es un gen diana de c-Myc.

- 5 La pérdida de función de PAC causa una regulación al alza de ODC1 (Gerner, EW and Meyskens, FL, Jr., Polyamines and cancer: old molecules, new understanding, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4, 781-792) y su sobreexpresión se ha observado con frecuencia en el carcinoma colorrectal (Hu, H. Y. et al. Ornithine decarboxylase gene is overexpressed in colorectal carcinoma, *World J. Gastroenterol.* 2005, 11, 2244-2248; Kitahara, O. et al. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia; *Cancer Res.* 2001, 61, 3544-3549; Nemoto, T., Kubota, S., Ishida, H., Murata, N. and Hashimoto, D. Ornithine decarboxylase, mitogen-activated protein kinase and matrix metalloproteinase-2 expressions in human colon tumors. *World J. Gastroenterol.* 2005, 11, 3065-3069).

15 La ODC1 posee propiedades proangiogénicas al actuar como una supresora de la endostatina (Nemoto, T., Hori, H., Yoshimoto, M., Seyama, Y. & Kubota, S. Overexpression of ornithine decarboxylase enhances endothelial proliferation by suppressing endostatin expression. *Blood* 2002, 99, 1478-1481).

20 La infección de la estirpe de células de cáncer colorrectal HT-29 con un adenovirus que codifica ARN antisentido de la ODC1 y de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (otra enzima importante en la vía biosintética de las poliaminas) conduce a la regulación a la baja de CCND1 y a la parada del ciclo celular. Asimismo, también resultó inhibida la translocación nuclear de la beta-catenina (Gong, L, Jiang, C, Zhang, B, Hu, H, Wang, W, and Liu, X; Adenovirus-mediated Expression of Both Antisense Ornithine Decarboxylase and S-adenosylmethionine Decarboxylase Induces G(I) Arrest in HT-29 Cells, *J Biochem. Mol. Biol.* 2006, 39, 730-736). El adenovirus también propició la regresión de tumores consolidados en ratones atímicos (Zhang, B, Liu, XX, Zhang, Y, Jiang, CY, Hu, HY, Gong, L, Liu, M, and Teng, QS; Polyamine depletion by ODC-AdoMetDC antisense adenovirus impairs human colorectal cancer growth and invasion in vitro and in vivo, 2006, *J Gene Med*, 8,980-989).

25 Un inhibidor específico e irreversible de ODC1 es la 2-difluorometilornitina (DMFO, Eflornithine (Sanofi-Aventis)). Se comercializa para el tratamiento de la enfermedad del sueño (causada por tripanosomas) y es el principio activo de la crema pilorredutora Vaniqa.

30 Con respecto al cáncer, la DMFO ha sido ampliamente utilizada en modelos preclínicos donde ha mostrado alentadores efectos antitumorales al reducir los niveles de poliaminas (Gerner, EW and Meyskens, FL, Jr.; Polyamines and cancer: old molecules, new understanding, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, 4, 781-792). Se han llevado a cabo ensayos clínicos en varios tipos de cáncer, algunos de ellos en curso ahora mismo con el carcinoma colorrectal. Con todo, dichos estudios emplean mayoritariamente estrategias de combinación con fines preventivos en pacientes especialmente predispuestos a sufrir el carcinoma colorrectal (pólipos adenomatosos). ODC-001, el péptido inmunogénico de la ODC, había sido descubierto con anterioridad (M. Diehl, Tesis doctoral, Universidad de Tubinga, 1998).

Antígeno nuclear de la célula en proliferación (PCNA)

40 El PCNA se halla en el núcleo y es un cofactor de la ADN-polimerasa delta. La proteína codificada actúa como un homotrímero y ayuda a mejorar la procesividad de la síntesis de la hebra conductora durante la replicación del ADN. Así pues, se expresa en todas las células en proliferación, especialmente en las células tumorales, y se usa como marcador para detectar la proliferación.

45 Hace tiempo que se sabe que los índices de proliferación en la mucosa neoplásica y en la mucosa normal adyacente, definidos mediante el análisis inmunohistoquímico de PCNA, son predictores independientes de la recidiva y de una supervivencia breve en los pacientes con cáncer colorrectal (al-Sheneber, IF, Shibata, HR, Sampalis, J, and Jothy, S; Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer, *Cancer*, 1993, 71, 1954-1959; Mayer, A, Takimoto, M, Fritz, E, Schellander, G, Kofler, K, and Ludwig, H; The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdm gene expression in colorectal cancer, *Cancer*, 1993, 71, 2454-2460; Nakamura, T, Tabuchi, Y, Nakae, S, Ohno, M, and Saitoh, Y; Serum carcinoembryonic antigen levels and proliferating cell nuclear antigen labeling index for patients with colorectal carcinoma. Correlation with tumor progression and survival, *Cancer*, 1996, 77, 1741-1746).

ADN-topoisomerasa II (TOP2)

55 Los genes TOP2A y TOP2B codifican isoformas de una ADN-topoisomerasa, enzima que controla y altera los estados topológicos del ADN durante la transcripción. Esta enzima nuclear interviene en procesos como la condensación cromosómica, la separación de las cromátidas y el alivio de la tensión torsional que aparece durante la replicación y la transcripción del ADN. Las ADN-topoisomerasas catalizan la rotura transitoria y la religazón de las dos hebras de la doble hélice de ADN, lo que les permite girar libremente una respecto a la otra, alterando de ese modo la topología del ADN. Las dos isoformas de la enzima son probablemente el producto de un fenómeno de duplicación génica. El gen que codifica la forma alfa está localizado en el cromosoma 17 y el gen beta en el cromosoma 3.

El gen TOP2A es la diana de varios fármacos antitumorales y diversas mutaciones del mismo han sido vinculadas con el desarrollo de resistencia farmacológica.

- 5 El gen TOP2A es adyacente al oncogén HER-2, el oncogén amplificado más a menudo en el cáncer de mama, ubicado en el sitio cromosómico 17q12-q21 y que, con igual frecuencia, aparece amplificado o deletado en casi el 90% de los tumores primarios de mama HER-2 positivos (Jarvinen, TA and Liu, ET; Topoisomerase II alpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer-more common than anticipated, *Cytopathology*, 14, 309-313, TOP2A). También se han descrito amplificaciones de TOP2A en otros tipos de cáncer. Trabajos experimentales recientes así como numerosos ensayos multicéntricos de gran entidad apuntan a que la amplificación (y/o delección) de TOP2A podría explicar tanto la sensibilidad como la resistencia a fármacos citotóxicos habituales, como los inhibidores de la topoisomerasa II (antraciclinas, etc.) (Kellner, U, Sehested, M, Jensen, PB, Gieseler, F, and Rudolph, P; Culprit and victim - DNA topoisomerase II, *Lancet Oncol.*, 2002, 3, 235243), dependiendo del defecto genético concreto en el locus de TOP2A (Jarvinen, TA and Liu, ET; Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase II alpha (TOP2A) genes-molecular basis for combination chemotherapy in cancer, *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2006, 6, 579-602).
- 10
- 15 Sin TOP2A la replicación del ADN y la división celular son imposibles. Ello lo ha convertido en la diana principal de muchos regímenes de tratamiento antitumoral, aunque el mecanismo exacto con el que destruye las células aún escapa a nuestro conocimiento (Kellner, U, Sehested, M, Jensen, PB, Gieseler, F, and Rudolph, P; Culprit and victim -DNA topoisomerase II, *Lancet Oncol.*, 2002, 3, 235-243). El éxito de esta estrategia se ve mermado por la aparición de resistencia espontánea, aparte de que los daños del ADN causados por los fármacos pueden potenciar la malignidad.
- 20

La TOP2B, la segunda proteína originaria potencial de TOP-001, no ha suscitado tan gran atención en la investigación oncológica porque está ubicada en una región cromosómica (3p24) que en los tumores no parece sufrir amplificaciones con frecuencia. No obstante, la estructura primaria de TOP2B es similar a la de TOP2A y posee propiedades catalíticas prácticamente idénticas a las de esta (Leontiou, C, Lightowlers, R, Lakey, JH, and Austin, CA; Kinetic analysis of human topoisomerase II alpha and beta DNA binding by surface plasmon resonance, *FEBS Lett.*, 2003, 554, 206-210). En otro estudio también se ha evidenciado que ambas isoformas pueden sustituirse mutuamente (Sakaguchi, A and Kikuchi, A; Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase, *J Cell Sci.*, 2004, 117, 1047-1054).

25

Se ha constatado que los péptidos asociados a tumor que se unen lo suficiente a las moléculas HLA de clase II, sobre todo a los alelos de dicha clase que están codificados genéticamente por los locus HLA-DR del genoma humano, son capaces de desencadenar respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T CD4-positivos humanos. Se aislaron linfocitos T CD4-positivos de sangre periférica humana, lo cual demuestra que los péptidos reivindicados son idóneos para desencadenar respuestas por parte de los linfocitos T del sistema inmunitario humano contra péptidos seleccionados del peptidoma de las células tumorales. Tal y como se ejemplifica más adelante con el péptido TGFBI-004, se ha visto que este péptido asociado a tumor que se une al HLA-DR es reconocido por los linfocitos T CD4-positivos.

30

35

Puesto que los péptidos se pueden sintetizar químicamente y sirven como principios activos farmacéuticos para preparaciones farmacéuticas, el péptido proporcionado por la presente invención se puede destinar a la inmunoterapia, preferentemente a la inmunoterapia contra el cáncer.

40 Se ha constatado que el péptido desencadena respuestas *in vivo* de los linfocitos T en pacientes aquejados por carcinoma de células renales (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). Puesto que las proteínas originarias no solo se sobreexpresan en el carcinoma de células renales sino también en el cáncer colorrectal y en otras clases de cáncer, tales péptidos resultan asimismo útiles en vacunas destinadas al tratamiento de otros tipos de tumores, en concreto en vacunas contra el cáncer colorrectal.

45

50 **Tabla 2: péptidos inmunogénicos, la SEQ ID N.º 8 es de la invención**

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen	Función	Se une a MHC
8	CEA-006	SPQYSWRINGIPQQHT	CEACAM5	Antígeno carcinoembrionario	HLA-DR
9	CCN-001	LIGATCMFV	CCND1	Ciclina D1	HLA-A*02
10	MUC-001	STAPPVHNV	MUC1	Mucina 1	HLA-A*02

(continuación)

SEQ ID N.º	ID del péptido	Secuencia	Símbolo del gen	Función	Se une a MHC
11	MMP-001	SQDDIKGIQKLYGKRS	MMP7	Metaloproteinasa 7	HLA-DR
12	CEA-005	YLSGADLNL	CEACAM5	Variante del péptido del CEA	HLA-A*02
13	MET-001	YVDPVITSI	MET	Protooncogén met	HLA-A*02
14	(HBV-001)	FLPSDFFPVS		Péptido de control	
15	CEA-004	YLSGANLNL	CEACAM5	Péptido del CEA	HLA-A*02

Molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario

5 El antígeno carcinoembrionario (CEA = CEACAM5) es una proteína de membrana de 180 kDa fuertemente glucosilada compuesta por tres unidades repetidas similares a la región C2 de Ig flanqueadas por una región N-terminal similar a la región V de Ig y una región C-terminal, que alberga una región de enlace con glucosilfosfatidilinositol (Hegde, P, Qi, R, Gaspard, R, Abernathy, K, Dharap, S, Earle-Hughes, J, Gay, C, Nwokekeh, NU, Chen, T, Saeed, Al, Sharov, V, Lee, NH, Yeatman, TJ, and Quackenbush, J; Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, *Cancer Res.*, 2001, 61, 7792-7797).

10 Como antígeno oncofetal, la CEA se expresa durante el desarrollo del feto, pero también en el epitelio gastrointestinal del adulto, si bien en niveles bajos. El CEA aparece sobreexpresado en un alto porcentaje de tumores humanos, entre ellos el 90% de los tumores de cáncer gastrointestinal, colorrectal y pancreático, en el 70% de las células del cáncer de pulmón amicrocítico y el 50% de los tumores de mama (Thompson, JA, Grunert, F, and Zimmermann, W; Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives, *J Clin Lab Anal.*, 5, 344-366, 2005). Debido a su alta expresión en las células tumorales y a su secreción en el suero, el CEA ha sido ampliamente usado como marcador tumoral (Sikorska, H, Shuster, J, and Gold, P; Clinical applications of carcinoembryonic antigen, *Cancer Detect. Prev.*, 12, 321-355, 1988) y es el marcador sérico estándar para el seguimiento del cáncer colorrectal (Locker, GY, Hamilton, S, Harris, J, Jessup, JM, Kemeny, N, Macdonald, JS, Somerfield, MR, Hayes, DF, and Bast, RC, Jr.; ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer, *J Clin Oncol*, 24, 5313-5327, 2006).

15 A pesar de su sobreexpresión en las células tumorales, los pacientes oncológicos no suelen mostrar una respuesta inmunitaria contra este antígeno (Orefice, S, Fossati, G, Pietrojusti, E, and Bonfanti, G; Delayed cutaneous hypersensitivity reaction to carcinoembryonic antigen in cancer patients, *Tumori*, 1982, 68, 473-475). El sistema inmunitario suele desarrollar tolerancia al CEA porque en el organismo se expresa de ordinario en niveles bajos. Con todo, una serie de ensayos clínicos con vacunas ha demostrado la inmunogenicidad del CEA (Sarobe, P, Huarte, E, Lasarte, JJ, and Borrás-Cuesta, F; Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses, *Curr. Cancer Drug Targets.*, 2004, 4, 443-454), especialmente en el carcinoma colorrectal (CCR) (Mosolits, S, Ullenhag, G, and Mellstedt, H; Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results, *Ann. Oncol.*, 2005, 16, 847-862), siendo el antígeno asociado a tumor (AAT) con el mayor número de plataformas vacunales probadas en este tipo de tumor (von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, *Semin. Oncol.*, 2005, 32, 76-84).

20 Se han descrito varios epítomos del CEA específicos para los linfocitos T cooperadores y citotóxicos (Crosti, M, Longhi, R, Consogno, G, Melloni, G, Zannini, P, and Protti, MP; Identification of novel subdominant epitopes on the carcinoembryonic antigen recognized by CD4+ T-cells of lung cancer patients, *J Immunol.*, 2006, 176, 5093-5099; Novellino, L, Castelli, C, and Parmiani, G; A listing of human tumor antigens recognized by T-cells: March 2004 update, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004, 54, 187-207; Ruiz, M, Kobayashi, H, Lasarte, JJ, Prieto, J, Borrás-Cuesta, F, Celis, E, and Sarobe, P; Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10, 2860-2867), lo cual ha posibilitado diversos ensayos de vacunación peptídica en el carcinoma colorrectal (Babatz, J, Rollig, C, Lobel, B, Folprecht, G, Haack, M, Gunther, H, Kohne, CH, Ehninger, G, Schmitz, M, and Bornhauser, M; Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2006, 55, 268-276; Fong, L, Hou, Y, Rivas, A, Benike, C, Yuen, A, Fisher, GA, Davis, MM, and Engleman, EG; Altered peptide ligand vaccination with F1t3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, 8809-8814; Liu, KJ, Wang, CC, Chen, LT, Cheng, AL, Lin, DT, Wu, YC, Yu, WL, Hung, YM, Yang, HY, Juang, SH, and Whang-Peng, J; Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A*0201 and HLA-A*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10, 2645-2651; Matsuda, K,

- Tsunoda, T, Tanaka, H, Umamo, Y, Tanimura, H, Nukaya, I, Takesako, K, and Yamaue, H; Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2004, 53, 609-616; Ueda, Y, Itoh, T, Nukaya, I, Kawashima, I, Okugawa, K, Yano, Y, Yamamoto, Y, Naitoh, K, Shimizu, K, Imura, K, Fuji, N, Fujiwara, H, Ochiai, T, Itoi, H, Sonoyama, T, Hagiwara, A, Takesako, K, and Yamagishi, H; Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas, *Int. J. Oncol.*, 2004, 24, 909-917; Weihrauch, MR, Ansen, S, Jurkiewicz, E, Geisen, C, Xia, Z, Anderson, KS, Gracien, E, Schmidt, M, Wittig, B, Diehl, V, Wolf, J, Bohlen, H, and Nadler, LM; Phase I/II combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer, *Clin Cancer Res.*, 2005, 11, 5993-6001). Estos y otros ensayos clínicos ejecutados hasta la fecha han demostrado la seguridad de las vacunaciones con CEA y han aportado pruebas de la inducción de una respuesta inmunitaria contra este antígeno (von Mehren, M; Colorectal cancer vaccines: what we know and what we don't yet know, *Semin. Oncol.*, 2005, 32, 76-84).
- 15 Con anterioridad se ha publicado una variante de CEA-006 (Ruiz, M, Kobayashi, H, Lasarte, JJ, Prieto, J, Borrás-Cuesta, F, Celis, E, and Sarobe, P; Identification and characterization of a T-helper peptide from carcinoembryonic antigen, *Clin Cancer Res.*, 2004, 10, 2860-2867). CEA-005 es un mutante con un único cambio de aminoácido del cual se ha descrito que resuelve el problema de inmunotolerancia central (Zaremba, S, Barzaga, E, Zhu, M, Soares, N, Tsang, KY, and Schlom, J; Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen, *Cancer Res.*, 1997, 57,4570-4577).

Gen inducido por el factor de crecimiento transformante, beta (TGFB1)

El TGFB1 fue identificado por primera vez como un gen inducible por el TGF-beta en una estirpe celular de adenocarcinoma de pulmón humano. Codifica una proteína segregada en la matriz extracelular, que supuestamente participa en la fijación celular y en la composición de dicha matriz.

- 25 También se ha demostrado que el TGFB1 es uno de los genes cuya expresión es más elevada en el cáncer colorrectal, además de expresarse también mucho en el adenoma. Los resultados obtenidos con la PCR cuantitativa demuestran la fuerte elevación tanto en tumores sin purificar como en células epiteliales tumorales purificadas. En consonancia, los experimentos de hibridación *in situ* revelan que el TGFB1 se expresa en muchos tipos de células, tanto en el compartimento estromal como epitelial (Buckhaults, P, Rago, C, St, CB, Romans, KE, Sana, S, Zhang, L, Vogelstein, B, and Kinzler, K.W; Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors, *Cancer Res.*, 2001, 61, 6996-7001).

- 30 En un metanálisis de estudios que investigaron la expresión génica en el carcinoma colorrectal, el TGFB1 fue identificado como uno de los nueve únicos genes que aparecían regulados al alza reiteradamente (4 estudios del TGFB1) (Shih, W, Chetty, R, and Tsao, MS; Expression profiling by microarrays in colorectal cancer, *Oncol. Rep.*, 2005, 13, 517-524).

- 40 En tejidos de páncreas humano se apreció un incremento de 32,4 veces en los niveles del ARNm del TGFB1 en tumores pancreáticos frente a los tejidos de control normales. Los análisis de hibridación *in situ* revelaron que el ARNm del TGFB1 se expresaba principalmente en células cancerosas del interior de la masa tumoral pancreática (Schneider, D, Kleeff, J, Berberat, PO, Zhu, Z, Korc, M, Friess, H, and Buchler, MW; Induction and expression of betaig-h.3 in pancreatic cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1588, 1-6).

- 45 El TGFB1 ha sido identificado como un gen promotor de la angiogenia en un modelo *in vitro*. Además, en varios tumores se ha detectado un aumento drástico de su expresión. Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el TGFB1 bloquearon tanto la expresión génica como la formación del tubo endotelial *in vitro*, lo cual parece indicar que el TGFB1 puede desempeñar un papel esencial en las interacciones entre la matriz y la célula endotelial (Aitkenhead, M, Wang, SJ, Nakatsu, MN, Mestas, J, Heard, C, and Hughes, CC; Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM, *Microvasc. Res.*, 2002, 63, 159-171).

Mucina-1 (MUC1)

- 50 Las mucinas son glucoproteínas epiteliales de elevado peso molecular y ricas en oligosacáridos agrupados que permanecen unidos a repeticiones en tándem de péptidos ricos en treonina, serina y prolina por medio de enlaces O-glucosídicos. Las mucinas se dividen en distintas clases según criterios estructurales y funcionales: mucinas transmembrana, a las cuales pertenece la MUC1, y las mucinas segregadas formadoras de gel. Las mucinas propias del cáncer de colon presentan diferencias en su estructura glucídica que están siendo investigadas tanto en calidad de marcadores diagnósticos y pronósticos, como en calidad de dianas para vacunas antitumorales.

- 55 El dominio extracelular de la proteína MUC1 está constituido por repeticiones muy conservadas de unos 20 aminoácidos, si bien el número real varía entre 25 y 100 dependiendo del alelo. Cada repetición en tándem contiene cinco potenciales puntos de glucosilación, y entre los dobles de treoninas y serinas radica una región inmunodominante que contiene epítomos que son reconocidos por diversos anticuerpos anti-MUC1 (Taylor-

Papadimitriou, J, Burchell, J, Miles, DW, and Dalziel, M; MUC1 and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1455, 301-313).

5 En comparación con la mayoría de los demás epitelios, la MUC1 del colon aparece más intensamente glucosilada, lo cual enmascara la proteína frente a la tinción inmunohistoquímica por medio de anticuerpos específicos frente a la misma. En los adenocarcinomas colorrectales, la MUC1 está menos glucosilada, lo cual posibilita su detección con métodos inmunológicos. La MUC1 glucosilada de forma aberrante confiere nuevas propiedades de unión y puede, de manera simultánea, mediar o bloquear la unión a moléculas de adhesión con cierta especificidad molecular, lo que le otorga un doble papel en la diseminación metastásica de las células tumorales (McDermott, KM, Crocker, PR, Harris, A, Burdick, MD, Hinoda, Y, Hayashi, T, Imai, K, and Hollingsworth, MA; Overexpression of MUC 1 reconfigures the binding properties of tumor cells, *Int. J Cancer*, 2001, 94, 783-791).

10 Por medio de métodos inmunológicos se ha detectado que la expresión de MUC1 aparece elevada en los tumores de colon, en paralelo con un pronóstico peor (Byrd, JC and Bresalier, RS; Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, 2004, 23, 77-99), lo cual indica que la regulación al alza de MUC1 podría intervenir en la progresión del cáncer colorrectal. Los tumores metastásicos de colon expresan con mayor profusión la MUC1 que aquellos que no muestran metástasis (Nakamori, S, Ota, DM, Cleary, KR, Shirotani, K, and Irimura, T; MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma, *Gastroenterology*, 1994, 106, 353-361); en un estudio la tinción de MUC1 resultó positiva en todos los tumores colorrectales con afectación hepática (Matsuda, K, Masaki, T, Watanabe, T, Kitayama, J, Nagawa, H, Muto, T, and Ajioka, Y; Clinical significance of MUC 1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma, *Jpn. J Clin Oncol.*, 2000, 30, 89-94). Un reciente estudio en 462 pacientes con cáncer colorrectal constató que la expresión de MUC1 era un indicador independiente de un mal pronóstico (Duncan, TJ, Watson, NF, Al-Attar, AH, Scholefield, JH, and Durrant, LG; The role of MUC 1 and MUC3 in the biology and prognosis of colorectal cancer, *World J Surg. Oncol*, 2007, 5, 31).

15 La presencia de anticuerpos circulantes anti-MUC1 en el cáncer colorrectal reviste significación fisiopatológica: dichos anticuerpos se han detectado en 5 de 31 (16,1%) individuos sanos y en 27 de 56 (48,2%) pacientes con cáncer colorrectal (Nakamura, H, Hinoda, Y, Nakagawa, N, Makiguchi, Y, Itoh, F, Endo, T, and Imai, K; Detection of circulating anti-MUC1 mucin core protein antibodies in patients with colorectal cancer, *J Gastroenterol.*, 1998, 33, 354-361).

20 Aparte de su cometido como diana de anticuerpos, la MUC1 también es una diana confirmada para los linfocitos T citotóxicos. Diversos informes demuestran que los linfocitos T citotóxicos sin restricción de MHC procedentes de tumores ováricos, mamarios, pancreáticos y de mieloma múltiple reconocen epítomos del centro de la proteína MUC1 localizada en la repetición en tándem (Apostolopoulos, V and McKenzie, IF; Cellular mucins: targets for immunotherapy, *Crit Rev. Immunol.*, 1994, 14, 293-309; Finn, OJ, Jerome, KR, Henderson, RA, Pecher, G, Domenech, N, Magarian-Blander, J, and Barratt-Boyes, SM; MUC-1 epithelial tumor mucin-based immunity and cancer vaccines, *Immunol. Rev.*, 1995, 145, 61-89; Barnd, DL, Lan, MS, Metzgar, RS, and Finn, OJ; Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, 86, 7159-7163; Takahashi, T, Makiguchi, Y, Hinoda, Y, Kakiuchi, H, Nakagawa, N, Imai, K, and Yachi, A; Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient, *J. Immunol.*, 1994, 153, 2102-2109; Noto, H, Takahashi, T, Makiguchi, Y, Hayashi, T, Hinoda, Y, and Imai, K; Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin, *Int. Immunol.*, 1997, 9, 791-798). No obstante, de la proteína MUC1 también se han identificado epítomos que son específicos para linfocitos T restringidos a HLA-A*02 (Apostolopoulos, V, Karanikas, V, Haurum, JS, and McKenzie, IF; Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen, *J Immunol.*, 1997, 159, 5211-5218; Brossart, P, Heinrich, KS, Stuhler, G, Behnke, L, Reichardt, VL, Stevanovic, S, Muhm, A, Rammensee, HG, Kanz, L, and Brugger, W; Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies, *Blood*, 1999, 93, 4309-4317). Uno de esos péptidos es MUC-001. Este deriva de la región de repeticiones en tándem de la proteína MUC1. En pacientes con cáncer de mama u ovario avanzado se han logrado inducir con éxito respuestas *in vivo* por parte de linfocitos T citotóxicos por medio de vacunaciones con células dendríticas que han sido expuestas repetidamente a esos péptidos de MUC1 (Brossart, P, Wirths, S, Stuhler, G, Reichardt, VL, Kanz, L, and Brugger, W; Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo* after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells, *Blood*, 2000, 96, 3102-3108; Wierdecky, J, Mueller, M, and Brossart, P; Dendritic cell-based cancer immunotherapy targeting MUC-1, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005 Apr. 28: 288-94). Asimismo, con dichas vacunaciones también se han logrado generar respuestas clínicas en pacientes con carcinoma de células renales (Wierdecky, J, Muller, MR, Wirths, S, Halder-Oehler, E, Dorfel, D, Schmidt, SM, Hantschel, M, Brugger, W, Schroder, S, Horger, MS, Kanz, L, and Brossart, P; Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients, *Cancer Res.*, 2006, 66, 5910-5918).

25 La regulación al alza de la MUC1 inmunorreactiva en el cáncer colorrectal no depende principalmente de la sobreexpresión de su ARNm sino que obedece sobre todo a su menor grado de glucosilación, lo cual desenmascara los epítomos ante los anticuerpos que los reconocen, especialmente en la región de repeticiones en tándem de MUC1. Dicha desglucosilación proporciona al mismo tiempo la oportunidad para generar epítomos de linfocitos T mediante el procesamiento alterado de antígenos en las células tumorales, proceso que la glucosilación impide en

las células normales. Este mecanismo podría explicar las notables propiedades de MUC-001 como epítipo para linfocito T asociado a tumor, pese a la ausencia de una fuerte sobreexpresión de su ARNm. Una reciente observación apunta a que los cambios en la glucosilación podrían afectar al procesamiento de antígenos; la observación en cuestión consistió en que la glucosilación alterada de MUC1 en el cáncer colorrectal puede ser realmente detectada por medio de células presentadoras de antígeno a través de un receptor que reconozca específicamente las glucoformas tumorales (Saeland, E, van Vliet, SJ, Backstrom, M, van, dB, V, Geijtenbeek, TB, Meijer, GA, and van, KY; 2006, The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, 56(8): 1225-36). La captación específica y el procesamiento de las glucoformas tumorales por parte de las células presentadoras de antígenos también podría explicar el hecho de que en pacientes con tumores de mama se hayan observado de forma natural, sin mediar inmunización, linfocitos T que son específicos de MUC-001 (Rentzsch, C, Kayser, S, Stumm, S, Watermann, I, Walter, S, Stevanovic, S, Wallwiener, D, and Guckel, B; Evaluation of pre-existent immunity in patients with primary breast cancer: molecular and cellular assays to quantify antigen-specific T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells, *Clin Cancer Res.*, 2003, 9, 4376-4386) y colorrectales (Dittmann, J, Keller-Matschke, K, Weinschenk, T, Kratt, T, Heck, T, Becker, HD, Stevanovic, S, Rammensee, HG, and Gouttefangeas, C; CD8+ T-cell response against MUC1-derived peptides in gastrointestinal cancer survivors, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, 54, 750-758). En dichos pacientes no se describieron efectos autoinmunitarios. Esto demuestra el papel natural de MUC-001 como péptido asociado a tumor que estimula la aparición de linfocitos T específicos y sugiere que su administración podría considerarse segura aunque no se ha detectado la sobreexpresión del antígeno de MUC1 a nivel del ARNm.

Protooncogén Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) (c-Met)

El producto proteico del protooncogén MET es el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. Contiene un dominio tirosina cinasa que activa vías de señalización involucradas en la proliferación, motilidad, adhesión e invasión celulares (Trusolino, L and Comoglio, PM; Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2, 289-300).

Los estudios en diversos tipos de tumores han demostrado diversos mecanismos para la activación de c-Met, tales como un bucle autocrino de HGF/c-Met, mutaciones puntuales activadoras, proteína de fusión TPR-Met y la incapacidad de dividir c-Met en las cadenas α y β (Di Renzo, MF, Olivero, M, Martone, T, Maffe, A, Maggiora, P, Stefani, AD, Valente, G, Giordano, S, Cortesina, G, and Comoglio, PM; Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas, *Oncogene*, 2000, 19, 1547-1555; Ebert, M, Yokoyama, M, Friess, H, Buchler, MW, and Korc, M; Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer, *Cancer Res.*, 1994, 54, 5775-5778; Mondino, A, Giordano, S, and Comoglio, PM; Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor), *Mol. Cell Biol.*, 1991, 11, 6084-6092; Olivero, M, Valente, G, Bardelli, A, Longati, P, Ferrero, N, Cracco, C, Terrone, C, Rocca-Rossetti, S, Comoglio, PM, and Di Renzo, MF; Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosine kinase in a HPRCC family, *Int. J. Cancer*, 1999, 82, 640-643; Park, M, Dean, M, Cooper, CS, Schmidt, M, O'Brien, S3, Blair, DG, and Vande Woude, GF; Mechanism of met oncogene activation, *Cell*, 1986, 45, 895-904; Park, WS, Dong, SM, Kim, SY, Na, EY, Shin, MS, Pi, JH, Kim, BJ, Bae, JH, Hong, YK, Lee, KS, Lee, SH, Yoo, NJ, Jang, JJ, Pack, S, Zhuang, Z, Schmidt, L, Zbar, B, and Lee, JY; 1999, Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas, *Cancer Res.*, 59, 307-310; Rahimi, N, Tremblay, E, McAdam, L, Park, M, Schwall, R, and Elliott, B; 1996, Identification of a hepatocyte growth factor autocrine loop in a murine mammary carcinoma, *Cell Growth Differ.*, 7, 263-270; Schmidt, L, Duh, FM, Chen, F, Kishida, T, Glenn, G, Choyke, P, Scherer, SW, Zhuang, Z, Lubensky, I, Dean, M, Allikmets, R, Chidambaram, A, Bergerheim, UR, Feltis, JT, Casadevall, C, Zamarron, A, Bernues, M, Richard, S, Lips, CJ, Walther, MM, Tsui, LC, Geil, L, Orcutt, ML, Stackhouse, T, Lipan, J, Slife, L, Brauch, H, Decker, J, Niehans, G, Hughson, MD, Moch, H, Storkel, S, Lerman, MI, Linehan, WM, and Zbar, B; 1997, Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas, *Nat. Genet.*, 16, 68-73; Schmidt, L, Junker, K, Weirich, G, Glenn, G, Choyke, P, Lubensky, I, Zhuang, Z, Jeffers, M, Vande, WG, Neumann, H, Walther, M, Linehan, WM, and Zbar, B; 1998, Two North American families with hereditary papillary renal carcinoma and identical novel mutations in the MET proto-oncogene, *Cancer Res.*, 58, 1719-1722). Desde el punto de vista mecanicista, la sobreexpresión de c-Met coopera con la mutación oncogénica de Ki-ras para potenciar la capacidad oncogénica de las células de cáncer de colon en condiciones *in vivo* (Long, IS, Han, K, Li, M, Shirasawa, S, Sasazuki, T, Johnston, M, and Tsao, MS; Met receptor overexpression and oncogenic Ki-ras mutation cooperate to enhance tumorigenicity of colon cancer cells in vivo, *Mol. Cancer Res.*, 2003, 1, 393-401).

Un hecho interesante son los indicios de interacción entre la señalización de MET y la vía de la Wnt/beta-catenina que aparece con frecuencia regulada al alza en el cáncer de colon. MET puede ser activado por la prostaglandina E2 (PGE2) y cuando es activado por ella se asocia con la β -catenina y aumenta su grado de fosforilación de las tirosinas, lo cual estimula la invasividad de las células tumorales de colon (Pai, R, Nakamura, T, Moon, WS, and Tarnawski, AS; Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling by cross-talk between two distinct growth factor receptors, *FASEB J*, 2003, 17, 1640-1647). En fecha reciente se ha descrito la activación mútua de MET y de la beta-catenina, lo cual da pie a un bucle de retroalimentación positiva entre estos dos factores clave en la oncogenia colorrectal (Rasola, A, Fassetta, M, De, BF, D'Alessandro, L, Gramaglia, D, Di Renzo, MF, and Comoglio, PM; A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains

colorectal cancer cell invasive growth, *Oncogene*, 2007, 26, 1078-1087).

El nivel de expresión del ARNm de c-Met en los tumores colorrectales primarios (n=36) es un marcador predictivo importante de la invasión precoz y la metástasis regional, cosa que se correlaciona directamente con el estadio del cáncer de colon (Takeuchi, H, Bilchik, A, Saha, S, Turner, R, Wiese, D, Tanaka, M, Kuo, C, Wang, HJ, and Hoon, DS; c-MET expression level in primary colon cancer: a predictor of tumor invasion and lymph node metastases, *Clin Cancer Res.*, 2003, 9, 1480-1488). Otro análisis de la expresión de c-Met en 130 muestras de cáncer colorrectal observó sobreexpresión (T/N > 2,0) en el 69% de los tumores primarios y niveles significativamente mayores de c-Met en el cáncer colorrectal con invasión de vasos sanguíneos (P = 0,04), así como en estadios avanzados (P = 0,04) lo cual avala el papel de c-Met en la progresión y la metástasis del cáncer colorrectal humano (Zeng, Z, Weiser, MR, D'Alessio, M, Grace, A, Shia, J, and Paty, PB; Immunoblot analysis of c-Met expression in human colorectal cancer: overexpression is associated with advanced stage cancer, *Clin Exp. Metastasis*, 2004, 21, 409-417). En otro estudio el 69% y el 48% de un conjunto de 60 adenocarcinomas de colon mostraron respectivamente elevaciones superiores a 2 veces y a 10 veces del ARNm de c-Met, en contraste con la mucosa normal aledaña (Kammula, US, Kuntz, EJ, Francone, TD, Zeng, Z, Shia, J, Landmann, RG, Paty, PB, and Weiser, MR; Molecular co-expression of the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome, *Cancer Lett.*, 2007, 248, 219-228). Así pues, el aumento de la señalización de c-Met es habitual en los primeros estadios del cáncer colorrectal, si bien la expresión máxima tiene lugar en las fases avanzadas y metastásicas.

Ciclina D1 (CCND1)

CCND1 pertenece a la familia altamente conservada de las ciclinas, cuyos miembros se caracterizan por una periodicidad drástica en la abundancia de sus proteínas a lo largo de todo el ciclo celular. Las ciclinas actúan como reguladores de las CDK cinasas. Las diversas ciclinas muestran patrones de expresión y degradación distintivos que contribuyen a la coordinación cronológica de cada uno de los sucesos propios de la mitosis. Esta ciclina forma un complejo con las CDK4 o CDK6 y actúa como subunidad reguladora de ambas, complejo cuya actividad es precisa para la transición de G1 a S en el ciclo celular. Este gen a menudo se observa mutado, amplificado o sobreexpresado en diversos tumores, cosa que altera la progresión del ciclo celular y que puede contribuir a la oncogenia (Fu, M, Wang, C, Li, Z, Sakamaki, T, and Pestell, RG; Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions, *Endocrinology*, 2004, 145, 5439-5447).

Un frecuente polimorfismo mononucleotídico A/G (A870G) deriva en dos isoformas distintas de su ARNm: a y b. La isoforma b surgida del ajuste alternativo codifica una proteína truncada que ha sido vinculada con una mayor incidencia de tumores en el contexto del cáncer de pulmón, de colon y otros tipos (Fu, M, Wang, C, Li, Z, Sakamaki, T, and Pestell, RG; Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions, *Endocrinology*, 2004, 145, 5439-5447).

En el caso del cáncer colorrectal, se ha descrito con frecuencia la sobreexpresión de CCND1 tanto a nivel del ARNm como de la proteína (Sutter, T, Doi, S, Carnevale, KA, Arber, N, and Weinstein, IB; Expression of cyclins D1 and E in human colon adenocarcinomas, *J Med*, 1997, 28, 285-309; Mermelshtein, A, Gerson, A, Walfisch, S, Delgado, B, Shechter-Maor, G, Delgado, J, Fich, A, and Gheber, L; Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas, *Br. J Cancer*, 2005, 93, 338-345; Balcerczak, E, Pasz-Walczak, G, Kumor, P, Panczyk, M, Kordek, R, Wierzbicki, R, and Mirowski, M; Cyclin D1 protein and CCND1 gene expression in colorectal cancer, *Eur. J Surg. Oncol.*, 2005, 31, 721-726; Bondi, J, Husdal, A, Bukholm, G, Nesland, JM, Bakka, A, and Bukholm, IR; Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome, *J Clin Pathol.*, 2005, 58, 509-514; Perez, R, Wu, N, Klipfel, AA, and Beart, RW, Jr.; A better cell cycle target for gene therapy of colorectal cancer: cyclin G, *J Gastrointest. Surg.*, 2003, 7, 884-889; Wong, NA, Morris, RG, McCondochie, A, Bader, S, Jodrell, DI, and Harrison, DJ; Cyclin D1 overexpression in colorectal carcinoma in vivo is dependent on beta-catenin protein dysregulation, but not k-ras mutation, *J Pathol.*, 2002, 197, 128-135; McKay, JA, Douglas, JJ, Ross, VG, Curran, S, Murray, GI, Cassidy, J, and McLeod, HL; Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. Aberdeen Colorectal Initiative, *Int. J Cancer*, 2000, 88, 77-81; Bartkova, J, Lukas, J, Strauss, M, and Bartek, J; The PRAD-1/cyclin D1 oncogene product accumulates aberrantly in a subset of colorectal carcinomas, *Int. J Cancer*, 1994, 58, 568-573).

Esto puede tener su explicación en el hecho confirmado de que el CCND1 es un gen diana de la vía de la β -catenina-TCF/LEF, que a menudo aparece regulada al alza en el carcinoma colorrectal (Shtutman, M, Zhurinsky, J, Simcha, I, Albanese, C, D'Amico, M, Pestell, R, and Ben-Ze'ev, A; The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, 5522-5527; Tetsu, O and McCormick, F; Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells, *Nature*, 1999, 398, 422-426).

La expresión realizada del CCND1 ha sido vinculada con los grados tumorales elevados, metástasis y supervivencia menor (Balcerczak, E, Pasz-Walczak, G, Kumor, P, Panczyk, M, Kordek, R, Wierzbicki, R, and Mirowski, M; Cyclin D1 protein and CCND1 gene expression in colorectal cancer, *Eur. J Surg. Oncol.*, 2005, 31, 721-726; Bahnassy, AA, Zekri, AR, El-Houssini, S, El-Shehaby, AM, Mahmoud, MR, Abdallah, S, and El-Serafi, M; Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients, *BMC. Gastroenterol.*, 2004, 4, 22; McKay, JA, Douglas, JJ, Ross, VG, Curran, S, Murray, GI, Cassidy, J, and McLeod, HL; Cyclin D1 protein expression and gene polymorphism in colorectal cancer. Aberdeen Colorectal Initiative, *Int. J Cancer*, 2000, 88, 77-81; Maeda, K, Chung,

Y, Kang, S, Ogawa, M, Onoda, N, Nishiguchi, Y, Ikehara, T, Nakata, B, Okuno, M, and Sowa, M; Cyclin D1 overexpression and prognosis in colorectal adenocarcinoma, *Oncology*, 1998, 55, 145-151).

Metaloproteidasa de la matriz 7 (matrilisina, uterina) (MMP7)

5 Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) constituyen una gran familia de proteinasas dependientes de cinc estructuralmente afines que se describen típicamente como capaces de degradar componentes de la matriz extracelular. Se ha observado que algunos tipos de MMP presentan una expresión elevada en los tumores y que la mayoría de los tumores presentan una actividad potenciada de estas enzimas (Curran, S and Murray, GI; 1999, Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis, *J Pathol.*, 189, 300-308; Curran, S and Murray, GI; 2000, Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumor invasion and metastasis, *Eur. J Cancer*, 36, 10 1621-1630).

La membrana basal y la matriz extracelular representan dos barreras físicas frente a la invasión maligna cuya degradación por parte de las MMP desempeña un papel clave en la progresión del tumor y la diseminación de las metastásis (Johnsen, M, Lund, LR, Romer, J, Almholt, K, and Dano, K; 1998, Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 667-671; Nelson, AR, Fingleton, B, 15 Rothenberg, ML, and Matrisian, LM; 2000, Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications, *J Clin Oncol.*, 18, 1135-1149; Wang, FQ, So, J, Reierstad, S, and Fishman, DA; 2005, Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase, *Int.J Cancer*, 114, 19-31). Aparte de dicha función, ahora se debate la implicación de las MMP en el desarrollo y la progresión del tumor, incluyendo cometidos en la apoptosis, así como en la proliferación y la diferenciación celulares. Tales implicaciones están vinculadas con la 20 proteólisis facilitada por las MMP de proteínas ajenas a la matriz y de otras acciones ajenas a su actividad enzimática (Egeblad, M and Werb, Z; 2002, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat.Rev.Cancer*, 2, 161-174; Leeman, MF, Curran, S, and Murray, GI; 2003, New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression, *J. Pathol.*, 201, 528-534).

Estudios recientes han demostrado que varias metaloproteinasas de la matriz, especialmente la matrilisina (MMP7), 25 interaccionan con las vías específicas de señalización y genética molecular que están involucradas en el desarrollo del cáncer colorrectal. En particular, la matrilisina aparece activada en un estadio inicial de la oncogenia colorrectal a través de la vía de señalización de la beta-catenina (Brabletz, T, Jung, A, Dag, S, Hlubek, F, and Kirchner, T; 1999, beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer, *Am.J Pathol.*, 155, 1033-1038; Leeman, MF, Curran, S, and Murray, GI; 2003, New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression, *J.Pathol.*, 201, 528-534; Zucker, S and 30 Vacirca, J; 2004, Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, 23, 101-117).

La MMP7 aparece sobreexpresada tanto en los tumores colorrectales benignos como malignos (Ishikawa, T, 35 Ichikawa, Y, Mitsunashi, M, Momiyama, N, Chishima, T, Tanaka, K, Yamaoka, H, Miyazaki, K, Nagashima, Y, Akitaya, T, and Shimada, H; 1996, Matrilysin is associated with progression of colorectal tumor, *Cancer Lett.*, 107, 5-10; McDonnell, S, Navre, M, Coffey, RJ, Jr., and Matrisian, LM; 1991, Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas, *Mol.Carcinog.*, 4, 527-533; Miyazaki, K, Hattori, Y, Umenishi, F, Yasumitsu, H, and Umeda, M; 1990, Purification and characterization of extracellular matrix-degrading metalloproteinase, matrin (pump-1), secreted from human rectal carcinoma cell line, *Cancer Res.*, 50, 40 7758-7764; Nagashima, Y, Hasegawa, S, Koshikawa, N, Taki, A, Ichikawa, Y, Kitamura, H, Misugi, K, Kihira, Y, Matuo, Y, Yasumitsu, H, and Miyazaki, K; 1997, Expression of matrilysin in vascular endothelial cells adjacent to matrilysin-producing tumors, *Int. J Cancer*, 72, 441-445; Newell, KJ, Witty, JP, Rodgers, WH, and Matrisian, LM; 1994, Expression and localization of matrix-degrading metalloproteinases during colorectal tumorigenesis, *Mol. Carcinog.*, 10, 199-206; Yoshimoto, M, Itoh, F, Yamamoto, H, Hinoda, Y, Imai, K, and Yachi, A; 1993, Expression of 45 MMP-7 (PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers, *Int.J Cancer*, 54, 614-618). La MMP7 es una de las pocas MMP que es segregada realmente por las células tumorales (Overall, CM and Kleinfeld, O; 2006, Tumor microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 6, 227-239). Asimismo, los niveles de expresión del ARNm de la MMP7 se correlacionan con el estadio de la progresión del cáncer colorrectal (Ishikawa, T, Ichikawa, Y, Mitsunashi, M, Momiyama, N, Chishima, T, 50 Tanaka, K, Yamaoka, H, Miyazaki, K, Nagashima, Y, Akitaya, T, and Shimada, H; 1996, Matrilysin is associated with progression of colorectal tumor, *Cancer Lett.*, 107, 5-10; Mori, M, Barnard, GF, Mimori, K, Ueo, H, Akiyoshi, T, and Sugimachi, K; 1995, Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas, *Cancer*, 75, 1516-1519). En las metastásis del carcinoma colorrectal, la MMP7 desempeña un papel crítico (Adachi, Y, Yamamoto, H, Itoh, F, Hinoda, Y, Okada, Y, and Imai, K; 1999, Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers, *Gut*, 45, 252-258; Mori, M, Barnard, GF, Mimori, K, Ueo, H, Akiyoshi, T, and 55 Sugimachi, K; 1995, Overexpression of matrix metalloproteinase-7 mRNA in human colon carcinomas, *Cancer*, 75, 1516-1519).

Los niveles elevados de la MMP7 en suero aparecen relacionados con un mal pronóstico en los pacientes con 60 cáncer colorrectal avanzado (Maurel, J, Nadal, C, Garcia-Albeniz, X, Gallego, R, Carcereny, E, Almendro, V, Marmol, M, Gallardo, E, Maria, AJ, Longaron, R, Martinez-Fernandez, A, Molina, R, Castells, A, and Gascon, P; 2007, Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients, *Int.J Cancer*,

Published Online: 8 May 2007) y la sobreexpresión en los pacientes con cáncer colorrectal, que aparece asociada de nuevo con la supervivencia reducida, se ha sugerido que promueve la elusión de la vigilancia del sistema inmunitario mediante la escisión de Fas en las células tumorales (Wang, WS, Chen, PM, Wang, HS, Liang, WY, and Su, Y; 2006, Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma, *Carcinogenesis*, 27, 1113-1120).

Las proteínas de la invención pueden ser la diana de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor en múltiples tipos de cáncer.

El péptido HBV-001 del antígeno central del virus de la hepatitis B no deriva de un antígeno asociado a tumor propio del ser humano, sino que procede del citado antígeno del virus de la hepatitis B. En primer lugar, posibilita hacer comparaciones cuantitativas de la magnitud de las respuestas de los linfocitos T inducidas por los TUMAP, por lo que permite extraer conclusiones importantes sobre la capacidad para desencadenar respuesta antitumorales. En segundo lugar, actúa como un importante control positivo en caso de ausencia total de respuesta de linfocitos T en el paciente. Y tercero, también permite extraer conclusiones en cuanto al estado de inmunocompetencia del paciente.

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) se cuenta entre las primeras causas de hepatopatía, puesto que afecta a unos 350 millones de personas en todo el mundo (Rehermann, B and Nascimbeni, M; *Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection*, Nat. Rev. Immunol., 2005, 5, 215-229). Debido a la facilidad con que se contagia por vía horizontal y vertical y al riesgo de cronificación que puede degenerar en cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular, el VHB tiene una gran repercusión en los sistemas sanitarios públicos de numerosos países en todo el mundo. El genoma del VHB está compuesto de ADN circular parcialmente bicatenario (Previsani, N and Lavanchy, D; 2002, *Hepatitis B, (Epidemic and Pandemic Alert and Response*, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2002). En los viriones del VHB, el genoma es empaquetado junto con la proteína central HBc y otras proteínas para formar la nucleocápsida, que queda circundada por una envuelta externa que contiene lípidos y la proteína de superficie de la familia HBs (también llamada proteína de la envuelta). Los determinantes antigénicos vinculados con la HBc y la HBs son denominados HBcAg y HBsAg. Estos antígenos están asociados con respuestas serológicas, es decir, con anticuerpos presentes en la sangre del paciente y están entre los sistemas antígeno-anticuerpo más útiles para el diagnóstico de la infección por el VHB. HBc representa un novedoso antígeno foráneo para todos los individuos que no presentan antecedentes de infección por el VHB. Puesto que a este antígeno se le conocen péptidos inmunogénicos (Bertoletti, A, Chisari, FV, Penna, A, Guilhot, S, Galati, L, Missale, G, Fowler, P, Schlicht, HJ, Vitiello, A, Chesnut, RC, and .; 1993, Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein, *J.Virol.*, 67, 2376-2380; Livingston, BD, Crimi, C, Grey, H, Ishioka, G, Chisari, FV, Fikes, J, Grey, H, Chesnut, RW, and 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), como antígeno de control positivo para el ensayo inmunológico se escogió un péptido de diez aminoácidos del HBcAg. La estimulación de CTL específicos hacia el péptido de la HBc sirve por tanto como indicador de la inmunocompetencia del paciente y del éxito de la vacunación.

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

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).

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

En una forma de realización de la presente invención, el péptido de la presente invención forma parte de una

proteína de fusión que comprende los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "Ii") 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)).

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

- 10 Enlaces no peptídicos son, por ejemplo: -CH₂-NH, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- y -CH₂SO-. La patente de Estados Unidos 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH₃.

- 15 El péptido de la invención descrito arriba puede ser sintetizado 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 del péptido. Por ejemplo, a los extremos amino de los péptidos se pueden añadir grupos hidrófobos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej. el grupo hidrófobo t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

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

- 25 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.

- 30 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.

- 35 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 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 no contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, sólo los péptidos que contienen 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.

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

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

La composición farmacéutica puede compilarse de modo que la selección, el número y/o cantidad de péptidos

presentes en la composición sea/sean específicos del tejido, del cáncer y/o del paciente. Por ejemplo, la selección exacta de los péptidos puede estar guiada por los patrones de expresión de las proteínas originales en un tejido dado para evitar efectos secundarios. La selección puede depender del tipo específico de cáncer que el paciente padece así como del 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 la composición destinada a ser usada como vacuna contra el carcinoma colorrectal, por ejemplo, se evitarán los péptidos cuyas proteínas originales se expresen en grandes cantidades en los tejidos normales o bien se procurará que estén presentes en bajas cantidades en la composición de la invención. Por otra parte, si se sabe que el tumor del paciente expresa grandes cantidades de cierta proteína la composición farmacéutica para el tratamiento de ese cáncer podría contener grandes cantidades y/o contar con más de un péptido específico de esa proteína en particular o de la vía de esa proteína. 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 más adelante). 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 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 péptidos diferentes, aún más preferentemente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 péptidos diferentes, y lo más preferible de todo 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 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 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. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los CTL CD8 o CD4. 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 epítopos de MHC de clase II que estimulan a los CTL CD4 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD8-positivos. Por su parte, en los epítopos de MHC de clase I que estimulan a los CTL CD8, la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida proporcionan epítopos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítopos que estimulan a los CD4 y CD8 son bien conocidos en la técnica.

Para desencadenar una respuesta inmunitaria normalmente es necesario incluir excipientes que aumenten la inmunogenicidad de la composición. Así pues, en una forma de realización preferida la composición farmacéutica comprende además como mínimo un adyuvante adecuado. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej. respuestas inmunitarias mediadas por CTL y linfocitos T cooperadores (T_H) contra un antígeno, y podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Los adyuvantes adecuados incluyen, entre otros ejemplos: 1018 ISS, sales de aluminio, Amplivax, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod, ImuFact IMP321, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, JuvImmune, LipoVac, MF59, monofosforil lípido A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, sistema de vector PepTel[®], micropartículas PLG, resiquimod, SRL172, virosomas y otras partículas pseudovíricas, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, QS21 stimulon de Aquila (Aquila Biotech, Worcester, MA, EE.UU.) que es un derivado de la saponina, extractos de micobacterias y análogos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante incompleto de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunitarios (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas y su preparación (Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, McDonald DM; Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection; Cell Immunol. 1998; 186(1):18-27; Allison AC; The mode of action of immunological adjuvants; Dev Biol Stand. 1998; 92:3-11). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se las ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF- α), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertir las 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, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. la IL-12) (Gabrilovich DI, Cunningham HT, Carbone DP; IL-12 and mutant P53 peptide-pulsed dendritic cells for the specific immunotherapy of cancer; J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1996 (6):414-418).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunostimuladores 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_{H1} y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Arthur M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, Nature Reviews, Drug Discovery, 2006, 5, 471-484). La patente de EE.UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes que no son ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 comercial conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

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

Los adyuvantes preferidos son dSLIM, BCG, OK432, imiquimod, PeviTter y JuvImmune.

En una forma de realización preferida, en 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).

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica que se da a conocer, el adyuvante es imiquimod.

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

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

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

Debido a los mecanismos de evasión los tumores suelen desarrollar resistencia contra los fármacos con los que son tratados. La resistencia farmacológica puede aparecer durante el tratamiento y manifestarse en forma de metástasis y de tumores recurrentes. A fin de evitar esta resistencia farmacológica el tumor se suele tratar con una combinación de fármacos, y las metástasis y los tumores que reaparecen después de un periodo de tiempo sin enfermedad

5 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

10 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.

15 En otro aspecto se da a conocer 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.

20

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

25 La composición que contiene el péptido 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.

30 La composición dada a conocer se puede utilizar en un método para tratar o ser utilizada como una vacuna contra el cáncer. El cáncer puede ser de la cavidad bucal o la faringe, cáncer del tubo digestivo, cáncer de colon, recto o ano, cáncer de las vías respiratorias, cáncer de mama, cáncer de cuello de útero, vagina o vulva, cáncer del cuerpo uterino y de ovario, cancer de las vías genitales masculinas, cáncer de las vías urinarias, cáncer de hueso y tejido blando, sarcoma de Kaposi, melanoma de la piel, melanoma ocular, y cáncer ocular no melanómico, cáncer de cerebro y del sistema nervioso central, cáncer de tiroides y de otras glándulas endocrinas, linfoma de hodgkin,

35 linfoma no hodgkiniano o mieloma, preferentemente cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer cerebral, GIST o glioblastoma.

En la forma de realización más preferida del método de tratamiento o vacuna conforme a la invención, la vacuna es una vacuna antitumoral multipeptídica para el tratamiento del carcinoma colorrectal. La vacuna consiste en 14 péptidos (conforme a las SEQ ID N.º 1 a SEQ ID N.º 15) con entre aproximadamente 1500 µg y aproximadamente 75 µg, preferentemente entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 750 µg, y más preferentemente entre aproximadamente 500 µg y aproximadamente 600 µg, y lo más preferido de todo, aproximadamente 578 µg de cada péptido, pudiendo todos ellos estar purificados con HPLC y cromatografía de intercambio iónico y mostrar el aspecto de un polvo blanco o blancuzco. El liofilizado se disuelve preferentemente en hidrogenocarbonato de sodio, y se usa para la inyección intradérmica en los 30 minutos posteriores a su reconstitución a temperatura ambiente. De acuerdo con la presente invención, las cantidades preferidas de péptidos pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 y 100 mg, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 1 mg, y aún más preferentemente entre aproximadamente 300 µg y 800 µg por 500 µl de solución. En la presente memoria, el término «aproximadamente» significa +/- 10 por ciento del valor dado, si no se indica otra cosa distinta. La persona versada en la técnica será capaz de ajustar la cantidad real de péptido que debe utilizarse en función de varios factores, como, por ejemplo, el estado inmunitario del paciente y/o la cantidad de TUMAP que presenta un tipo particular de cáncer. El péptido de la presente invención puede proporcionarse en otras formas adecuadas (soluciones estériles, etc.) en lugar de liofilizado.

40

45

50

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

55

Se prefiere una composición farmacéutica conforme a la invención, en la cual la cantidad de péptido (en particular del asociado a tumor) conforme a la invención presente en la composición sea específica del tejido, del cáncer y/o del paciente.

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

Por último, la vacuna conforme a la invención puede depender del tipo específico de cáncer del paciente así como del estado de la enfermedad, las anteriores pautas de tratamiento, el estado inmunitario del paciente y, por supuesto, de su haplotipo HLA. Además, la vacuna conforme a la invención puede contener componentes individualizados, de acuerdo con las necesidades personales del paciente en cuestión. Ejemplos de esta personalización son el uso de diferentes cantidades de péptidos 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.

El péptido de la presente invención puede usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen, como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos. Además, los péptidos se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

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

Los equipos como los dados a conocer 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 equipo y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

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

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

Los equipos como los indicados pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas dadas a conocer 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.

Preferentemente, los equipos descritos incluyen una formulación como la dada a conocer acondicionada para ser utilizada 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 de la angiogenia o agente antiangiogénico, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un

líquido farmacéuticamente aceptable. Preferentemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes dados a conocer que son componentes del presente equipo.

- 5 La formulación farmacéutica dada a conocer 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. Preferentemente la administración será por vía subcutánea, y más preferentemente 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.

10 **Breve descripción de las figuras**

- 15 La Figura 1 expone el análisis de tetrámeros de la proliferación estimulada con microesferas de linfocitos CD8+ específicos de ODC-001 y de NOX-001 obtenidos de sangre periférica. Se depositaron por pocillo 1×10^6 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) enriquecidas con CD8+ procedentes del donante sano HD100 que era HLA-A*0201+ y se estimularon semanalmente con microesferas acopladas con anti-CD28 más antígeno tumoral A*0201/ODC-001 en alta densidad (panel superior) o anti-CD28 más antígeno tumoral A*0201/NOX-001 en alta densidad (panel inferior). Después de tres estimulaciones *in vitro*, todas las células se tiñeron con anticuerpo CD8 FITC y APC con tetrámeros A*0201/NOX-001 PE y A*0201/ODC-001. Las células se seleccionan entre la población de linfocitos o de linfocitos CD8+ (panel derecho) y las cifras representan el porcentaje de tetrámeros+ en los linfocitos CD8+.

- 20 La Figura 2 muestra la inmunogenicidad *in vitro* del TGFBI-004 detectada mediante ELISPOT de IFN- γ después de cinco ciclos de estimulación. Las células fueron estimuladas y reestimuladas repetidamente con el péptido TGFBI-004 y después incubadas con dicho péptido (Pocillos 1, 2, 3 y 4) y con otro péptido irrelevante (control negativo). El análisis de ELISPOT IFN- γ se llevó a cabo con un Lector ELISPOT (CTL, Cleveland, EE. UU.). Como control positivo se empleó PHA-Ionomicina. Las cifras indican el recuento de puntos positivos.

- 25 La Figura 3 muestra la inmunogenicidad *in vitro* del TGFBI-004 detectada mediante tinción intracelular de citocinas (ICS) tras cinco ciclos de estimulación. Las células se estimularon con células dendríticas autólogas cargadas con TGFBI-004 y fueron reestimuladas repetidamente con PBMC autólogos más TGFBI-004. Para la lectura las células fueron incubadas con el péptido TGFBI-004 (Pocillos 1, 2, 3 y 4) y con otro péptido irrelevante (control negativo). Además de la tinción intracelular del IFN- γ , las células también se tiñeron con anticuerpos frente a CD4-FITC y CD8-PerCP. El análisis se realizó con un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD Biosciences, Alemania).

- 35 La Figura 4 muestra el análisis ELISPOT de la producción de IFN- γ por parte de estirpes de linfocitos T tras su reestimulación *in vitro* con el péptido NOX-001. A. Estirpe de linfocitos T 7+ procedente del donante HBC-154 (selección de CD8+ NOX-001 tetrámero+); B. Estirpe de linfocitos T 7- procedente del donante HBC-154 (selección de CD8+ NOX-001 tetrámero-). Las células seleccionadas CD8+ NOX-001 tetrámero+ (A.) y CD8+ NOX-001 tetrámero- (B.) fueron analizadas con ELISPOT IFN- γ después de la reestimulación con un péptido irrelevante (MLA-001) (pocillos superiores) y con el péptido relevante (10 μ g/ml) (NOX-001) (pocillos inferiores). Las cifras indican el recuento de puntos positivos.

- 40 Figura 5: Frecuencias de los linfocitos T CD8+ específicos de CEA-004 en cuatro donantes sanos HLA-A2 tras la estimulación *in vitro* con CEA-004 determinadas mediante análisis por citometría de flujo.

Figura 6: Afinidad de los péptidos de HLA de clase I de la invención por la molécula MHC codificada por el alelo HLA-A*0201.

Ejemplos

1. Síntesis y estructura

- 45 Los péptidos se sintetizaron con métodos convencionales y conocidos de síntesis en fase sólida basados en la química del Fmoc. Después de la purificación con HPLC preparativa, se aplicó un procedimiento de intercambio iónico para incorporar contraiones fisiológicamente compatibles (acetato o cloruro). Por último, se los sometió a liofilización y se obtuvo una sustancia sólida blanca o casi blanca. Todos los TUMAP son administrados en forma de sales de acetato excepto el IMA-CCN-001 que se suministra en forma de sal de cloruro por razones técnicas durante el proceso de fabricación.

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

Tabla: Características fisicoquímicas de los péptidos contenidos en IMA910

N.º	ID del péptido	Longitud del péptido (N.º de aminoácidos)	Tipo de sal	Forma física	Higroscopicidad
1	IMA-C20-001	9	Acetato	Liofilizado blanco o casi blanco	Conservado como polvo liofilizado. Los péptidos liofilizados en general tienen propiedades higroscópicas.
2	IMA-CCN-001	9	Cloruro		
3	IMA-CEA-004	9	Acetato		
4	IMA-CEA-006	16	Acetato		
5	IMA-HBV-001	10	Acetato		
6	IMA-MET-001	9	Acetato		
7	IMA-MMP-001	16	Acetato		
8	IMA-MUC-001	9	Acetato		
9	IMA-NOX-001	9	Acetato		
10	IMA-ODC-001	9	Acetato		
11	IMA-PCN-001	10	Acetato		
12	IMA-TGFBI-001	10	Acetato		
13	IMA-TGFBI-004	15	Acetato		
14	IMA-TOP-001	10	Acetato		

5 Se ha efectuado el análisis de la distribución de tamaño y de la morfología de las partículas obtenidas tras la reconstitución mediante la captura de imágenes directas de cada partícula en el intervalo de 0,25 a 100 µm y el preceptivo análisis de imagen. El análisis reveló que la mayoría de las partículas (> 95%) se hallaba en el intervalo de 0,25 a 2,7 µm. Hasta el momento, no se han observado diferencias importantes en la distribución del tamaño y la morfología en la primera, segunda y tercera horas posteriores a la reconstitución.

2. Componentes de la composición farmacéutica de ejemplo de IMA910

10 IMA910 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 tres péptidos 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, KL and Disis, ML; Augmenting T helper cell immunity in cancer, Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord., 2005, 5, 365-371). Además de esos trece TUMAP, IMA910 contienen un péptido de control de origen vírico.

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

20 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.

25 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.

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

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

5 Tabla 3: Composición de los TUMAP de IMA910.

IMA910 contiene diez TUMAP de HLA-A* 02 (clase I) y tres TUMAP de HLA-DR (clase II). Además, contiene el péptido marcador viral HBV-001 que no se cita aquí.

ID del TUMAP	Denominación	Función / Comentarios
<i>TUMAP HLA-A*02</i>		
C20-001	Marco de lectura abierto 42 del cromosoma 20	Poco caracterizado, fuerte sobreexpresión
CCN-001	Ciclina D1	Regulación del ciclo celular, con frecuencia regulado al alza en muchos tipos de cáncer
CEA-004	Molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEA)	AAT confirmado del carcinoma colorrectal, adhesión celular, metástasis
MET-001	Protooncogén met	Proliferación, motilidad, adhesión, invasión
MUC-001	Mucina	AAT confirmado del carcinoma colorrectal, desenmascaramiento del epítipo debido a la glucosilación alterada en los tumores
NOX-001	NADPH oxidasa 1	Fuerte sobreexpresión, inhibición de la apoptosis
ODC-001	Ornitina descarboxilasa 1	Transformación, pro-angiogénico
PCN-001	Antígeno nuclear de la célula en proliferación	Proliferación (replicación del ADN)
TGFBI-001	Factor de crecimiento transformante beta	Remodelación tisular, angiogenia
TOP-001	ADN-topoisomerasa II	Proliferación (replicación del ADN)
<i>TUMAP de HLA-DR</i>		
CEA-006	Molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEA)	AAT confirmado del carcinoma colorrectal, adhesión celular, metástasis
MMP-001	Metalopeptidasa de la matriz 7 (matrisilina, uterina)	Remodelación tisular, inhibición de la apoptosis
TGFBI-004	Factor de crecimiento transformante beta	Remodelación tisular, angiogenia

3. Presentación de los epítipos contenidos en IMA910 en las muestras tumorales

10 Preparación

Las muestras de tejido extirpadas quirúrgicamente las facilitaron la Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, de Tubinga tras obtener el consentimiento informado por escrito de cada paciente.

Aislamiento de los péptidos HLA de las muestras de tejido

15 Las mezclas de péptidos HLA de las muestras de tejido criogenizadas se obtuvieron por inmunoprecipitación de tejidos sólidos según un protocolo ligeramente modificado (Falk, K. Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature

1991, 351, 290-296; Seeger, F.H. et al. The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. Immunogenetics 1999, 49, 571-576) con el anticuerpo específico de HLA-A*02 BB7.2, el anticuerpo específico de HLA-A, B y C W6/32, sefarsosa activada con CNBr, tratamiento con ácido y ultrafiltración.

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

5 Los epítomos contenidos en IMA910 se buscaron de manera sistemática en muestras de tumor colorrectal por medio de la espectrometría de masas. Las mezclas de péptidos HLA obtenidas se separaron en función de su hidrofobicidad con cromatografía de fase inversa (CapLC, Waters) y los péptidos eluidos se analizaron con un espectrómetro de masas en tándem híbrido con analizadores cuadrupolar y de tiempo de vuelo con aceleración ortogonal (Q-TOF Ultima, Waters) equipado con una fuente ESI. Las mezclas de péptidos se cargaron en una precolumna de C18 para proceder a la concentración y desalación. Una vez cargada, la precolumna se colocó en línea para la separación con una columna microcapilar de sílice fundido (75 µm de d.i. x 250 mm) rellena con material de fase invertida C18 de 5 µm (Dionex). El solvente A era acetato de amonio 4 mM/agua. El solvente B era acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo al 80%/agua. El pH de los dos solventes se ajustó a 3,0 con ácido fórmico. Se aplicó un gradiente binario del 15% al 60% de B en 90 minutos, con un caudal de 5 µl/min reducido aproximadamente a 200 nl/min por un sistema fraccionamiento. Para la introducción en la fuente micro-ESI se empleó un capilar de vidrio recubierto de oro (PicoTip, New Objective). El tiempo de integración del analizador TOF quedó ajustado en 1,9 s con una pausa entre barridos de 0,1 s. Para la detección de los péptidos definidos se efectuó un cribado de alta sensibilidad con este tipo de experimentos con CL-EM-ESI en función de las masas moleculares y los tiempos de retención conocidos de los péptidos en el sistema cromatográfico. Así pues, para la selección del precursor se aplicó una lista que contenía los valores m/z de los péptidos identificados previamente (carga sencilla y/o doble). A continuación se reveló la identidad de la secuencia mediante espectrometría de masas (CL-EM-ESI/EM) con disociación inducida por colisión (CID). La secuencia del TUMAP identificada se confirmó comparando el patrón de fragmentación generado por el TUMAP natural con el patrón de fragmentación de un péptido de referencia sintético de secuencia idéntica. La evaluación del rendimiento de la purificación del péptido HLA y de la reproducibilidad del sistema analítico, incluida la estabilidad del tiempo de retención se llevó a cabo usando la intensidad y el tiempo de retención de un péptido HLA-A*02 endógeno abundante (YLLPAIVHI derivado de DDX5) como patrón interno. Por consiguiente, el criterio de admisión de la muestra de cáncer colorrectal (CCR) para la detección de los TUMAP previamente identificados en dichos experimentos consistió en una intensidad mínima de 650 cuentas por barrido de la señal del patrón interno con carga doble (YLLPAIVHI) en el experimento de CL-EM/EM para asegurar el éxito en el aislamiento del péptido HLA y el rendimiento correcto del sistema analítico.

La Tabla 3 expone los resultados de un análisis de muestras de cáncer de colon y recto en diversos estadios así como de metástasis originadas a partir del tumor primario. En la mayoría de las muestras se hallaron todos los TUMAP HLA-A*02. Las frecuencias de redetección de los TUMAP HLA-DR son por lo general menores. Esto era previsible porque en el caso de los péptidos HLA de clase II pueden existir diversas variantes de longitud de la secuencia principal.

Tabla 3: Redetección de los TUMAP en muestras de cáncer colorrectal

Nº	Muestra de CCR	Masa de tumor (g)	Localización del tumor	Estado tumoral	TUMAP detectado (+) o no detectado (-) en el análisis por espectrometría de masas												
					clase I								clase II				
					MET-001	C20-001	TGFBI-001	TOP-001	NOX-001	PCN-001	ODC-001	CCN-001	MUC-001	CEA-004	CEA-006	MMP-001	TGFBI-004
1	CCA062	?	colon	I	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				-	-	-
2	CCA740	4,0	colon	II	-	+	+	+	+	+	+				n.a.	n.a.	n.a.
3	CCA165	10,8	colon	II	-	+	+	+	+	+	+				-	-	-
4	CCA712	1,2	colon	III	+	+	+	+	-	-	+				n.a.	n.a.	n.a.
5	CCA707	3,1	colon	III	-	+	+	+		+	+				n.a.	n.a.	n.a.
6	CCA718	3,4	colon	III	-	+	+	+	+	+	+	No factible	No factible	No factible	n.a.	n.a.	n.a.
7	CCA739	3,4	colon	III	-	+	+	+	+	+	+	No factible	No factible	No factible	n.a.	n.a.	n.a.
8	CCA166	5,3	colon	III	+	+	+	+	+	+	+				(+)	+	-
9	CCA734	18,1	colon	III	-	+	+	+	+	+	+				n.a.	n.a.	n.a.
10	CCA719	1,3	colon	IV	-	+	+	+	+	+	+				n.a.	n.a.	n.a.
11	CCA725	2,7	colon	IV	-	+	+	+	-	-	+				n.a.	n.a.	n.a.

(continuación)

					TUMAP detectado (+) o no detectado (-) en el análisis por espectrometría de masas												
					clase I								clase II				
Nº	Muestra de CCR	Masa de tumor (g)	Localización del tumor	Estadio tumoral	MET-001	C20-001	TGFBI-001	TOP-001	NOX-001	PCN-001	ODC-001	CCN-001	MUC-001	CEA-004	CEA-006	MMP-001	TGFBI-004
12	CCA164	5,0	colon	IV	+	+	+	-	-	-	+				-	-	-
13	CCA167	5,2	colon	IV	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				(+)	+	-
14	CCA056	1,8	colon	?	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				-		-
15	CCA305	4,0	colon	?	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				-		-
20	CCA708	3,2	metástasis de colon	IV	-	+	+	+	+	+	+				-		+
16	CCA160	3,6	recto	II	+	+	+	+	+	+	+				+	(+)	+
17	CCA754	3,6	recto	II	-	+	+	+	-	+	+				n.a.	n.a.	n.a.
18	CCA170	4,6	recto	III	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				(+)	-	+
19	CCA171	10,3	recto	IV	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.				-	+	
21	CCA724	4,8	metástasis de recto	IV	+	+	+	-	--	-	+				-	-	+
Porcentaje de detección en las muestras analizadas					33%	100%	100%	87%	67%	80%	100%	-	-	-	33%	42%	33%

n.a. no analizado

4. Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase I de IMA910

5 Para obtener información relativa a la inmunogenicidad de los péptidos incluidos en IMA910, llevamos a cabo análisis con una conocida plataforma de estimulación *in vitro* descrita por (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 171, 4974-4978). De este modo pudimos demostrar datos positivos de inmunogenicidad en todos los diez péptidos restringidos a HLA-A*0201 contenidos en IMA950, lo cual demuestra que son epítopos de linfocitos T contra los cuales existen linfocitos T precusores CD8+ en humanos. El único otro péptido HLA de clase I contenido en IMA910 (MUC-001) no pudo ser analizado con este método debido a la escasa afinidad relativa hacia A*0201 de este TUMAP.

15 Datos recientes ponen seriamente en duda la utilidad de CEA-005 como vacuna antitumoral. En un reciente estudio meticuloso (Iero, M, Squarcina, P, Romero, P, Guillaume, P, Scarselli, E, Cerino, R, Carrabba, M, Toutirais, O, Parmiani, G, Rivoltini, L; Low TCR avidity and lack of tumor cell recognition in CD8(+) T cells primed with the CEA-analogue CAP1-6D peptide, Cancer Immunol Immunother. 2007 Dec; 56(12): 1979-91) los autores caracterizaron por primera vez de forma sistemática las funciones efectoras de linfocitos T sensibilizados al CEA-005 contra el CEA-004 de secuencia nativa. En un gran número de muestras de sangre procedentes de pacientes con carcinoma colorrectal y de donantes sanos se observó que la sensibilización de los linfocitos T con CEA-005 fomentó de manera reiterada la generación de linfocitos T con baja afinidad incapaces de reconocer a las células de carcinoma colorrectal que expresaban el CEA en su secuencia nativa. Tal reconocimiento cruzado de las secuencias nativas que adolece de baja afinidad y resulta ineficaz podría suponer un problema general en los protocolos de vacunación basados en ligandos peptídicos alterados, tal y como corroboran resultados similares recientemente descritos sobre otro péptido del CEA y sus agonistas alterados (Alves, PM, Viatte, S, Fagerberg, T, Michielin, O, Bricard, G, Bouzourene, H, Vuilleumier, H, Kruger, T, Givel, JC, Levy, F, Speiser, DE, Cerottini, JC, Romero, P; Immunogenicity of the carcinoembryonic antigen derived peptide 694 in HLA-A2 healthy donors and colorectal carcinoma patients, Cancer Immunol. Immunother., 2007, 56, 1795-1805). Asimismo, se han descrito tales resultados con una secuencia nativa del conocido antígeno del melanoma Melan-A/MART-1 y su agonista (D. Speiser, comunicación personal).

30 En conjunto, a pesar de la inmunogenicidad generalmente potenciada que generan los péptidos agonistas alterados, datos recientes parecen apuntar a que los péptidos nativos serían mejores candidatos vacunales a causa del reconocimiento cruzado ineficiente de la secuencia nativa por parte de los linfocitos T estimulados con agonistas alterados. Esto apunta a que el CEA-004 (CAP1) podría ser preferible a sus agonistas descritos en W09919478A1, como CEA-005 (CAP1-6D) o CAP1-6D,7I.

De hecho, un gran volumen de datos demuestra la considerable inmunogenicidad en condiciones *in vivo* de la propia secuencia nativa del CEA-004. En varios estudios se han observado respuestas de linfocitos T generadas

espontáneamente contra este péptido en los pacientes con cáncer pero no así en los donantes sanos (Nagorsen, D, Keilholz, U, Rivoltini, L, Schmittel, A, Letsch, A, Asemissen, AM, Berger, G, Buhr, HJ, Thiel, E, Scheibenbogen, C; Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer, *Cancer Res.* 2000, 60, 4850-4854; Wehrauch, MR, Ansen, S, Jurkiewicz, E, Geisen, C, Xia, Z, Anderson, KS, Gracien, E, Schmidt, M, Wittig, B, Diehl, V, Wolf, J, Bohlen, H, Nadler, LM; Phase I/II combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer, *Clin Cancer Res.* 2005, 11, 5993-6001; Babatz, J, Rollig, C, Lobel, B, Folprecht, G, Haack, M, Gunther, H, Kohne, CH, Ehninger, G, Schmitz, M, Bornhauser, M; Induction of cellular immune responses against carcinoembryonic antigen in patients with metastatic tumors after vaccination with altered peptide ligand-loaded dendritic cells, *Cancer Immunol. Immunother.* 2006, 55, 268-276). Además, la aplicación de estrategias de vacunación a pacientes con carcinoma colorrectal basadas en el CEA-004 o en la proteína CEA ha generado una estimulación eficiente de respuestas de linfocitos T contra el CEA-004 (Tsang, KY, Zaremba, S, Nieroda, CA, Zhu, MZ, Hamilton, JM, Schlom, J; Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine, *J Natl. Cancer Inst.* 1995, 87, 982-990; Morse, MA, Deng, Y, Coleman, D, Hull, S, Kitreil-Fisher, E, Nair, S, Schlom, J, Ryback, ME, Lyerly, HK; A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-I)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen, *Clin Cancer Res.* 1999, 5, 1331-1338; Zhu, MZ, Marshall, J, Cole, D, Schlom, J, Tsang, KY; Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine, *Clin Cancer Res.* 2000, 6, 24-33; Wehrauch, MR, Ansen, S, Jurkiewicz, E, Geisen, C, Xia, Z, Anderson, KS, Gracien, E, Schmidt, M, Wittig, B, Diehl, V, Wolf, J, Bohlen, H, Nadler, LM; Phase I/II combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer, *Clin Cancer Res.* 2005, 11, 5993-6001).

25 Sensibilización *in vitro* de linfocitos T CD8+

Para llevar a cabo las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con un complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28, primero aislamos células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capas leucocíticas HLA-A*02+ frescas mediante de un medio de separación en gradiente de densidad ordinario (PAA, Cölbe, Alemania). Las capas leucocíticas procedían del banco de sangre de Tubinga y del Katharinenhospital de Stuttgart. Las PBMC aisladas se incubaron hasta el día siguiente con medio para linfocitos T (TCM) para la sensibilización humana *in vitro*. El medio consistía en RPMI-Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) suplementado con suero AB humano terminoactivado al 10% (PAA, Cölbe, Alemania), penicilina 100 U/ml/estreptomocina 100 µg/ml (Cambrex, Verviers, Bélgica), piruvato sódico 1 mM (CC Pro, Neustadt, Alemania) y gentamicina 20 µg/ml (Cambrex). Los linfocitos CD8+ se aislaron con un kit de selección positiva MACS para CD8+ (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD8+ obtenidos se incubaron hasta su uso en TCM suplementado con IL-7 2,5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania) e IL-2 10 U/ml (Chiron, Munich, Alemania). La fabricación de las microperlas recubiertas de pMHC/anti-CD28, las estimulaciones de los linfocitos T y las lecturas se llevaron a cabo del modo descrito por otros con pequeñas modificaciones (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Werner, D, Buhning, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; Cutting edge; predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, *J. Immunol.*, 2003, 171, 4974-4978). En suma, se sintetizaron moléculas recombinantes y biotiniladas de HLA-A*0201 desprovistas del dominio transmembrana y biotiniladas en el extremo carboxi de la cadena pesada según el método descrito por Altman et al. (Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Williams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science*, 1996, 274, 94-96). El anticuerpo coestimulador purificado Ab 9.3, una IgG2a de ratón anti-CD28 humana (Jung G, et al. Induction of cytotoxicity in resting human T lymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 4611-4615) se biotiniló químicamente con sulfo-N-hidroxisuccinimidobiotina siguiendo las recomendaciones del fabricante (Perbio, Bonn, Alemania). Las microperlas utilizadas consistían en partículas de poliestireno de 5,60 µm recubiertas de estreptavidina (Bangs Laboratories, Illinois, EE. UU.). Los complejos pMHC usados como controles positivo y negativo fueron A*0201/MLA-001 (péptido ELAGIGILTV de Melan-A modificado/MART-1) y A*0201/DDX5-001 (YLLPAIVHI de DDX5) o A*0201/HBV-001 (FLPSDFFPVS), respectivamente.

Se tapizaron placas de 96 pocillos con 800.000 microperlas/200 µl en presencia de 600 ng de anti-CD28 biotinilado más 200 ng del pMHC-biotina relevante (microperlas de alta densidad) o de 2 ng del relevante más 200 ng de MHC irrelevante (biblioteca de pMHC) (microperlas de baja densidad). Las estimulaciones se iniciaron en placas de 96 pocillos en las que se incubaron simultáneamente 1×10^6 linfocitos T CD8+ con 2×10^5 microperlas recubiertas y lavadas en 200 µl de TCM suplementado con IL-12 5 ng/ml (PromoCell) durante 3-4 días a 37 °C. La mitad del medio se renovó con TCM fresco suplementado con IL-2 80 U/ml y la incubación continuó otros 3-4 días a 37 °C. Este ciclo de estimulación se efectuó en total tres veces. Por último, se llevaron a cabo análisis tetraméricos de los tetrámeros MHC fluorescentes (producidos del modo descrito por Altman, JD, Moss, PA, Goulder, PJ, Barouch, DH, Heyzer-Williams, MG, Bell, JI, McMichael, AJ, and Davis, MM; Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, *Science*, 1996, 274, 94-96) más anticuerpo CD8-FITC del clon SK1 (BD, Heidelberg, Alemania) en un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD). Las células específicas de péptido se calcularon en forma de porcentaje respecto

al total de linfocitos T CD8+. La evaluación del análisis tetramérico se hizo con el programa FCS Express (De Novo Software). La sensibilización *in vitro* de los linfocitos CD8+ tetrámero+ específicos se detectó aplicando el acotamiento de subpoblaciones (*gating*) adecuado y comparando los resultados con las estimulaciones del control negativo. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba confirmada si por lo menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una estirpe de linfocitos T CD8+ específica después tras la estimulación (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetrámero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetrámero+ específicas era al menos 10x de la mediana de las estimulaciones del control negativo).

Inmunogenicidad in vitro de los diez péptidos de IMA910

En el caso de los diez péptidos de HLA de clase I analizados, la inmunogenicidad *in vitro* se puede demostrar con la generación de líneas de linfocitos T específicos de péptido. En la Figura 1 se expone una tinción representativa que muestra la generación de estirpes de linfocitos T específicas para NOX-001 y ODC-001. Los resultados se resumen en la tabla 4. El único otro péptido de HLA de clase I contenido en IMA910 (MUC-001) no se pudo analizar con este método debido a la relativa baja afinidad hacia A*0201 de este TUMAP, lo cual hace metodológicamente imposible llevar a cabo estimulaciones *in vitro* con monómeros pMHC.

Tabla 4: Inmunogenicidad de diez péptidos de HLA de clase I incluidos en IMA910

Antígeno	Donantes positivos / donantes analizados	Pocillos positivos / pocillos analizados
IMA-HBV-001	7/16(44%)	10/107 (9%)
IMA-TGFBI-001	3/4 (75%)	4/22 (18%)
IMA-NOX-001	3/5 (60%)	9/60 (15%)
IMA-PCN-001	3/4 (75%)	4/42 (10%)
IMA-TOP-001	2/5 (40%)	7/72 (10%)
IMA-C20-001	1/5 (20%)	1/60 (2%)
IMA-ODC-001	1/5 (20%)	1/60 (2%)
IMA-HBV-001	2/5 (40%)	10/54 (19%)
IMA-CEA-004	4/4 (100%)	50/60 (83%)
IMA-CCN-001	5/5 (100%)	42/54 (78%)
IMA-MET-001	4/6 (67%)	30/72 (42%)

Aquí se resumen los resultados de los experimentos de inmunogenicidad *in vitro* llevados a cabo por Immatics con diez de los once péptidos de HLA de clase I contenidos en IMA910. Los resultados han sido obtenidos con la estimulación de linfocitos CD8+ con microperlas de alta densidad. La variabilidad de los lotes de suero humano puede influir mucho en los resultados de las pruebas de inmunogenicidad, por lo que solo se evaluaron los ensayos en que se usó un único lote de suero.

Linfocitos T sensibilizados en condiciones in vitro con IMA-CEA-004

Fueron evaluables 4 de 6 donantes. En los cuatro donantes se pudo demostrar la inducción de una respuesta de linfocitos T dirigidos contra el CEA-004 en condiciones *in vitro* tras la estimulación con dicho péptido (véase la Tabla y la Figura). Así pues, el péptido CEA-004 demostró ser un potente inductor de respuestas de linfocitos T CD8+ en condiciones *in vitro*. Resulta destacable que el CEA-004 fuera capaz, de manera reiterada, de desencadenar altas frecuencias de respuesta de linfocitos T específicos contra él en comparación con el CEA-005 (83% de los pocillos frente al 64% de los pocillos en este último caso, véase la Tabla 4). Las frecuencias de los linfocitos específicos hacia el CEA-004 contenidos en cada uno de los pocillos positivos también resultaron mayores tras la sensibilización frente a dicho péptido que tras la sensibilización con el CEA-005 (véase la Figura 5).

*Respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de péptido en condiciones in vitro en 4 donantes sanos HLA-A*02 determinada por análisis con citometría de flujo*

Los linfocitos T CD8+ se sensibilizaron con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con CEA-004, CEA-005 o un péptido irrelevante (IMA-RSL-001). Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que

reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción doble con multímeros CEA-004 más CEA-005 (Tabla 5A) y con CEA-004 más el tetrámero A*0201 irrelevante (Tabla 5B). Las cifras indicadas en la tabla representan los porcentajes de pocillos que contenían CTL que eran CEA-004+ o CEA-005+. En todos los experimentos se usó el mismo lote de suero humano: C02104-0167.

5

Tabla 5A

Estímulo antigénico	Pocillos con linfocitos CEA-004+ tetrámero+
CEA-004	50/60 (83%)
CEA-005	19/72 (26%)

Tabla 5B

Estímulo antigénico	Pocillos con linfocitos CEA-004+ tetrámero+
CEA-004	50/60 (83%)
CEA-005	46/72 (64%)

10 Los linfocitos T CD8+ se aislaron a partir de las PBMC, se sensibilizaron *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales cargadas con CEA-004, RSL-001 o péptido DDX5-001. Al cabo de tres ciclos de estimulación, las células que reaccionaron al péptido se detectaron mediante la tinción con tetrámeros de CEA-004 más el tetrámero irrelevante A*0201. Los valores antes indicados representan los porcentajes de linfocitos específicos de CEA-004 en cada pocillo estimulado. Las estimulaciones con RSL-001 y DDX5-001 sirvieron como controles negativos. La Figura 5 muestra las frecuencias de los linfocitos T CD8+ específicos de CEA-004 en 4 donantes sanos HLA-A2 tras la estimulación *in vitro* con CEA-005, determinadas mediante análisis por citometría de flujo. Los valores límite para los pocillos positivos aparecen indicadas para cada donante por separado (—) y se definen como 15 10 veces la mediana de los controles negativos y al menos el 1%. Los pocillos cuyos valores porcentuales superaron el límite ($\geq 1\%$) se consideraron positivos y aparecen representados con rombos de color rosa, mientras que los pocillos negativos se muestran con rombos de color negro.

20 5. Inmunogenicidad *in vitro* de los péptidos presentados por MHC de clase II contenidos en IMA910

Los linfocitos T cooperadores prestan una importante función de apoyo a los CTL para activar y mantener la respuesta inmunitaria contra las células tumorales. Por tanto, en la vacuna IMA910 se incluyeron péptidos MHC de clase II. El TGFBI-004, uno de los tres péptidos de clase II presentes en IMA910, fue analizado para determinar su potencial inmunogénico *in vitro* y demostró ser un inductor de linfocitos T específicos tanto CD4+ como CD8+. La generación de linfocitos T CD4+ y CD8+ funcionales ha sido demostrada en experimentos con estimulaciones en un sistema autólogo.

Principio de la prueba

En condiciones *in vitro* se analizó la sensibilización y la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+ humanos específicos mediante la sensibilización de PBMC carentes de monocitos con células dendríticas autólogas y la reestimulación con PBMC autólogos. En resumen, para generar los linfocitos T CD4+ específicos de antígeno se estimularon PBMC desprovistas de monocitos procedentes de un donante sano (genotipo HLA de clase I: A1/A25/B8/B18 y clase II: DQB1*02/DQB1*06/DRB1*03/DRB1*15/DRB3/DRB5) con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido y se reestimularon con PBMC autólogos más péptido. Como sistema de lectura se evaluó la producción de IFN- γ con ELISPOT y citometría de flujo tras la reestimulación de corta duración. Tras ocho estimulaciones los linfocitos T fueron analizados con ELISPOT y tinción intracelular del IFN- γ más CD4-FITC y CD8-PerCP para determinar el porcentaje de células productoras de dicho interferón en las diversas subpoblaciones de linfocitos T. Como control negativo del experimento se usaron células estimuladas con el péptido TGFBI-004 recolectadas de pocillos distintos, agrupadas e incubadas con el péptido irrelevante.

Generación de células dendríticas (CD)

40 Las células dendríticas (CD) humanas se obtuvieron de monocitos cultivados en medio para CD consistente en RPMI 1640-Glutamax/25mM Hepes (Invitrogen, Alemania) complementado con plasma autólogo al 10%/penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 μ g/ml. En primer lugar, de la sangre de un donante sano (Banco de sangre de Tubinga) se extrajeron la capa leucotífica y el plasma por centrifugación. A continuación se aislaron las PBMC de la capa leucocítica mediante separación en gradiente de densidad convencional (Lymphocyte Separation Medium,

PAA, Austria) y se resuspendió con medio de CD para contabilizar el número total de células. Se lavaron entre 100 y 120 millones de PBMC y después se resuspendieron con 15 ml de medio X-Vivo 20 (BioWhittaker, Bélgica) y se transfirieron a un frasco de cultivo celular. Dos horas después de permanecer a 37°C, se extrajeron los medios con los leucocitos de sangre periférica (PBL), los monocitos adherentes se separaron lavando dos veces con 10 ml de PBS y se cultivaron durante 6 días en 10 ml de medio para CD con GM-CSF 100 ng/ml e IL-4 30 ng/ml (ImmunoTools, Alemania) o 20 ng/ml (R&D systems, Alemania). El tercer y quinto día se añadieron GM-CSF 100 ng/ml e IL-4 30 ng/ml (ImmunoTools) o IL-4 20 ng/ml (R&D Systems, Alemania). El día séptimo se activaron las CD inmaduras con TNF-alfa 10 ng/ml (R&D Systems, Alemania) y poli(IC) 20 µg/ml (Sigma Aldrich, Alemania) o LPS 100 ng/ml durante 24 horas. Las PBMC restantes y los PBL obtenidos se fraccionaron en alícuotas y se congelaron.

10 Sensibilización *in vitro* de linfocitos T específicos

Para generar linfocitos T CD4+ se procedió a estimular 3 millones de PBMC/PBL con 2×10^5 células dendríticas (CD) autólogas. Las células dendríticas se recolectaron el día 8 (véase el apartado 3.1, Generación de las CD). Con el fin de recolectar la mayor cantidad posible de células, incluidas las adherentes, se empleó PBS con EDTA 5 mM. Después de lavarlas con medio para CD se procedió al recuento. Para la carga con el péptido, las células dendríticas se resuspendieron en 1 ml de medio para CD y se incubaron con péptido 25 µg/ml durante 2 horas a 37 °C. Los péptidos usados para la sensibilización reiterada de las CD fueron: TGFBI-004, Posmix (mezcla de péptidos del EBV y de CMV), Padre y CMV. Las PBMC/PBL autólogas se descongelaron, se lavaron con medio para CD (al menos dos veces) y se sembraron en una placa de 24 pocillos con una densidad de 3 millones de céls./ml en 1 ml. Acto seguido las células dendríticas cargadas con el péptido (en forma de 1 ml de suspensión portadora del péptido) se añadieron a las PBMC/PBL sembradas y se incubaron durante 7 días a 37 °C. Tras la sensibilización, los CTL obtenidos volvieron a ser estimulados con PBMC autólogos cargados con el péptido que habían permanecido crioconservados y habían sido irradiados (30 Gy; Gammacell 1000 Elite, Nordion International, Canadá). Con tal fin, en cada pocillo se depositaron 5×10^5 CTL y $2,5 \times 10^6$ PBMC. La sensibilización repetida de los PBMC con el péptido se efectuó del mismo modo que con las células dendríticas. El día posterior a la primera reestimulación, se añadió IL-2 (R&D Systems, Alemania) a una concentración final de 2 ng/ml así como IL-7 a razón de 5 ng/ml. En adelante, se siguió añadiendo al medio de cultivo IL-2 cada dos días e IL-7 cada siete. La segunda reestimulación se efectuó 7 días después, pero esta vez a los CTL cultivados se les añadió el péptido solo, sin PBMC. Las sucesivas reestimulaciones se efectuaron en ciclos de 7 días, añadiendo alternativamente los PBMC cargados con el péptido y el péptido solo. Los análisis se llevaron a cabo tras la octava estimulación mediante tinción intracelular del IFN-γ y ELISPOT de IFN-γ.

Resultados

Se pudieron sensibilizar estirpes de linfocitos T CD4+ para que reaccionaran de forma específica ante el péptido de interés (Figura 2 y Figura 3). Con ELISPOT se detectó respuesta de los linfocitos T en dos de las cuatro estirpes analizadas, mientras que con la tinción intracelular de citocinas se detectaron linfocitos CD4+ y/o CD8+ que producían IFN-γ específicamente ante el TGFBI-004 en tres de las cuatro estirpes.

Por tanto, el TGFBI-004 fue capaz de desencadenar respuestas por parte de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en un donante analizado con el citado sistema experimental. De acuerdo con este resultado alentador, es probable que dicho péptido sea inmunogénico y capaz de inducir respuestas por parte de los linfocitos T.

6. Validación funcional ejemplificada por NOX-001 y TGFBI-001

La inmunogenicidad de los péptidos incluidos en la vacuna IMA910 quedó demostrada en condiciones *in vitro* con la plataforma de validación de TUMAP de Immatics. La inducción de los linfocitos T específicos constituye un indicador de la capacidad de los péptidos para activar el sistema inmunitario. Puesto que la respuesta inmunitaria antitumoral solo es eficiente si los linfocitos T activados hacen gala de una elevada afinidad y plena funcionalidad, se investigó la capacidad de los TUMAP para sensibilizarlos con esa afinidad y funcionalidad analizando su capacidad para producir IFN-γ o destruir células de diversas estirpes tumorales. Para la validación en profundidad se escogieron dos péptidos, NOX-001 y TGFBI-001, en virtud de sus capacidad para inducir CTL dotados de gran afinidad en condiciones *in vitro*. Los resultados demuestran que existen linfocitos T precursores con gran afinidad contra ambos péptidos y que NOX-001 permite generar estirpes de linfocitos T CD8+ funcionales.

Principio de la prueba

Para ahondar en la inmunogenicidad de los péptidos de IMA910 y en las propiedades de los linfocitos T específicos, se seleccionaron dos péptidos para proseguir la evaluación: NOX-001 y TGFBI-001.

Los experimentos en cuestión se efectuaron en Immatics (la selección de las células se llevó a cabo en la Universidad de Tubinga, en el laboratorio del Dr. Bühring).

Según su capacidad para ser activadas por antígenos de alta o baja densidad, las estirpes de linfocitos T se pueden dividir en linfocitos de alta y baja afinidad. Como se ha demostrado antes (Walter, S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Bühring, HJ, Rammensee, HG, and Stevanovic, S; Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J. Immunol., 2003, 171, 4974-4978), se pueden

generar CTL humanos de gran afinidad usando menos péptido para la activación que en el caso de los linfocitos T CD8+ de baja afinidad. También se ha demostrado que las células expandidas de esa forma son más eficaces a la hora de reconocer las estirpes de células tumorales que expresan el antígeno, por lo que podrían constituir una herramienta importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

- 5 A fin de determinar la capacidad de los péptidos para generar estirpes de CTL de alta afinidad, los linfocitos CD8+ humanos aislados se sensibilizaron y expandieron mediante repetidas estimulaciones *in vitro* con perlas recubiertas de pMHC en baja densidad (complejo péptido-MHC) y anticuerpo anti-CD28 en presencia de IL-12 e IL-2. Al cabo de tres estimulaciones, una parte de los linfocitos T sensibilizados *in vitro* se sometió a tinción con tetrámeros de pMHC y a análisis en un citómetro. Los linfocitos tetrámero-positivos de cada donante se agruparon después según la
- 10 especificidad antigénica, se tiñeron con pMHC-tetrámero y el anticuerpo humano anti-CD8-FITC y, por último, se sometieron a la selección por FACS en un citómetro FACSAria. Las células seleccionadas se cultivaron y expandieron en presencia de células nodriza irradiadas, citocinas y mitógeno. Para averiguar si se generaban linfocitos específicos de antígeno con alta afinidad sensibilizados, se procedió a la tinción con tetrámeros de pMHC. Y para determinar su funcionalidad se analizó la producción de IFN- γ con ELISPOT y se examinó la destrucción de
- 15 estirpes de células tumorales con un ensayo de citotoxicidad con tinción vital después de reestimar a las células con el péptido correspondiente y las pertinentes estirpes tumorales.

Generación de estirpes de linfocitos T CD8+ específicos

- Las estimulaciones *in vitro* con células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) cargadas con complejo péptido-MHC (pMHC) y anticuerpo anti-CD28 se hicieron del modo antes descrito. La única diferencia respecto al método
- 20 anterior es que se realizaron con perlas cargadas con 2 ng de una peptidoteca (pMHC)MHC relevante más 200 ng de una irrelevante (perlas de baja densidad) en lugar de con 200 ng de MHC relevante (perlas de alta densidad). De ese modo se generaron mayoritariamente linfocitos T con alta afinidad para la validación en profundidad de los péptidos. Al cabo de tres estimulaciones, una fracción de los linfocitos T sensibilizados *in vitro* se sometió a la tinción con tetrámeros de pMHC y a análisis por citometría. La inmunogenicidad para un antígeno dado quedaba
- 25 confirmada si por lo menos un pocillo estimulado *in vitro* y evaluable de un donante sano contenía una estirpe de linfocitos T CD8+ específica después tras la estimulación (esto es, el pocillo contenía al menos un 1% de tetrámero+ específico entre los linfocitos T CD8+ y el porcentaje de células tetrámero+ específicas era al menos 10 veces la mediana de las estimulaciones del control negativo). Las células tetrámero-positivas de cada donante se agruparon después según la especificidad hacia el antígeno, se tiñeron con el correspondiente tetrámero de pMHC y anticuerpo
- 30 anti-CD8-FITC humano clon SK1 y, por último, se sometieron a cribado FACS en un citómetro FACSAria (BD Biosciences, Alemania). Las células seleccionadas se cultivaron en medio para linfocitos T (RPMI-Glutamax complementado con suero AB humano termoinactivado al 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μ g/ml, piruvato sódico 1 mM y gentamicina 20 μ g/ml) en presencia de 5×10^5 céls./ml de PBMC alogénicas recién extraídas e irradiadas, 5×10^4 céls./ml de células LG2-EBV irradiadas, IL-2 150 U/ml (Chiron, Munich, Alemania) y PHA-L 0,5 μ g/ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La expansión de dichas células tuvo lugar en medio para linfocitos
- 35 T con IL-2 150 U/ml. Para averiguar si se generaban linfocitos específicos de antígeno con alta afinidad sensibilizados se efectuó la tinción con tetrámeros de pMHC del modo indicado antes y se analizaron en un citómetro de cuatro colores FACSCalibur (BD Biosciences, Alemania).

Pruebas de funcionalidad

- 40 A fin de determinar su funcionalidad se evaluó la producción de IFN- γ con ELISPOT (IFN γ ELISPOT Set, BD, Alemania) tras la reestimulación de las células con el péptido correspondiente. Además, se investigó la citotoxicidad celular de los CTL específicos en la destrucción de estirpes tumorales con el Kit de citotoxicidad celular LIVE/DEAD ((L7010, Invitrogen, Alemania). Ambos ensayos se llevaron a cabo conforme a las instrucciones del fabricante, si no se indica otra cosa.

45 *Resultados*

Ambos péptidos, NOX-001 y TGFBI-001, fueron inmunogénicos *in vitro* tal y como demuestra la sensibilización lograda mediante las células aAPC con baja densidad de pMHC. Tanto con NOX-001 como con TGFBI-001 se detectaron estirpes de linfocitos T específicos en la citometría FACS, lo que demuestra la existencia de linfocitos T CD8+ precursores de alta afinidad en los donantes sanos.

- 50 Además, en el caso de NOX-001, se descubrió una estirpe de linfocitos T que demostró su funcionalidad en ELISPOT, puesto que expresó de forma específica el IFN- γ tras la reestimulación con este péptido (Fig. 4).

7. Unión de los péptidos restringidos a HLA de clase I dados a conocer al HLA-A*0201

- 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 IMA910.
- 55 Las afinidades hacia HLA-A*0201 fueron elevadas en nueve de los 10 péptidos restringidos a HLA de clase I contenidos en IMA910, con constantes de disociación (K_D) en el intervalo de 0,001 a 0,2 nM. También el péptido marcador vírico IMA-BHV-001 mostró una unión intensa. La afinidad hacia IMA-MUC-001 resultó veinte veces más débil. Estos resultados confirman la fuerte afinidad de unión de nueve de los 10 péptidos HLA de clase I del

candidato a vacuna IMA910 a las moléculas del MHC.

Principio de la prueba

- 5 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-Hvid et al., 2002).
- 10 Moléculas recombinantes y purificadas de HLA-A*0201 se incubaron con b2m y dosis escalonadas del péptido de interés. La cantidad de complejos de HLA plegados *de novo*/péptido se determinó con un ELISA cuantitativo. Las constantes de disociación (valores K_D) se calcularon con una curva patrón trazada con disoluciones de un complejo HLA/péptido de calibración.

Resultados

- 15 Los resultados se muestran en la Figura 6. Cuanto más bajo es el valor de K_D mayor es la afinidad hacia el HLA-A*0201. La mayoría de los péptidos de IMA910 y el péptido vírico de control IMA-HBV-001 presentaron afinidades potentes y similares hacia HLA-A*0201 situadas en el intervalo de 0,001 (IMA-TGFBI-001) a 0,2 mM (IMA-ODC-001). La afinidad de IMA-MUC-001 resultó entre veinte y treinta veces inferior en comparación con la mayoría de los ligandos incluidos. Pese a ello, en un ensayo clínico previo de Immatix la vacunación con IMA-MUC-001 generó respuestas inmunitarias en pacientes con carcinoma de células renales, por lo que la menor afinidad de unión del mismo no es motivo de preocupación.
- 20

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> immatics biotechnologies GmbH
- <120> Composición de péptidos asociados al tumor y vacuna antitumoral relacionada
- <130> FB22541/A
- 30 <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.4
- 35 <210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*
- 40 <400> 1
- Ala Leu Ser Asn Leu Glu Val Thr Leu**
1 5
- 45 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*
- <400> 2
- Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile**
1 5
- 50 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*
- 55 <400> 3

```

                Ile Leu Asp Gln Lys Ile Asn Glu Val
                1                5

5  <210> 4
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> homo sapiens

   <400> 4

                Lys Leu Met Asp Leu Asp Val Glu Gln Leu
                1                5                10

10 <210> 5
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> homo sapiens

15 <400> 5

                Ala Leu Phe Val Arg Leu Leu Ala Leu Ala
                1                5                10

20 <210> 6
    <211> 10
    <212> PRT
    <213> homo sapiens

25 <400> 6

                Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala
                1                5                10

30 <210> 7
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> homo sapiens

35 <400> 7

                Thr Pro Pro Ile Asp Ala His Thr Arg Asn Leu Leu Arg Asn His
                1                5                10                15

40 <210> 8
    <211> 16
    <212> PRT
    <213> homo sapiens

45 <400> 8

                Ser Pro Gln Tyr Ser Trp Arg Ile Asn Gly Ile Pro Gln Gln His Thr
                1                5                10                15

50 <210> 9
    <211> 9
    <212> PRT
    <213> homo sapiens

    <400> 9

```

ES 2 608 583 T3

Leu Leu Gly Ala Thr Cys Met Phe Val
1 5

5 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

10 <400> 10

Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val
1 5

15 <210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 11

Ser Gln Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Lys Leu Tyr Gly Lys Arg Ser

20 1 5 10 15
<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

25 <400> 12

Tyr Leu Ser Gly Ala Asp Leu Asn Leu
1 5

30 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

<400> 13

Tyr Val Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile
1 5

35 <210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> *homo sapiens*

40 <400> 14

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

45

REIVINDICACIONES

1. Péptido consistente en la secuencia de SEQ ID N.º 8 (SPQYSWRINGIPQQHT).
2. El péptido conforme a la reivindicación 1, dotado de la capacidad de unión a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase II.
- 5 3. El péptido conforme a la reivindicación 1 o 2, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.
4. El péptido conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, que comprende los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (II) asociada al antígeno HLA-DR.
5. Ácido nucleico, que codifica un péptido conforme con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 10 6. El ácido nucleico conforme a la reivindicación 5, que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, o un vector de expresión, en que dicho vector está ligado funcionalmente a dicho ácido nucleico.
7. Péptido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en combinación con dos o más péptidos seleccionados entre las SEQ ID N.º 1 a 7 para el uso como medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 15 8. El péptido para el uso conforme a la reivindicación 7, en que dicho cáncer consiste en glioblastoma, cáncer colorrectal, pancreático, pulmonar, renal o gástrico.
9. El péptido para el uso conforme a la reivindicación 7 u 8, en que dicho medicamento es una vacuna.

Figura 1

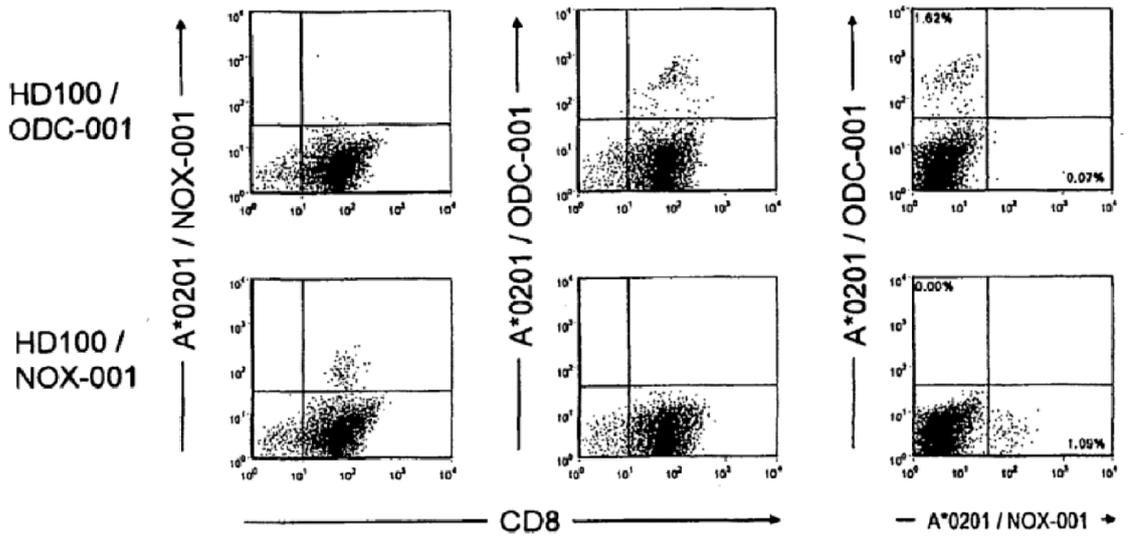


Figura 2

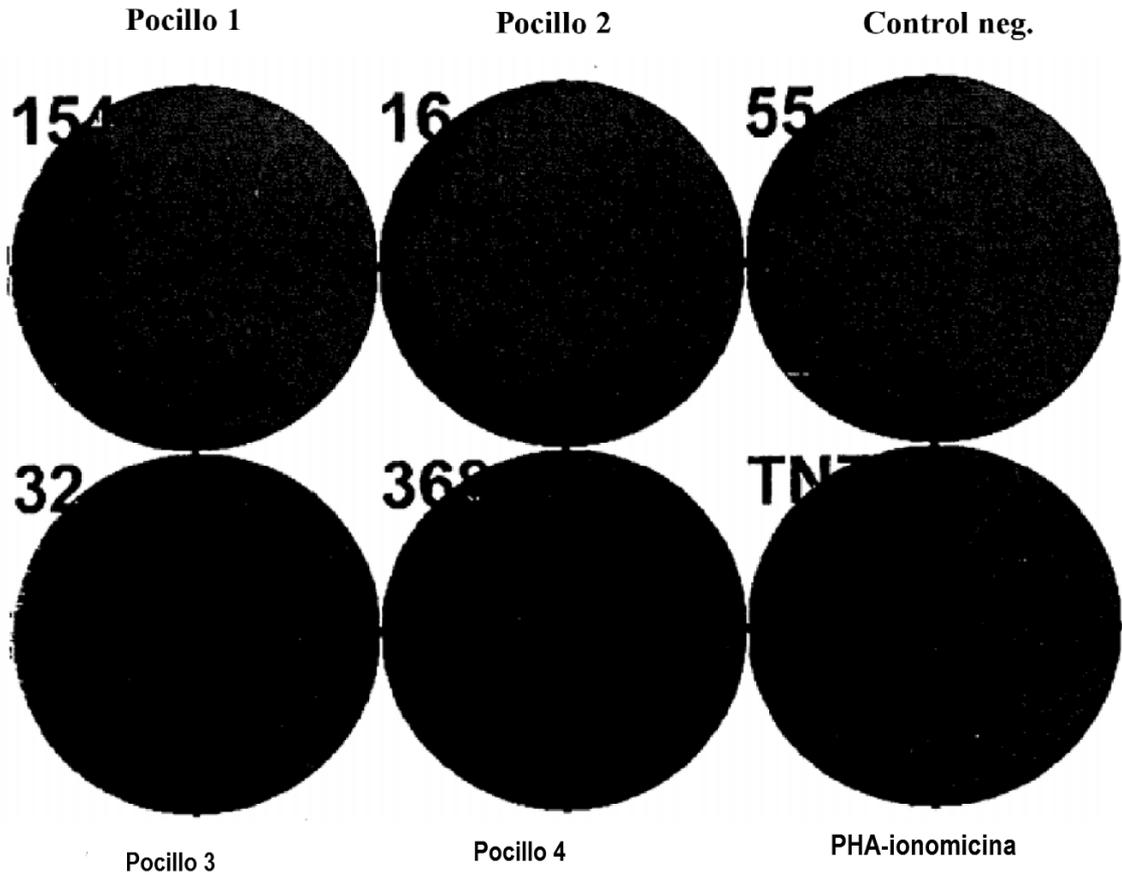


Figura 3

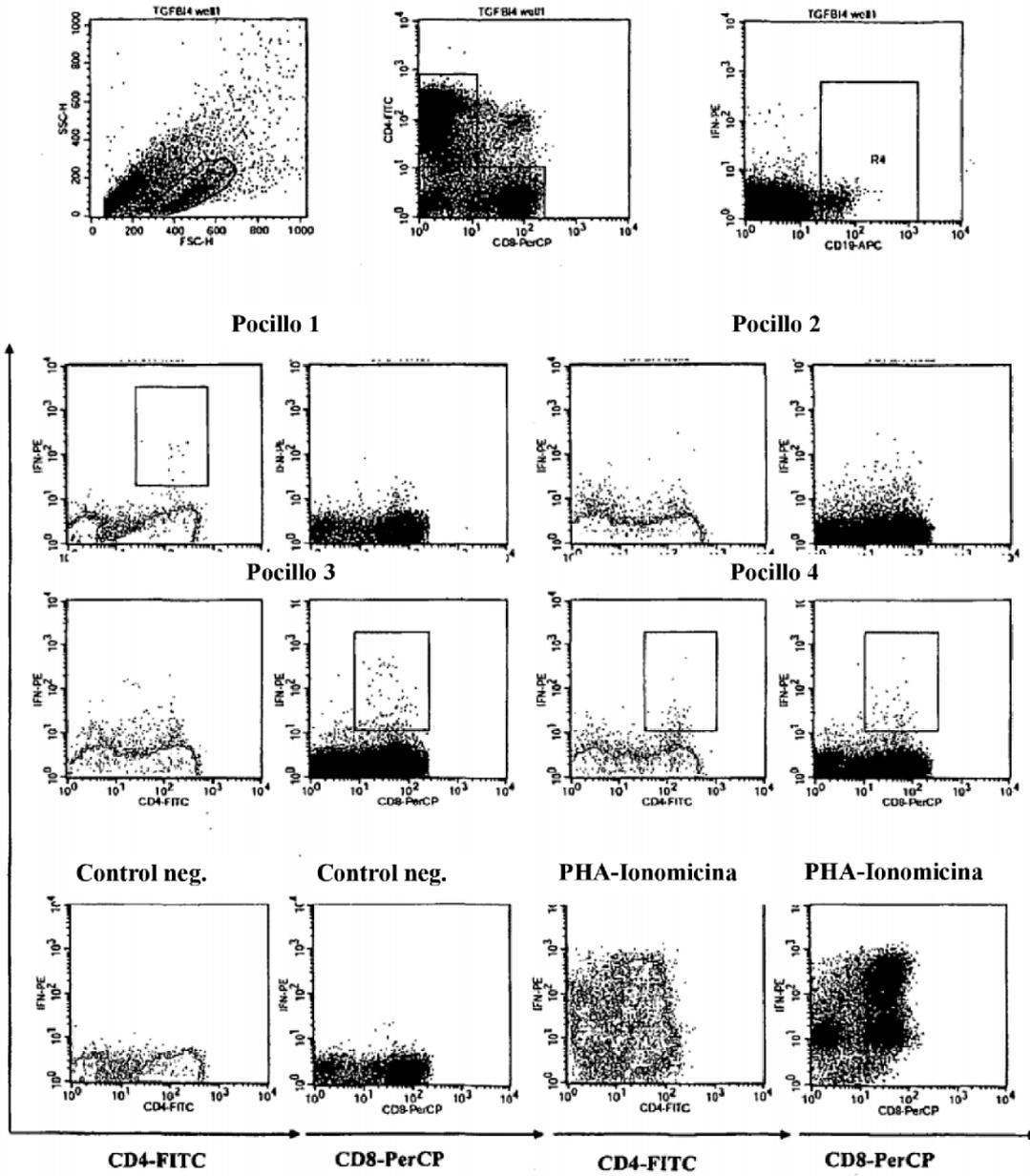


Figura 4

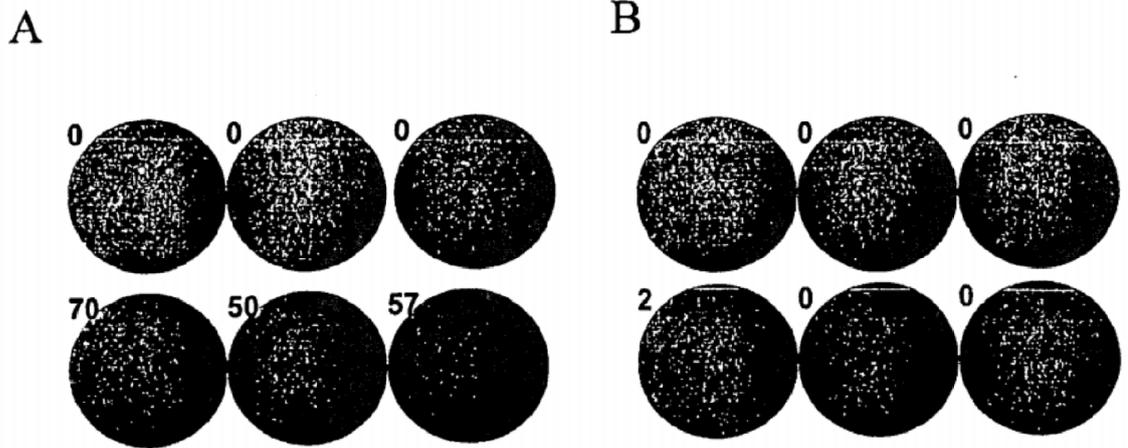


Figura 5

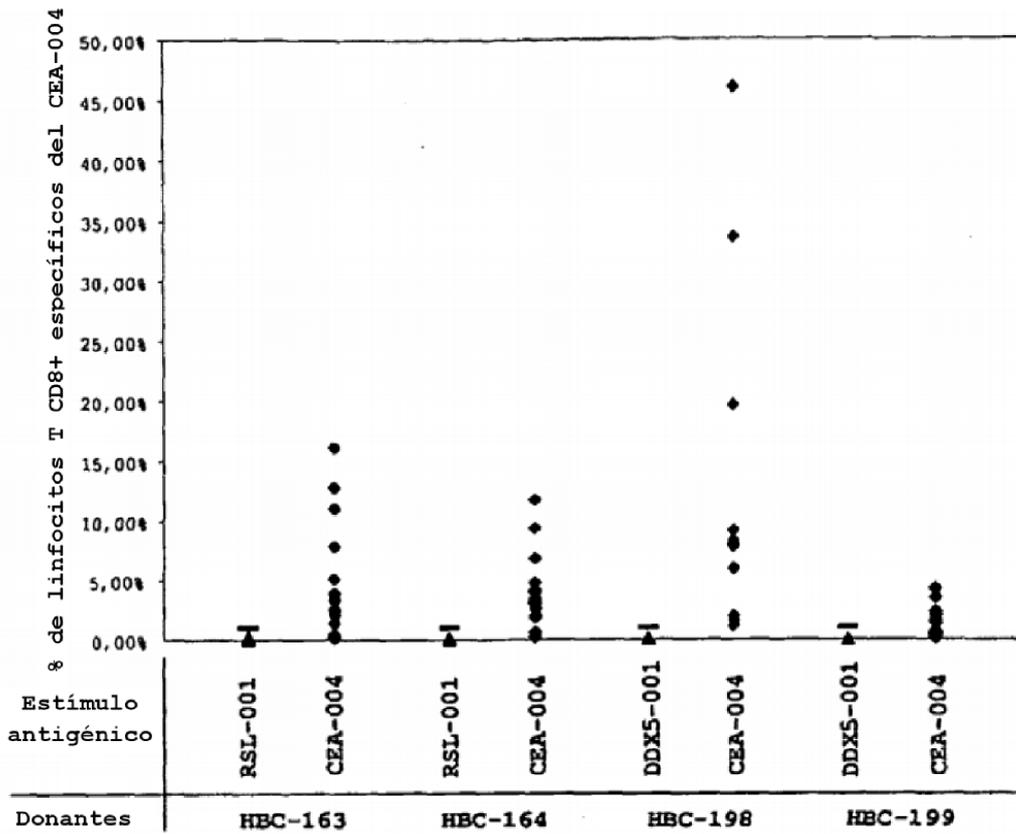


Figura 6

