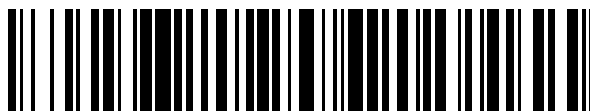


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 882**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 13150813 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2626081**

54 Título: **Control inmunogénico de tumores y células tumorales**

30 Prioridad:

**14.02.2008 EP 08447011**

**12.03.2008 US 35856 P**

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

**31.07.2017**

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW (50.0%)**

**Herestraat 49, bus 913**

**3000 Leuven, BE y**

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAINT-REMY, JEAN-MARIE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

ES 2 627 882 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

Control inmunogénico de tumores y células tumorales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos y a su uso en (inmuno)terapias para la erradicación de tumores y de células tumorales y para la prevención de recidivas tumorales.

10 **Antecedentes de la invención**

Muchos tumores expresan antígenos que pueden servir como diana o terapia. Dichos antígenos pueden dividirse en general en:

- 15 - oncogenes, tales como el MAGE identificado en ciertos melanomas;  
 - protooncogenes, tales como la ciclina D1 expresada en carcinomas de tejido blando, tales como los del riñón o paratiroides, así como en mieloma múltiple;  
 - proteínas que proceden de virus, tales como las procedentes del virus de Epstein-Barr en algunos carcinomas y en algunos tipos de linfomas de tipo Hodgkin;  
 20 - factores de supervivencia, que son factores antiapoptóticos tales como survivina o bcl2; y  
 - determinantes clonotípicos, tales como determinantes idiotípicos que proceden del receptor células B en linfomas foliculares o mielomas múltiples o determinantes del receptor de células T en neoplasias de células T.

El reconocimiento específico de dichos antígenos, expresado exclusiva o predominantemente en las células tumorales, ofrece el potencial de eliminar selectivamente dichas células. La inmunización activa con antígenos o derivados asociados a tumores, o la transferencia adoptiva de células expandidas *in vitro* con dichos antígenos asociados a tumores podría, en teoría, ser de interés para la terapia de tumores. En los últimos años, se han publicado muchos intentos para suscitar la eliminación específica de tumores mediante inmunoterapia específica. Estos incluían la inmunización activa con, por ejemplo, péptidos que proceden de idiotipos, así como la transferencia adoptiva de células T expandidas *in vitro* mediante la exposición a células tumorales. A pesar de que eran muy prometedores, estos enfoques terapéuticos tenían un éxito limitado y/o se asociaron a un alto índice de recidiva. Además, la capacidad de las células T para someterse a la expansión *in vitro* sigue siendo limitada, con mucha pérdida de las células efectoras por la apoptosis inducida por sobreestimulación. Esencialmente, todo el trabajo llevado a cabo en el campo de la inmunoterapia de tumores durante los últimos 15 años se ha dedicado a métodos para suscitar células T CD8+ citolíticas capaces de reconocer y producir la lisis de las células tumorales en una presentación dependiente del MHC de clase I de un antígeno que procede de un tumor. La posibilidad de diseñar inmunoterapia eficaz a través de la presentación del MHC de clase II de péptidos que proceden de un tumor y de células T CD4+ no se ha explorado hasta hace poco (Pérez-Díez *et al.* (2007), Blood 109, 5346-5354). Esto se atribuye a varios factores, entre los que se incluyen, la creencia generalizada de que la mayoría de los tumores no expresan determinantes del MHC de clase II y que la función de las células T CD4+ no las predispone a ser fuertes células antitumorales. La opinión clásica es que las células T CD4+ pueden ayudar a proporcionar ayuda a las células B para producir anticuerpos específicos y que la producción de IFN-gamma por las células T CD4+ Th1 podría reducir la angiogénesis. Más recientemente, se ha descrito la necesidad de disponer de células T CD4+ como fuente de IL-2 para ayudar a las células T CD8+ a adquirir maduración completa.

45 Höhn *et al.* (1999) J. Immunol. 163, 5715-5722, desvelan péptidos a partir de antígenos del papilomavirus humano con un motivo C-X(2)-C en el lado C-terminal del péptido. Los documentos US7157089 y WO200200892 desvelan proteínas de fusión en las que en la secuencia fusionada al antígeno aparece un motivo redox y en las que un epítipo que aparece en el compañero de fusión al antígeno y dicho motivo redox están separados entre sí.

50 Wang *et al.* (2006) Semin. Cancer Biol. 16, 73-79 describen Tregs específicas del antígeno tumoral que expresan marcadores tales como CD25, GITR y Foxp3 que normalmente se asocian a células Tregs CD4+ CD25+ de origen natural.

55 En Voo (2005) Cancer Res. 65, 1577-1586, se desvela un péptido que conduce a una población de células que expresa Foxp3 y que ejerce su actividad produciendo factores solubles activos a través de un sistema Transwell. El documento WO02095051 desvela péptidos de MAGE humano que comprenden una cisteína en un motivo DxxC o CxxF.

60 Savoldo *et al.* (2002) J. Immunol. 15, 909-918, desvelan métodos para generar células T CD4+ citotóxicas específicas del VEB (virus de Epstein-Barr), utilizando una variedad de diferentes antígenos víricos que conduce a una población de células heterogéneas. Dobrzanski M. (2013) Front. Oncol. 3, 1-19 desarrolla los mecanismos por los que las células T CD4+ pueden eliminar tumores.

65 Corthay *et al.* (2007) Adv Exp Med Biol. 590, 195-208 describen la activación de macrófagos que rodean a los tumores, los resultados de la inflamación y la producción de interferón-gamma y TNF-alfa.

A pesar de los grandes avances en el campo del tratamiento del cáncer, la inmunoterapia de los tumores sigue siendo un campo joven. La posible selectividad de dicha inmunoterapia, sin duda cuando se dirige a antígenos específicos de tumor, es una ventaja importante y puede eliminar los efectos secundarios que en ocasiones son graves y que se observan, por ejemplo, en la quimioterapia. Por lo tanto, sería bienvenida cualquier nueva estrategia para el tratamiento inmunoterapéutico del cáncer.

### Sumario de la invención

La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención se refiere en un aspecto al uso de al menos un péptido inmunogénico aislado con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende i) un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor de un tumor y ii) un motivo redox C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C en el que X es un aminoácido, dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor o para prevenir o tratar una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor.

En otras realizaciones del péptido inmunogénico con el uso anterior, dicho motivo C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C no se produce de manera natural en el interior de una región de 11 aminoácidos N-terminal o C-terminal del epítipo de células T en el antígeno asociado a un tumor. En realizaciones particulares, dicho motivo C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C está situado en el N-terminal del epítipo de células T. Así mismo, en particular, al menos una X en dicho motivo es Gly, Ala, Ser o Thr; De manera adicional o como alternativa, al menos una X en el motivo C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C es His o Pro. En una memoria descriptiva adicional, al menos una C en el motivo C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C está metilada.

En otras realizaciones más, el péptido inmunogénico comprende además una secuencia de direccionamiento a endosoma. Cualquiera de los péptidos inmunogénicos anteriores puede producirse mediante síntesis química o expresión recombinante.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos *in vitro* para obtener una población de células T CD4<sup>+</sup> que son específicamente citotóxicas contra CPA (células presentadoras de antígeno) que presentan un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor, comprendiendo dichos métodos las etapas de:

- proporcionar células de la sangre periférica;
- poner en contacto dichas células, con un péptido inmunogénico que tiene una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende i) un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno vírico asociado a un tumor y ii) un motivo redox C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C en el que X es un aminoácido y en el que dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos; y
- expandir dichas células en presencia de IL-2.

Las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> que son específicamente citotóxicas contra CPA que presentan un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor, obtenidas mediante los métodos *in vitro* anteriores, también forman parte de la invención, así como su uso para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor o para tratar o prevenir una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor.

Otro aspecto de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados que tienen una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor y un motivo redox [CST]-(X)<sub>2</sub>-C o C-(X)<sub>2</sub>-[CST], en el que X es un aminoácido, y en los que dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos, en los que dicho antígeno vírico asociado a un tumor no comprende un motivo [CST]-(X)<sub>2</sub>-C o C-(X)<sub>2</sub>-[CST] dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en el N-terminal o C-terminal de dicha secuencia de epítipo; más particularmente, el antígeno vírico asociado a un tumor no comprende un motivo [CST]-(X)<sub>2</sub>-C o C-(X)<sub>2</sub>-[CST] en su secuencia.

Otro aspecto de la invención se refiere a métodos para producir un péptido inmunogénico aislado de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende las etapas de:

- a) identificar un epítipo de células T restringido al MHC de clase II en una secuencia de proteínas del antígeno vírico asociado a un tumor, y
- b) producir un péptido con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende dicho epítipo de células T identificado y una secuencia con un motivo redox C-(X)<sub>2</sub>-C, [CST]-(X)<sub>2</sub>-C o C-(X)<sub>2</sub>-[CST], en el que X es un

aminoácido, por lo que el motivo redox es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos.

### Descripción detallada de la invención

5 La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes.

#### Definiciones

10 El término "**péptido**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula que comprende una secuencia de aminoácidos de entre 2 y 200 aminoácidos, conectados mediante enlaces peptídicos, pero que en una realización particular puede comprender estructuras no aminoacídicas (como, por ejemplo, un compuesto orgánico conector. Los péptidos según la invención pueden contener cualquiera de los 20 aminoácidos convencionales o versiones modificadas de los mismos, o pueden contener aminoácidos producidos de manera artificial incorporados mediante síntesis peptídica química o mediante modificación química o enzimática.

15 El término "**epítipo**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una o a varias partes (que pueden definir un epítipo conformacional) de una proteína o factor que se reconoce(n) específicamente y se une(n) mediante un anticuerpo o una parte del mismo (Fab', Fab2', etc.) o un receptor presentado en la superficie celular de un linfocito B o T, y que es capaz, mediante dicha unión, de inducir una respuesta inmunitaria.

20 El término "**antígeno**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a una estructura de una macromolécula que comprende uno o más haptenos y/o que comprende epítipos de células T. Normalmente, dicha macromolécula es una proteína o un péptido (con o sin polisacáridos) o está fabricada con una composición proteica y que comprende uno o más epítipos; como alternativa dicha macromolécula puede denominarse en el presente documento "**proteína antigénica**" o "**péptido antigénico**".

25 El término "**antígeno asociado a un tumor**" se refiere a cualquier proteína, péptido o antígeno asociado a (portado por, producido por, secretado por, etc.) un tumor o una o más células tumorales. Los antígenos asociados a tumor pueden estar (casi) exclusivamente asociados a un tumor o a una o más células tumorales y no a células normales, sanas, o puede sobreexpresarse (por ejemplo, 10 veces, 100 veces, 1000 veces o más) en un tumor o en una o más células tumorales en comparación con las células normales, sanas. Más particularmente, un antígeno asociado a un tumor es un antígeno capaz de presentarse (en forma procesada) a través de determinantes de MHC de la células tumorales. Por lo tanto, es probable que los tumores asociados a antígenos estén asociados solo a tumores o a células tumorales que expresan moléculas de MHC.

30 La expresión "**epítipo de células T**" en el contexto de la presente invención, se refiere a un epítipo de células T dominante, subdominante o menor, es decir, una parte de una proteína o factor antigénico reconocido y unido específicamente por un receptor en la superficie celular de un linfocito T. Si un epítipo es dominante, subdominante o menor depende de la reacción inmunitaria suscitada contra el epítipo. La dominancia depende de la frecuencia a la que dichos epítipos son reconocidos por las células T y capaces de activarlos, entre todos los posibles epítipos de células T de una proteína. En particular, un epítipo de células T es un epítipo unido por moléculas del MHC de clase I o del MHC de clase II.

35 El término "**MHC**" se refiere a un "antígeno mayor de histocompatibilidad". En los seres humanos, los genes de MHC se conocen como genes de HLA ("antígeno leucocitario humano"). A pesar de que no existe una convención seguida regularmente, alguna bibliografía utiliza HLA para referirse a las moléculas de proteína de HLA, y MHC para referirse a los genes que codifican las proteínas de HLA. Como tales, los términos "MHC" y "HLA" son equivalentes cuando se utilizan en el presente documento. El sistema de HLA en el ser humano tiene su equivalente en los ratones, es decir, el sistema H2. Los genes de HLA que más se han estudiado son los nueve genes de MHC denominados clásicos: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA 1, HLA-DPB1, HLA-DQA 1, HLADQB1, HLA-DRA y HLA-DRB1. En los seres humanos, el MHC está dividido en tres regiones: clase I, II y III. Los genes A, B y C pertenecen al MHC de clase I, mientras que los seis genes D pertenecen al de la clase II. Las moléculas del MHC de clase I están formadas por una sola cadena polimórfica que contiene 3 dominios (alfa 1, 2 y 3), que se asocia a la microglobulina beta 2 en la superficie celular. Las moléculas de clase II están formadas por 2 cadenas polimórficas, conteniendo cada una de ellas 2 cadenas (alfa 1 y 2 y beta 1 y 2).

40 Las moléculas del MHC de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas. Los fragmentos peptídicos presentados en el contexto de las moléculas del MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos o CTL). Los linfocitos T CD8+ maduran frecuentemente en los efectores citotóxicos que pueden producir la lisis de las células portadoras del antígeno estimulante. Las moléculas del MHC de clase II se expresan principalmente en linfocitos activados y en células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T CD4+ (los linfocitos T auxiliares o HTL) se activan con el reconocimiento de un fragmento peptídico único presentado por una molécula de MHC de clase II, que normalmente se encuentra en una célula presentadora de antígeno como un macrófago o una célula dendrítica. Los linfocitos T CD4+ proliferan y secretan citocinas que, o soportan una respuesta mediada por anticuerpos a través de la producción de IL-4 e IL-10, o soportan una respuesta mediada por

células a través de la producción de IL-2 e IFN-gamma.

Los HLA funcionales se caracterizan por un surco de unión profundo al que se unen péptidos endógenos, así como exógenos, posiblemente antigénicos. El surco se caracteriza además por una forma bien definida y por propiedades físico-químicas. Los sitios de unión del HLA de clase I están cerrados ya que los extremos terminales peptídicos están inmovilizados en los extremos del surco. Estos están involucrados además en una red de enlaces de hidrógeno con restos de HLA conservados. En vista de estas restricciones, la longitud de los péptidos unidos se limita a 8-10 restos. Sin embargo, se ha demostrado que los péptidos de hasta 12 restos de aminoácido también son capaces de unir el HLA de clase I. La superposición de las estructuras de los diferentes complejos de HLA confirmó un modo de unión general en el que los péptidos adoptaban una conformación relativamente lineal, extendida.

En comparación con los sitios de unión del HLA de clase I, los sitios de la clase II están abiertos en ambos extremos. Esto permite que los péptidos se extiendan desde la región de unión real, "colgando" de este modo en ambos extremos. Por lo tanto, los HLA de clase II pueden unir ligandos peptídicos de longitud variable, que oscila de 9 a más de 25 restos de aminoácido. Similar al HLA de clase I, la afinidad de un ligando de clase II está determinada por un componente "constante" y uno "variable". La parte constante de nuevo resulta de una red de enlaces de hidrógeno formada entre restos conservados en el surco del HLA de clase II y la cadena principal de un péptido unido. Sin embargo, este patrón de unión al hidrógeno no se limita a los restos del extremo N-terminal y C-terminal del péptido, sino que se distribuye por toda la cadena. Esto último es importante ya que restringe la conformación de péptidos en complejo a un modo de unión estrictamente lineal. Esto es habitual para todos los alotipos de clase II. El segundo componente que determina la afinidad de unión de un péptido es variable debido a determinadas posiciones de polimorfismo en los sitios de unión de la clase II. Diferentes alotipos forman diferentes bolsillos complementarios en el surco, representando de este modo la selección de péptidos, o especificidad, dependiente de subtipos. Cabe destacar que, las limitaciones de los restos de aminoácido contenidos dentro de los bolsillos de clase II están, en general, "más atenuadas" que las de la clase I. Existe mucha más reactividad cruzada de péptidos entre los diferentes alotipos del HLA de clase II. La secuencia de los +/- 9 aminoácidos de un epítipo de células T del MHC de clase II que encaja en el surco de la molécula de MHC II normalmente se numera de P1 a P9. El N-terminal de aminoácidos adicional del epítipo se numera como P-1, P-2 y así sucesivamente, el C-terminal de aminoácidos del epítipo se numera como P+ 1, P+ 2 y así sucesivamente.

La expresión "**compuesto orgánico que tiene una actividad reductora**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos, más en particular, a secuencias de aminoácidos, capaces de reducir los enlaces de disulfuro en las proteínas. Un término utilizado alternativamente es el "motivo redox".

La expresión "**cantidad terapéuticamente eficaz**" se refiere a una cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que produce el efecto terapéutico o preventivo deseado en un paciente. Por ejemplo, haciendo referencia a una enfermedad o trastorno, es la cantidad que reduce hasta cierto grado uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, y más particularmente hace que vuelvan a ser normales, parcial o completamente, los parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados a, o causantes de, la enfermedad o trastorno. Según una realización particular de la presente invención, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad del péptido de la invención o derivado del mismo, que conducirá a una mejora o restablecimiento de la situación fisiológica normal. Por ejemplo, cuando se utiliza para tratar terapéuticamente a un mamífero afectado por un trastorno inmunitario, es una cantidad diaria de péptido/kg de peso corporal de dicho mamífero. Como alternativa, cuando la administración se realiza a través de genoterapia, la cantidad de ADN desnudo o de vectores víricos se ajusta para garantizar la producción local de la dosis relevante del péptido de la invención, derivado u homólogo del mismo.

El término "**natural**", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere al hecho de que una secuencia es idéntica a una secuencia de origen natural o que es idéntica a parte de dicha secuencia de origen natural. A diferencia de esto, el término "**artificial**" se refiere a una secuencia que, como tal, no se produce en la naturaleza. A no ser que se especifique lo contrario, los términos natural y artificial se refieren exclusivamente a una secuencia de aminoácidos (o de nucleótidos) particular (por ejemplo, la secuencia del péptido inmunogénico, una secuencia comprendida dentro del péptido inmunogénico, una secuencia de epítipo) y no se refiere a la naturaleza del péptido inmunogénico como tal. Opcionalmente, una secuencia artificial se obtiene a partir de una secuencia natural a través de modificaciones limitadas, tales como cambiar uno o más aminoácidos dentro de la secuencia de origen natural o añadir extremos N-terminales o C-terminales de aminoácidos de una secuencia de origen natural. En el presente documento, los aminoácidos se denominan con su nombre completo, con su abreviatura de tres letras o con su abreviatura de una letra.

Los motivos de las secuencias de aminoácidos están escritos en el presente documento según el formato Prosite (Hulo *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res.* 34 (publicación en la base de datos 0227-0230). El símbolo X se utiliza para una posición donde se acepta cualquier aminoácido. Las alternativas se indican enumerando los aminoácidos aceptables para una posición determinada, entre corchetes ('[ ]'). Por ejemplo: [CST] representa un aminoácido seleccionado de Cys, Ser o Thr. Los aminoácidos que están excluidos como alternativas se indican enumerándolos entre llaves ('{ }'). Por ejemplo: {AM} significa cualquier aminoácido excepto Ala y Met. Los distintos elementos de un motivo están separados entre sí mediante un guion -. La repetición de un mismo elemento dentro de un motivo puede indicarse colocando detrás de ese elemento un valor numérico o un intervalo numérico entre paréntesis. Por

ejemplo: X(2) corresponde a X-X, X(2,4) corresponde a X-X o X-X-X o X-XX- X, A(3) corresponde a A-A-A.

El término "**homólogo**", cuando se utiliza en el presente documento haciendo referencia a los epítomos utilizados en el contexto de la invención, se refiere a moléculas que tienen al menos un 50 %, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95 % o al menos un 98 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el epítomo de origen natural, manteniendo de este modo la capacidad del epítomo para unirse a un anticuerpo o a un receptor de la superficie celular de una célula B y/o T. Las realizaciones particulares de los homólogos de un epítomo corresponden al epítomo natural modificado en como mucho tres, más particularmente en como mucho dos, más particularmente en un aminoácido.

El término "**derivado**", cuando se utiliza en el presente documento haciendo referencia a los péptidos de la invención, se refiere a moléculas que contienen al menos la parte activa del péptido (es decir, capaz de suscitar la actividad de las células T CD4+ citotóxicas) y, además de lo mismo, comprende una parte complementaria que puede tener fines diferentes, tales como establecer los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

La expresión "**identidad de secuencia**" de dos secuencias, cuando se utiliza en el presente documento, se refiere al número de posiciones con nucleótidos o aminoácidos idénticos dividido entre el número de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia más corta, cuando las dos secuencias están alineadas. En realizaciones particulares, dicha identidad de secuencia es del 70 % al 80 %, del 81 % al 85 %, del 86% al 90%, del 91 % al 95%, del 96 % al 100 %, o del 100 %.

Cuando en el presente documento se utilizan las expresiones "**polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica un péptido**" y "**péptido codificado por un polinucleótido (o ácido nucleico)**", estas se refieren a una secuencia de nucleótidos, que, cuando se expresa en un medio apropiado, produce la generación de la secuencia peptídica relevante o de un derivado u homólogo de la misma. Dichos polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen las secuencias normales que codifican el péptido, así como derivados y fragmentos de estos ácidos nucleicos capaces de expresar un péptido con la actividad necesaria. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico que codifica los péptidos según la invención, o fragmentos de los mismos, es una secuencia que codifica el péptido o fragmento del mismo que se origina de un mamífero o que corresponde a un mamífero, más particularmente un fragmento peptídico humano.

La presente invención proporciona estrategias para la inmunoterapia de tumores o de una o más células tumorales) o recidivas tumorales utilizando compuestos que comprenden un epítomo de células T que procede de un antígeno asociado a un tumor al que se fija un motivo con actividad tiorreductasa (o brevemente: motivo redox). Estos compuestos suscitan las células T CD4+ específicas del antígeno asociado a un tumor con una gran capacidad para inducir la apoptosis de las células tumorales. Estas células T CD4+ citotóxicas pueden suscitarse *in vivo* por inmunización activa con estos compuestos o pueden expandirse *in vitro (ex vivo)* para la transferencia adoptiva en hospedadores portadores de tumor.

Se desvelan péptidos inmunogénicos aislados para su uso en el tratamiento de un tumor o para la prevención de una recidiva tumoral en un paciente. Más particularmente, se desvela el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende i) un epítomo de células T que procede de un antígeno asociado a un tumor y ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor o para prevenir o tratar una recidiva tumoral.

También se divulga el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende i) un epítomo de células T que procede de un antígeno asociado a un tumor y ii) un motivo C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para la fabricación de un medicamento para inducir células T reguladoras CD4+ que son citotóxicas a las células que presentan dicho antígeno asociado a un tumor. Las realizaciones particulares de los mismos enumeradas en las reivindicaciones forman parte de la invención.

En cualquiera de los usos descritos anteriormente, el sujeto o receptor que recibe dicho péptido inmunogénico, es un mamífero, en particular, un primate (no humano) o un ser humano.

En cualquiera de los usos anteriores un antígeno asociado a un tumor puede seleccionarse de oncogenes, protooncogenes, proteínas víricas, factores de supervivencia o determinantes clonotípicos/idiotípicos. Dichos antígenos se conocen y se aceptan en la técnica. Los primeros oncogenes asociados a tumores se describieron para los melanomas. Se mostró que los productos de MAGE (acrónimo de *melanoma-associated gene*, gen asociado a melanoma) se expresaban espontáneamente en las células tumorales en el contexto de determinantes del MHC de clase I, y como tales, eran reconocidos por las células T CDS+ citotóxicas. Sin embargo, los antígenos que proceden del MAGE, tales como MAGE-3, también se expresan en determinantes del MHC de clase II y células T específicas de CD4+ se han clonado de pacientes con melanoma (Schutz *et al.* (2000) Cancer Research 60: 6272-6275; Schuler-Thurner *et al.* (2002) J. Exp. Med. 195: 1279-1288). En la técnica se conocen los péptidos presentados por los determinantes del MHC de clase II. Entre otros ejemplos se incluyen, el antígeno gp100 expresado por el mastocitoma P815 y por células de melanoma (Lapointe (2001) J. Immunol. 167: 4758-4764; Cochlovius *et al.* (1999)

Int. J. Cancer, 83: 547-554).

5 Los protooncogenes incluyen diversos polipéptidos y proteínas que se expresan preferentemente en células tumorales, y solo mínimamente en tejidos sanos. La ciclina D1 es un regulador del ciclo celular que está implicado en la transición de G1 a S. Se ha demostrado alta expresión de la ciclina D1 en carcinoma de células renales, en carcinomas paratiroides y en múltiples mielomas. Se ha mostrado que un péptido que incluye los restos 198 a 212 porta un epítipo de células T reconocido en el contexto de determinantes del MHC de clase II (Dengiel *et al.* (2004) Eur. J. of Immunol. 34: 3644-3651).

10 La survivina es un ejemplo de un factor que inhibe la apoptosis, confiriendo de este modo una ventaja de expansión a las células que expresan survivina. La survivina se expresa de forma anómala en cánceres humanos de origen epitelial y hematopoyético y no se expresa en tejidos adultos sanos, exceptuando el timo, los testículos y la placenta, y en progenitores hematopoyéticos estimulados por la hormona del crecimiento y en células endoteliales. Cabe destacar que, las células T CD8+ específicas de survivina son detectables en la sangre de pacientes con melanoma.  
15 La survivina se expresa en una amplia variedad de líneas celulares neoplásicas, incluyendo carcinoma renal, cáncer de mama y mieloma múltiple, pero también en leucemia mieloide aguda y en leucemia linfocítica aguda y crónica (Schmidt (2003) Blood 102: 571-576). Otros ejemplos de inhibidores de la apoptosis son Bcl2 y spi6.

20 Los determinantes idiotípicos se presentan por las células B en linfomas foliculares, mieloma múltiple y algunas formas de leucemia, y por los linfomas de células T y algunas leucemias de células T. Los determinantes idiotípicos son parte del receptor específico de antígeno de ya sea el receptor de células B (BCR) o del receptor de células T (TCR). Dichos determinantes están básicamente codificados por regiones hipervariables del receptor, que corresponden a regiones determinantes de la complementariedad (CDR, acrónimo de *complementarity-determining regions*) de ya sea las regiones VH o VL de las células B, o de la CDR3 de la cadena beta de las células T. Ya que  
25 los receptores se crean por la redistribución aleatoria de genes, estos son únicos en cada individuo. Los péptidos que proceden de determinantes idiotípicos se presentan en determinantes del MHC de clase I (Baskar *et al.* (2004) J. Clin. Invest. 113: 1498-1510). Algunos tumores están asociados a la expresión de antígenos procedentes de virus. Por lo tanto, algunas formas de la enfermedad de Hodgkin expresan antígenos del virus de Epstein-Barr (VEB). Dichos antígenos se expresan en los determinantes de ambas clases I y II. Las células T CDS+ citotóxicas  
30 específicas de antígenos de VEB pueden eliminar células del linfoma de Hodgkin (Bollard *et al.* (2004) J. Exp. Med. 200: 1623-1633). Los determinantes antigénicos tales como LMP-1 y LMP-2 se presentan por determinantes del MHC de clase II.

35 Un requisito mínimo para activar las células T CD4+ citotóxicas es reconocer un epítipo afín procedente de antígeno asociado a tumor, presentado por los determinantes del MHC de clase II, lo que conduce a la apoptosis de la CPA. Es probable que la expresión de los determinantes del MHC de clase II por las células tumorales sea mucho más frecuente de lo que se creía anteriormente. Por lo tanto, células neoplásicas que proceden de los linajes hematopoyéticos y células que proceden de progenitores endoteliales o epiteliales que expresan determinantes de  
40 clase II. Además, la expresión de dichos determinantes puede inducirse debido a afecciones inflamatorias que suelen prevalecer en los tumores, como resultado de la producción de citocinas, tales como IFN-gamma o TNF-alfa, por las células hospedadoras.

45 Puede haber situaciones en las que exista más de un antígeno asociado a un tumor en un tumor o célula tumoral determinados. Por lo tanto, se espera que pueda utilizarse la combinación de dos o más péptidos inmunogénicos para el tratamiento de un tumor o para el tratamiento o prevención de una recidiva tumoral.

En cualquiera de los usos y métodos descritos anteriormente, el uno o más péptidos inmunogénicos pueden sustituirse por células T reguladoras (Tregs) CD4+ sensibilizadas con el péptido o péptidos inmunogénicos, (es decir, transferencia celular adoptiva), o pueden sustituirse por una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido o los  
50 péptidos inmunogénicos (por ejemplo, en forma de ADN desnudo o vector vírico a administrar a un individuo, en lugar del péptido inmunogénico). En particular, puede contemplarse tanto la inmunización activa con los péptidos inmunogénicos, como la transferencia adoptiva de células Treg expandidas *in vitro* para antígenos que están asociados a tumores y no a células normales, concretamente a oncogenes tales como MAGE, determinantes idiotípicos y, posiblemente, algunas proteínas de virus. Para antígenos asociados a tumor que se sobreexpresan en  
55 tumores, pero que también están presentes en células sanas, la opción preferida puede ser la transferencia adoptiva de células. Es factible además dirigir las células tumorales mediante terapia génica, de modo que se exprese un péptido inmunogénico determinado según la invención, solo en las células tumorales. En dicho contexto, como punto de partida para diseñar un péptido inmunogénico según la invención puede utilizarse cualquier antígeno tumoral. Además, puede utilizarse una combinación de múltiples péptidos inmunogénicos, es decir, más de 1 (por ejemplo, 2,  
60 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), en las aplicaciones descritas anteriormente. Estos aspectos de la invención, así como la modificación adicional de los péptidos inmunogénicos, se describen con detalle a continuación.

La presente invención se basa en el hallazgo de que un péptido inmunogénico, que comprende un epítipo de  
65 células T que procede de un antígeno asociado a un tumor y una secuencia peptídica, que tiene una actividad reductora, es capaz de generar una población de células T reguladoras CD4+, que tienen un efecto citotóxico sobre células presentadoras de antígeno asociadas a tumor.

- En consecuencia, se proporcionan péptidos inmunogénicos, que comprenden al menos un epítipo de células T de un antígeno asociado a un tumor con un potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, acoplado a un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora, tal como un motivo de secuencia tiorreductasa. El epítipo de células T y el compuesto orgánico se separan opcionalmente mediante una secuencia enlazadora. En otras realizaciones opcionales, el péptido inmunogénico comprende adicionalmente una secuencia de direccionamiento a endosoma (por ejemplo, una secuencia de direccionamiento a endosoma tardío) y/o secuencias "flanqueantes" adicionales.
- Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden representarse esquemáticamente como A-L-B o B-L-A, donde A representa un epítipo de células T de un antígeno (autoantígeno o no autoantígeno) con un potencial para desencadenar una reacción inmunitaria, L representa un enlazador y B representa un compuesto orgánico que tiene una actividad reductora.
- Puede evaluarse la actividad reductora de un compuesto orgánico para determinar su capacidad para reducir un grupo sulfhidrilo, tal como en el ensayo de solubilidad de la insulina conocido en la técnica, en el que la solubilidad de la insulina se altera con la reducción, o con una insulina marcada con fluorescencia. El compuesto orgánico reductor puede acoplarse en el lado amino-terminal del epítipo de células T o en el extremo carboxidel epítipo de células T.
- Generalmente, el compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en tiorreductasa que son pequeñas enzimas reductoras de disulfuro que incluyen glutarredoxinas, nucleorredoxinas, tiorredoxinas y otras oxidorreductasas de tiol/disulfuro. Estas ejercen actividad reductora de los enlaces de disulfuro en las proteínas (tales como enzimas) a través de cisteínas activas redox dentro de secuencias consenso conservadas del dominio activo:: C- X(2)-C, C-X(2)-S, C-X(2)-T, S-X(2)-C, T-X(2)-C (Fomenko *et al.* (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225), donde X significa cualquier aminoácido. Dichos dominios también se encuentran en proteínas más grandes, tales como la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol.
- En consecuencia, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos según la presente invención comprenden, como motivo redox, el motivo de secuencia de tiorreductasa [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C], en una realización adicional a la misma, el motivo está situado en el N-terminal del epítipo de células T. En la presente solicitud, dicho tetrapéptido se denominará "el motivo". En realizaciones particulares, los péptidos de la invención contienen el motivo de secuencia [C]-X(2)-[CS] o [CS]-X(2)[C]. En realizaciones más particulares, los péptidos contienen el motivo de secuencia C-X(2)-S, S-X(2)-C o C-X(2)-C.
- Tal y como se explicará con detalle más adelante, los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden fabricarse por síntesis química, lo que permite la incorporación de aminoácidos artificiales. En consecuencia, en el motivo de compuestos reductores según realizaciones particulares de la presente invención, la C representa, o bien cisteína, o bien otros aminoácidos con un grupo tiol, tales como mercaptovalina, homocisteína u otros aminoácidos naturales o no naturales con una función tiol. Para tener actividad reductora, las cisteínas presentes en el motivo no deberían aparecer como parte de un puente disulfuro de cisteína. Sin embargo, el motivo puede comprender cisteínas modificadas, tales como una cisteína metilada, que se convierte en cisteína con grupos tiol libres *in vivo*.
- En realizaciones particulares de la invención, cualquiera de los aminoácidos X en el motivo [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C] de los péptidos inmunogénicos de la invención puede ser un aminoácido natural, incluyendo S, C o T, o puede ser un aminoácido no natural. En realizaciones particulares, X es un aminoácido con una pequeña cadena lateral, tal como Gly, Ala, Ser o Thr. En otras realizaciones particulares, X no es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, tal como Tyr. En otras realizaciones particulares, al menos una X en el motivo [C]-X(2)-[CST] o [CST]-X(2)-[C] es His o Pro.
- En los péptidos inmunogénicos de la presente invención que comprenden el motivo redox descrito anteriormente, el motivo está situado de modo que, cuando el epítipo encaja en el surco de MHC, el motivo permanece fuera del surco de unión al MHC. El motivo se coloca, ya sea inmediatamente adyacente a la secuencia del epítipo dentro del péptido, o está separado del epítipo de células T mediante un enlazador. Más particularmente, el enlazador comprende una secuencia de aminoácidos de 7 o menos aminoácidos. Más particularmente, el enlazador comprende 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Como alternativa, un enlazador puede comprender 6, 8 o 10 aminoácidos. Los aminoácidos habituales utilizados en los enlazadores son serina y treonina. Son ejemplos de péptidos con enlazadores según la presente invención CXXC-G-epítipo (SEQ ID NO:9), CXXC-GG-epítipo (SEQ ID NO:10), CXXC-SSS-epítipo (SEQ ID NO:11), CXXC-SGSG-epítipo (SEQ ID NO:12) y similares.
- En aquellas realizaciones particulares de los péptidos de la invención donde la secuencia de motivo es adyacente a la secuencia de epítipo, esta se indica como la posición P-4 a P-1 o P+1 a P+4, en comparación con la secuencia de epítipo. Aparte de un enlazador peptídico, pueden utilizarse otros compuestos orgánicos como enlazador para enlazar entre sí las partes del péptido inmunogénico.



Los péptidos inmunogénicos de la presente invención pueden comprender además secuencias de aminoácidos adicionales cortas N-terminal o C-terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de células T y el compuesto reductor (motivo). En el presente documento, dicha secuencia de aminoácidos se denomina generalmente 'secuencia flanqueante'. Una secuencia flanqueante puede situarse en posición N-terminal y/o C-terminal del motivo redox y/o del epítipo de células T en el péptido inmunogénico. Cuando el péptido inmunogénico comprende una secuencia de direccionamiento a endosoma, puede haber una secuencia flanqueante entre el epítipo y una secuencia de direccionamiento a endosoma y/o entre el compuesto reductor (por ejemplo, el motivo) y una secuencia de direccionamiento a endosoma. Más particularmente, una secuencia flanqueante es una secuencia de hasta 10 aminoácidos, o de entre 1 y 7 aminoácidos, tal como una secuencia de 2 aminoácidos.

En realizaciones particulares de la invención, el motivo redox del péptido inmunogénico está situado en el N-terminal del epítipo.

En otras realizaciones particulares, donde el motivo redox presente en el péptido inmunogénico contiene una cisteína, esta cisteína está presente en el motivo en la posición más alejada del epítipo, por lo tanto, el motivo aparece como C- X(2)-[ST] o C-X(2)-S en el N-terminal del epítipo, o aparece como [ST]-X(2)-C o S-X(2)C en el carboxilo terminal del epítipo.

En determinadas realizaciones de la presente invención, se proporcionan péptidos inmunogénicos que comprenden una secuencia de epítipo y una secuencia de motivo. En otras realizaciones particulares, el motivo se produce varias veces (1, 2, 3, 4 o incluso más veces) en el péptido, por ejemplo, como repeticiones del motivo que pueden estar separadas entre sí por uno o más aminoácidos (por ejemplo, CXXC X CXXC X CXXC; SEQ ID NO:13), como repeticiones que son adyacentes entre sí (CXXC CXXC CXXC; SEQ ID NO:14) o como repeticiones que se solapan entre sí CXXCXXCXXC (SEQ ID NO:15) o CXCCXCCXCC (SEQ ID NO:16)). Como alternativa, se proporcionan uno o más motivos en los dos extremos N y C de la secuencia de epítipo de células T. Entre otras variantes contempladas de los péptidos inmunogénicos de la presente invención, se incluyen péptidos que contienen repeticiones de una secuencia de epítipo de células T o epítopos múltiples de células T diferentes, en las que el motivo precede y/o va detrás de cada epítipo (por ejemplo, repeticiones de "motivo-epítipo" o repeticiones de "motivo-epítipo-motivo"). En el presente documento, todos los motivos pueden tener la misma secuencia, pero no es obligatorio. Se observa que las secuencias repetitivas de péptidos que comprenden un epítipo que en sí mismo comprende el motivo, también darán como resultado una secuencia que comprende tanto el "epítipo" como un "motivo". En dichos péptidos, el motivo dentro de una secuencia de epítipo funciona como un motivo fuera de una segunda secuencia de epítipo. Sin embargo, en realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la presente invención comprenden solo un epítipo de células T.

Tal y como se describe anteriormente, los péptidos inmunogénicos según la invención comprenden, además de un compuesto/motivo reductor, un epítipo de células T que procede de un antígeno asociado a tumor. En una secuencia de proteínas, un epítipo de células T puede identificarse mediante ensayos funcionales y/o mediante uno o más ensayos de predicción informática. En una secuencia de epítipo de células T los aminoácidos se numeran según su posición en el surco de unión de las proteínas del MHC. En realizaciones particulares, el epítipo de células T presente dentro de los péptidos de la invención consiste en entre 8 y 25 aminoácidos, aún más particularmente de entre 8 y 16 aminoácidos, aún más particularmente consiste en 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. En una realización más particular, el epítipo de células T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. En una realización particular adicional, el epítipo de células T es un epítipo, que se presenta a las células T a través de las moléculas del MHC de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia de epítipo de células T es una secuencia de epítipo que encaja en la hendidura de una proteína del MHC II, más particularmente, un encaje de secuencias nonapeptídicas en la hendidura del MHC II. El epítipo de células T de los péptidos inmunogénicos de la invención puede corresponder a una secuencia de epítipo natural de una proteína, o puede ser una versión modificada de la misma, siempre y cuando el epítipo de células T conserve su capacidad para unirse dentro de la hendidura del MHC, de manera similar a la secuencia de epítipo de células T natural. El epítipo de células T modificado puede tener la misma afinidad de unión por la proteína del MHC que el epítipo natural, pero también puede tener una afinidad disminuida. En realizaciones particulares, la afinidad de unión del péptido modificado no es menor que 10 veces menos que la del péptido original, más particularmente no es menor que 5 veces menos. Es un hallazgo de la presente invención que los péptidos de la presente invención tengan un efecto estabilizador sobre complejos proteicos. En consecuencia, el efecto estabilizador del complejo péptido-MHC compensa la afinidad disminuida del epítipo modificado por la molécula de MHC.

En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención comprenden además una secuencia de aminoácidos (u otro compuesto orgánico) que facilita la captación del péptido en endosomas (tardíos) para el procesamiento y presentación dentro de determinantes del MHC de clase II. El direccionamiento al endosoma tardío está mediado por señales presentes en la cola citoplasmática de las proteínas y corresponde a los motivos peptídicos bien identificados, tales como el motivo [DE]XXXL[LI] (SEQ ID NO:17) basado en dileucina o DXXLL (SEQ ID NO:18) (por ejemplo, DXXXLL; SEQ ID NO:19), el motivo YXXØ basado en tirosina o el denominado motivo de agrupamiento ácido. El símbolo Ø representa restos de aminoácido con cadenas laterales hidrófobas voluminosas, tales como Phe, Tyr y Trp. Las secuencias de direccionamiento al endosoma tardío permiten el procesamiento y la presentación eficaz del epítipo de células T que procede de un antígeno a través de las

moléculas del MHC de clase II. Dichas secuencias de direccionamiento a endosoma están contenidas, por ejemplo, dentro de la proteína gp75 (Vijayasaradhi *et al.* (1995) J Cell Biol 130, 807-820), de la proteína gamma CD3 humana, del HLA-BM  $\beta$  (Copier *et al.* (1996) J. Immunol. 157, 1017-1027) y de la cola citoplasmática del receptor DEC205 (Mahnke *et al.* (2000) J Cell Biol 151, 673-683). Otros ejemplos de péptidos que funcionan como señales de clasificación para el endosoma se divulgan en la revisión de Bonifacio y Traub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447. Como alternativa, la secuencia puede ser la de un epítipo de células T subdominante o menor de una proteína, lo que facilita la captación en el endosoma tardío sin superar la respuesta de las células T hacia el epítipo de células T que procede de un antígeno asociado a un tumor.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden generarse acoplando un compuesto reductor, más particularmente un motivo reductor tal y como se describe en el presente documento, en el N-terminal o C-terminal a un epítipo de células T del antígeno asociado a un tumor (ya sea directamente adyacente al mismo o separado mediante un enlazador). Además, la secuencia del epítipo de células T del péptido inmunogénico y/o del motivo redox puede modificarse y/o pueden introducirse (o modificarse) una o más secuencias flanqueantes y/o una secuencia de direccionamiento, en comparación con la secuencia del epítipo de células T de origen natural. En consecuencia, la secuencia resultante del péptido inmunogénico diferirá en la mayoría de los casos de la secuencia de la proteína del antígeno de interés asociado a un tumor. En este caso, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos con una secuencia 'artificial', de origen no natural.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden variar sustancialmente en cuanto a su longitud, es decir, de aproximadamente 12-13 aminoácidos (un epítipo de células T de 8-9 aminoácidos y el motivo redox de 4 aminoácidos) a hasta 50 aminoácidos. Por ejemplo, un péptido inmunogénico según la invención puede comprender una secuencia de direccionamiento a endosoma de 40 aminoácidos, una secuencia flanqueante de aproximadamente 2 aminoácidos, un motivo, tal y como se describe en el presente documento, de 4 aminoácidos, un enlazador de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de células T de 9 aminoácidos. En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención consisten en entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30, 50 aminoácidos. En una realización más particular, los péptidos consisten en entre 10 y 20 aminoácidos. Más particularmente, cuando el compuesto reductor es un motivo redox, tal y como se describe en el presente documento, el péptido inmunogénico que comprende el epítipo y el motivo conectado opcionalmente mediante un enlazador, tiene una longitud de 18 aminoácidos o menor, por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos.

Como se ha detallado anteriormente, los péptidos inmunogénicos de la invención comprenden un motivo reductor, tal y como se describe en el presente documento, enlazado a una secuencia del epítipo de células T. Según realizaciones particulares, los epítipos de células T proceden de antígenos asociados a tumor que no comprenden en su secuencia natural una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C terminal, adyacente al epítipo de células T de interés. Más particularmente, la invención incluye generar péptidos inmunogénicos a partir de antígenos asociados a un tumor que no comprenden una secuencia seleccionada de C-X(2)-S, S-X(2)-C, C-X(2)-C, S-X(2)-S, C-X(2)-T, T-X(2)-C dentro de secuencia de 11 aminoácidos N o C terminal adyacente a la secuencia del epítipo. En otras realizaciones particulares, la presente invención proporciona péptidos inmunogénicos de antígenos asociados a un tumor que no comprenden las secuencias de aminoácidos anteriormente descritas con propiedades redox en el interior de su secuencia.

En otras realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención son péptidos que comprenden epítipos de células T cuyos epítipos de células T no comprenden una secuencia de aminoácidos con propiedades redox en el interior de su secuencia natural. Sin embargo, en realizaciones alternativas, un epítipo de células T que se une a la hendidura del MHC puede comprender un motivo redox, tal como se describe en el presente documento, en el interior de su secuencia de epítipo; los péptidos inmunogénicos según la invención que comprenden dicho epítipo de células T han de comprender además otro motivo redox acoplado al epítipo (adyacente o separado mediante un enlazador) N o C terminal de modo que el motivo fijado puede garantizar la actividad reductora (al contrario que el motivo presente en el epítipo, que está enterrado en el interior de la hendidura).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos para generar péptidos inmunogénicos de la presente invención descritos en el presente documento. Dichos métodos incluyen la identificación de epítipos de células T en un antígeno de interés asociado a un tumor; las maneras para identificar *in vitro* e informáticamente los epítipos de células T son muy conocidas en la materia y a continuación se elaboran algunos aspectos. En realizaciones particulares, los métodos según la invención incluyen además generar péptidos inmunogénicos de la invención (que incluyen el epítipo de células T identificado y un motivo redox (con o sin enlazador(es), secuencia(s) flanqueante(s) o una secuencia de direccionamiento a endosoma)). Puede evaluarse la capacidad de los péptidos inmunogénicos generados para inducir las células T reguladoras CD4+ específicas del antígeno asociado a un tumor que son citotóxicas para las células que presentan (partes de) el antígeno de interés asociado a un tumor.

Los péptidos inmunogénicos según la invención se generan a partir del/los epítipo(s) de células T del/de los antígeno(s) de interés asociado(s) a un tumor. En particular, el epítipo de células T puede ser un epítipo de células T dominante. Para su uso en el contexto de la presente invención, un experto en la materia sabe cómo identificar y seleccionar un epítipo de células T a partir de un antígeno asociado a un tumor. Por ejemplo, las secuencias peptídicas aisladas de un antígeno asociado a un tumor se analizan mediante, por ejemplo, técnicas de biología de

células T, para determinar si las secuencias peptídicas suscitan una respuesta de células T. Aquellas secuencias peptídicas que se descubre que suscitan una respuesta de células T, se definen como las que tienen una actividad estimuladora de células T. La actividad estimuladora de células T humanas puede analizarse además realizando cultivos de células T obtenidas de un individuo sensibilizado a un antígeno asociado a un tumor con un péptido/epítipo que procede del antígeno asociado a un tumor y determinando si se produce la proliferación de células T en respuesta al péptido/epítipo según se mida, por ejemplo, por captación celular de timidina tritiada. Los índices de estimulación de las respuestas de las células T a los péptidos/epítipos pueden calcularse como las CPM máximas en respuesta a un péptido/epítipo dividido entre las CPM control. Un índice de estimulación (I.E.) de células AT igual a o mayor que dos veces el nivel base se considera "positivo". Los resultados positivos se utilizan para calcular el índice de estimulación medio de cada péptido/epítipo para el grupo de péptidos/epítipos analizado. Además, puede analizarse opcionalmente la afinidad de unión de los epítipos de células T no naturales (o modificados) a las moléculas del MHC de clase II. La unión de epítipos de células T no naturales (o modificados) a las moléculas del MHC de clase II puede realizarse de diversas maneras. Por ejemplo, las moléculas del MHC de clase II solubles se obtienen mediante la lisis de células homocigotas para una molécula de clase II determinada. Esta última se purifica mediante cromatografía por afinidad. Las moléculas de la clase II solubles se incuban con un péptido de referencia marcado con biotina producido según su fuerte afinidad de unión para esa molécula de la clase II. Los péptidos que han de evaluarse para la unión de la clase II se incuban después en diferentes concentraciones y se calcula su capacidad para desplazar el péptido de referencia de su unión a la clase II mediante la adición de neutravidina. Estos métodos pueden encontrarse, por ejemplo, en Texier *et al.*, (2000) *J. Immunology* 164, 3177-3184). Los péptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice de estimulación de células T medio mayor que o igual a 2,0. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de células T mayor que o igual a 2,0 se considera que es útil como agente profiláctico o terapéutico. Más particularmente, los péptidos inmunogénicos según la invención tienen un índice de estimulación de células T medio de al menos 2,5, de al menos 3,5, de al menos 4,0 o incluso de al menos 5,0. Además, dichos péptidos tienen normalmente un índice de positividad (I.P) de al menos aproximadamente 100, de al menos 150, de al menos aproximadamente 200 o de al menos aproximadamente 250. El índice de positividad de un péptido se determina multiplicando el índice de estimulación de células T por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensibles al antígeno asociado a un tumor (por ejemplo, al menos 9 individuos, al menos 16 individuos o al menos 29 o 30 o incluso más), que tienen células T que responden al péptido (correspondiendo por lo tanto al IE multiplicado por la naturaleza promiscua del péptido/epítipo). Por lo tanto, el índice de positividad representa tanto la fuerza de una respuesta de células T a un péptido (I.E.), como la frecuencia de una respuesta de células T a un péptido en una población de individuos sensibles a un antígeno asociado a un tumor. Para determinar los epítipos de células T óptimos mediante, por ejemplo, técnicas de mapeo precisas, un péptido que tiene actividad estimuladora de células T y que por lo tanto comprende al menos un epítipo de células T, tal y como se determina mediante técnicas de biología de células T, se modifica por la adición o supresión de restos de aminoácido en el extremo N o C del péptido, y se analizan para determinar un cambio en la reactividad de las células T con respecto al péptido modificado. Si se descubre que dos o más péptidos que comparten un área de solapamiento en la secuencia de proteínas nativa tienen actividad estimuladora las células T, tal y como se determina mediante las técnicas de biología de células T, pueden producirse péptidos adicionales que comprendan toda o una parte de dichos péptidos, y estos péptidos adicionales podrán analizarse mediante un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y producen de manera recombinante o sintética. Los epítipos o péptidos de células T se seleccionan en función de varios factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de las células T al péptido/epítipo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de las células T con respecto al péptido en una población de individuos.

Los antígenos candidatos pueden examinarse mediante uno o más algoritmos *in vitro* para identificar una secuencia de epítipo de células T en el interior de una proteína antigénica. Los algoritmos adecuados se describen, por ejemplo, en Zhang *et al.* (2005) *Nucleic Acids Res* 33, W180-W183 (PREDBALB); Salomon & Flower (2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN); Schuler *et al.* (2007) *Methods Mol. Biol.* 409, 75-93 (SYFPEITHI); Donnes & Kohlbacher (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, W194-W197 (SVMHC); Kolaskar & Tongaonkar (1990) *FEBS Lett.* 276, 172-174 y Guan *et al.* (2003) *Appl Bioinformatics* 2, 63-66 (MHCpred). Más particularmente, dichos algoritmos permiten la predicción en el interior de una proteína antigénica de una o más secuencias nonapeptídicas que encajarán en el surco de una molécula de MHC II.

Los péptidos inmunogénicos de la invención pueden producirse mediante expresión recombinante en, por ejemplo, células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*), células de levadura (por ejemplo, especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*, especies de *Saccharomyces* o de *Schizosaccharomyces*), células de insecto (por ejemplo, de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*), células vegetales o células de mamífero (por ejemplo, células CHO y COS). La construcción de los vectores de expresión adecuados así requeridos (incluyendo otra información, tal como las secuencias promotora y de terminación) implica el uso de técnicas de ADN recombinante convencionales. Los péptidos inmunogénicos de la invención, producidos de manera recombinante, pueden proceder de una proteína precursora más grande, por ejemplo, mediante escisión enzimática de sitios de escisión enzimáticos insertados adyacentes al N y/o C terminal del péptido inmunogénico, seguido de purificación adecuada.

En vista de la longitud limitada de los péptidos inmunogénicos de la invención, estos pueden prepararse mediante síntesis peptídica química, en la que los péptidos se preparan acoplado los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de, por ejemplo, D-aminoácidos, aminoácidos con

5 cadenas laterales de origen no natural o aminoácidos naturales con cadenas laterales modificadas, tales como cisteína metilada. Los métodos de síntesis peptídica química están bien descritos y los péptidos pueden solicitarse en empresas como Applied Biosystems, y otras empresas. La síntesis peptídica puede realizarse como una síntesis peptídica en fase sólida (SPFS), o por el contrario, como una síntesis peptídica en fase líquida. Los métodos de SPFS que mejor se conocen son la química Fmoc y t-Boc en fase sólida, que el experto en la materia conoce sobradamente. Además, los péptidos pueden enlazarse entre sí para formar péptidos más largos utilizando una estrategia de ligamiento (acoplado de manera quimioselectiva dos fragmentos peptídicos no protegidos), tal y como se describió originariamente en Kent (Schnolzer & Kent (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193) y se revisó, por ejemplo, en Tam *et al.* (2001) Biopolymers 60, 194-205. Esto proporciona la enorme posibilidad de conseguir la síntesis de proteínas que está fuera del alcance de la SPFS. Mediante este método, se han sintetizado con éxito muchas proteínas del tamaño de 100-300 restos. Los péptidos sintéticos han seguido desempeñando un papel cada vez más crucial en los campos de investigación de la bioquímica, farmacología, neurobiología, enzimología y biología molecular debido a los grandes avances en la SPFS.

15 Las propiedades físicas y químicas de un péptido inmunogénico de interés (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) se examinan para determinar si el péptido es/sería adecuado para su uso en composiciones terapéuticas. Normalmente, esto se optimiza ajustando la secuencia del péptido. Opcionalmente, el péptido puede modificarse después de la síntesis (modificaciones químicas mediante, por ejemplo, la adición/supresión de grupos funcionales) utilizando técnicas conocidas en la materia.

20 En consecuencia, en otro aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos *in vitro* para generar células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un tumor (Tregs o células T reguladoras CD4+) ya sea *in vivo* o *in vitro* (*ex vivo*). En particular, dichas células T son citotóxicas para cualquier célula que presente un antígeno asociado a un tumor y pueden obtenerse como una población celular. La invención se extiende a dichas (poblaciones de) Tregs citotóxicas específicas de antígeno asociado a un tumor que pueden obtenerse mediante los métodos *in vitro* descritos en el presente documento.

30 En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población celular *in vitro* mediante el contacto de un péptido inmunogénico según la invención con las células de la sangre periférica aisladas, y la expansión de la población celular estimulada, más particularmente, en presencia de IL-2. Los métodos según la invención tienen la ventaja de que se producen grandes cantidades de Tregs y de que pueden generarse las Tregs que son específicas del antígeno asociado a un tumor (usando un péptido que comprenda un epítipo específico de antígeno). Como alternativa, las células T citotóxicas específicas de antígeno asociado a un tumor pueden obtenerse mediante la incubación en presencia de las CPA (células presentadoras de antígeno) que presentan un péptido inmunogénico específico de antígeno asociado a un tumor según la invención, después de la transducción o transfección de las CPA con una construcción genética capaz de impulsar la expresión de dicho péptido inmunogénico. De hecho, dichas CPA pueden en sí administrarse a un sujeto que presente la necesidad de desencadenar la inducción *in vivo* en dicho sujeto del subconjunto beneficioso de células T CD4+ citotóxicas.

40 Alternativamente, las Tregs pueden generarse *in vivo*, es decir, mediante la administración a un sujeto de un péptido inmunogénico proporcionado en el presente documento y la recogida de las Tregs generadas *in vivo*.

45 Las células T reguladoras específicas de antígeno asociado a un tumor que pueden obtenerse mediante los métodos anteriores son de particular interés para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar un tumor o para prevenir o tratar una recidiva tumoral, es decir, para cualquiera de los usos anteriormente descritos de los péptidos inmunogénicos de la invención, dichos péptidos pueden sustituirse por dichas Tregs específicas de antígeno asociado a un tumor. Se contempla también el uso de células alogénicas o autogénicas. Cualquier método que comprenda la administración a un sujeto que lo necesite de dichas Tregs específicas de antígeno asociado a un tumor (es decir, para tratar un tumor o para prevenir o tratar una recidiva tumoral), también se conoce como terapia celular adoptiva. Las Tregs son fundamentales en la inmunorregulación y tienen un gran potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en las Tregs depende de la especificidad de las células T reguladoras por el Ag. Además, el uso de Tregs específicas de Ag frente a Tregs expandidas policlonales reduce el número total de Tregs necesarias para la terapia.

55 La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos inmunogénicos de la presente invención y a los métodos para su uso, por ejemplo, para la expresión recombinante o en terapia génica. En particular, dichas secuencias de ácidos nucleicos son capaces de expresar péptidos inmunogénicos de la invención.

60 De hecho, los péptidos inmunogénicos de la invención pueden administrarse a un sujeto que lo necesite utilizando cualquier método de terapia génica adecuado. En cualquier uso o método de la invención para el tratamiento de un tumor y/o para el tratamiento o prevención de una recidiva tumoral, la inmunización con un péptido inmunogénico de la invención puede combinarse con la transferencia celular adoptiva de (una población de) Tregs específicas para dicho péptido inmunogénico, y/o con terapia génica. Cuando se combinan, dicha inmunización, la transferencia celular adoptiva y la terapia génica, pueden utilizarse simultánea o consecutivamente en cualquier combinación

posible.

En la terapia génica, las moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican los péptidos inmunogénicos pueden utilizarse como ADN desnudo o en liposomas u otros sistemas lipídicos para su suministro a las células diana. Los expertos en la materia conocen bien otros métodos para la transferencia directa de ADN plasmídico al interior de células y su uso en terapia génica humana, e implican el direccionamiento del ADN hacia los receptores de las células, formando un complejo del ADN plasmídico con proteínas. En su forma más simple, la transferencia génica puede realizarse inyectando simplemente cantidades mínúsculas de ADN en el núcleo de una célula, a través de un proceso de microinyección. Una vez que se han introducido los genes recombinantes en una célula, estos pueden reconocerse mediante los mecanismos normales celulares para la transcripción y la traducción, y pueden expresar un producto génico. También se han intentado otros métodos para introducir ADN en un gran número de células. Entre estos métodos se incluyen: la transfección, en la que el ADN se precipita con fosfato de calcio y es captado por las células mediante pinocitosis; electroporación, en la que las células están expuestas a grandes impulsos de voltaje para crear orificios en la membrana; lipofección/fusión de liposomas, en la que el ADN se empaqueta en vesículas lipófilas que se fusionan con una célula diana; y bombardeo de partículas utilizando ADN unido a pequeños proyectiles. Otro método para introducir ADN en las células es acoplar el ADN a proteínas modificadas químicamente. Las proteínas de adenovirus son capaces de desestabilizar los endosomas y mejorar la captación del ADN en las células. La mezcla de adenovirus a soluciones que contienen complejos de ADN, o la unión de ADN a polilisina fijada covalentemente a adenovirus utilizando agentes reticulantes de proteínas, mejora sustancialmente la captación y expresión del gen recombinante. Los vectores de virus adenoasociados pueden utilizarse también para el suministro de genes a las células vasculares. Como se usa en el presente documento, "transferencia génica" significa el proceso de introducción de una molécula de ácido nucleico extraña en una célula, lo que habitualmente se realiza para posibilitar la expresión de un producto particular codificado por el gen. Dicho producto puede incluir una proteína, un polipéptido, ADN y ARN antisentido o ARN enzimáticamente activo. La transferencia génica puede realizarse en células cultivadas o por administración directa a mamíferos. En otra realización, se proporciona un vector que comprende una secuencia de la molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico según la invención. En realizaciones particulares, el vector se genera de tal modo que la secuencia de la molécula de ácido nucleico se expresa solo en un tejido específico. En la materia se conocen bien métodos para conseguir la expresión génica específica de tejido, por ejemplo, colocando la secuencia que codifica un péptido inmunogénico de la invención bajo el control de un promotor, que dirige la expresión del péptido específicamente a uno o más tejidos u órganos. Los vectores de expresión que proceden de virus tales como retrovirus, virus de la variolovacuna, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, virus de ARN o virus del papiloma bovino, pueden utilizarse para el suministro de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, ADNc) que codifican péptidos, homólogos o derivados de los mismos según la invención en los tejidos diana o en la población de células diana. Los métodos bien conocidos por los expertos en la materia pueden utilizarse para construir vectores víricos recombinantes que contengan dichas secuencias codificantes. Como alternativa, las células modificadas genéticamente que contienen una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido inmunogénico según la invención pueden utilizarse en terapia génica.

Donde esté garantizada la administración de uno o más péptidos según la invención a través de la transferencia génica (es decir, la administración de un ácido nucleico que garantiza la expresión *in vivo* de péptidos según la invención tras la administración), puede determinarse la dosis apropiada del ácido nucleico en función de la cantidad de péptido expresada como resultado del ácido nucleico introducido.

El medicamento de la invención es normalmente, pero no necesariamente, una formulación (farmacéutica) que comprende, como principio activo, al menos uno de los péptidos inmunogénicos de la invención, (una población de) Tregs específica para dicho péptido inmunogénico o un vector terapéutico genético capaz de expresar dicho péptido inmunogénico. Además del ingrediente, o de los ingredientes, activo(s), dicha formulación comprenderá al menos uno de un diluyente, un transportador o un adyuvante (farmacéuticamente aceptable). Normalmente, los compuestos farmacéuticamente aceptables (tales como los diluyentes, transportadores o adyuvantes) pueden encontrarse en, por ejemplo, un manual de Farmacopea (por ejemplo, la Farmacopea de los Estados Unidos, Europa o Internacional). El medicamento o la composición farmacéutica de la invención comprende normalmente una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del ingrediente, o de los ingredientes, activo(s), en la que la eficacia es relativa a la afección o trastorno que ha de prevenirse o tratarse. En particular, las composiciones farmacéuticas de la invención son vacunas para la aplicación profiláctica o terapéutica.

El medicamento o la composición farmacéutica de la invención puede tener que administrarse a un sujeto que lo necesite como parte de un régimen profiláctico o terapéutico que comprende administraciones múltiples de dicho medicamento o composición. Dichas administraciones múltiples normalmente se producen consecutivamente, y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede variar y se ajustará a la naturaleza del principio activo y a la naturaleza de la afección que ha de prevenirse o tratarse. La cantidad de principio activo proporcionada a un sujeto que lo necesite en una única administración también puede variar y dependerá de factores tales como el estado físico del sujeto (por ejemplo, peso, edad), el estado de la afección que ha de prevenirse o tratarse, y la experiencia del médico, facultativo o sanitario que lo esté tratando

El término "diluyentes" se refiere, por ejemplo, a soluciones salinas fisiológicas. El término "adyuvante" suele

referirse a un agente farmacológico o inmunitario que modifica (preferentemente aumenta) el efecto de otros agentes (por ejemplo, fármacos, vacunas) mientras presenta pocos efectos directos, si es que los presenta, cuando se administra individualmente. Como ejemplo de un adyuvante, se proporciona el hidróxido de aluminio (alumbre), en el que se puede absorber un péptido inmunogénico de la invención. Adicionalmente, se conocen muchos otros adyuvantes en la materia y pueden utilizarse siempre y cuando faciliten la presentación de los péptidos en la presentación del MHC de clase II y la activación de las células T. La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier material o sustancia con la que se formula el principio activo para facilitar su aplicación o diseminación en el lugar que se va a tratar, por ejemplo, disolviendo, dispersando o difundiendo dicha composición, y para facilitar su almacenamiento, transporte o manipulación sin alterar su eficacia. Esta expresión incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares. Pueden incluirse ingredientes adicionales para controlar la duración de la acción del principio activo en la composición. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido o un líquido o un gas que se haya comprimido para formar un líquido, es decir, las composiciones de la presente invención pueden usarse de manera adecuada como concentrados, emulsiones, soluciones, granulados, polvos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, bolitas o polvos. Los transportadores farmacéuticamente aceptables para su uso en dichas composiciones farmacéuticas y su formulación son bien conocidos por los expertos en la materia, y no existe una restricción particular en su selección en la presente invención. También pueden incluir aditivos, tales como agentes humectantes, agentes de dispersión, apelmazantes, adhesivos, agentes emulsionantes, disolventes, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos (por ejemplo, fenol, ácido sórbico, clorobutanol), agentes isotónicos (tales como azúcares o cloruro de sodio) y similares, siempre que los mismos sean coherentes con la práctica farmacéutica, es decir, transportadores y aditivos que no creen un daño permanente en los mamíferos. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de cualquier modo conocido, por ejemplo, mezclando homogéneamente, recubriendo y/o triturando los principios activos, en un procedimiento de una etapa o de múltiples etapas, con el material transportador seleccionado y, cuando sea apropiado, los demás aditivos, tales como agentes tensioactivos. También pueden prepararse mediante micronización, por ejemplo, con el objetivo de obtenerlos en forma de microesferas que tienen normalmente un diámetro de aproximadamente 1 a 10  $\mu\text{m}$ , concretamente, para la fabricación de microcápsulas para la liberación controlada o sostenida de los principios activos.

Los péptidos inmunogénicos, homólogos y derivados de los mismos según la invención (y sus sales fisiológicamente activas o composiciones farmacéuticas incluidas todas en el término "principios activos") pueden administrarse por cualquier vía apropiada respecto a la afección que ha de prevenirse o tratarse y apropiada para los compuestos, en este caso, las proteínas inmunogénicas que van a administrarse. Entre las posibles vías se incluyen la regional, sistémica, oral (en forma sólida o inhalación), rectal, nasal, tópica (incluyendo ocular, bucal y sublingual), vaginal y parenteral (incluyendo la subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraarterial, intratecal y epidural). La vía de administración preferida puede variar dependiendo, por ejemplo, de la afección del receptor o de la afección que ha de prevenirse o tratarse.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocido en la técnica de farmacia. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades individuales, tales como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada uno de ellos una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como solución o suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Un comprimido puede crearse por compresión o moldeo, de forma opcional con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos creados por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma libre, tal como polvos o gránulos, mezclados de forma opcional con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos creados por moldeo pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse de forma que se proporcione una liberación lenta o controlada del principio activo de los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados, tal y como se describe en las reivindicaciones, que comprenden un epítipo de células T de un antígeno vírico asociado a un tumor y, adyacente a dicho epítipo de células T, o separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador, un motivo C-(X)<sub>2</sub>-[CST] o [CST]-(X)<sub>2</sub>-C. En otras realizaciones particulares, el epítipo es un epítipo por el que el antígeno asociado a un tumor no está comprendido de forma natural dentro de una secuencia de 11 aminoácidos No Cterminal adyacente a dicho epítipo, un motivo redox. Más adelante, se mencionan ejemplos ilustrativos de antígenos asociados a tumor para los que están concebidos los péptidos inmunogénicos.

Adicionalmente, se desvelan métodos para tratar a pacientes que padecen un tumor que expresa un antígeno vírico, comprendiendo dichos métodos, administrar al paciente, un péptido inmunogénico según la invención, que comprende un epítipo de células T contra el antígeno vírico y un motivo redox, tal y como se describe en el presente documento. En particular, el antígeno vírico es un antígeno de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus del herpes, virus de tipo C y virus tumorales mamarios de ARN de tipo B.

La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan sin ninguna intención limitativa.

## 5 Ejemplos

**Ejemplo 1. Las células T CD4+ reguladoras se suscitaron por inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de células T de antígeno asociado a melanoma (MAGE-31) al que se añadió una secuencia consenso de tiorreductasa**

10 Ratones C57Bl/6 (grupo 1) se inmunizaron con 25 µg de un péptido que contenía un epítipo de células T (natural) de MAGE-3 mediante 3 inyecciones en las almohadillas plantares en CFA/IFA (adyuvante completo de Freund/adyuvante incompleto de Freund), realizadas a intervalos quincenales. La secuencia del epítipo de células T (natural) corresponde a los aminoácidos 258 a 266 de MAGE-3, en concreto: YRQVPGSDP (SEQ ID NO:1).

15 Se inmunizó un segundo grupo de ratones C57Bl/6 (grupo 2) utilizando el mismo protocolo con el péptido de SEQ ID NO:1 al que se añadió un motivo consenso que presentaba actividad tiorreductasa (o brevemente: motivo redox) en el extremo terminal amino, en concreto: CHGCYRQVPGSDP (SEQ ID NO:2; motivo redox subrayado; epítipo de células T modificado)

20 Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazos de todos los ratones y se prepararon las células T CD4+ clasificándolas sobre perlas magnéticas.

25 Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones C57Bl/6 no tratados previamente. Dichas CPA ( $2 \times 10^7$ ) se cargaron con el péptido de SEQ ID NO:1 o con el péptido de SEQ ID NO:2 (5 µg/ml) mediante una incubación de 1 h seguida de un lavado.

30 Las células T CD4+ obtenidas de cada grupo de ratones 1 y 2 se añadieron a la población de CPA y se cultivaron conjuntamente durante 24 h a 37°C. Después, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo c anti-CD11 marcado con fluorescencia y con anexina V marcada con FITC como marcador de apoptosis. Finalmente, las células se analizaron mediante análisis Facs.

35 Estos experimentos demostraron que un péptido de SEQ ID NO:2 puede suscitar células T CD4+ con propiedades citotóxicas contra las CPA que presentan el epítipo de células T de MAGE-3 natural (SEQ ID NO:1) o el epítipo de células T de MAGE-3 modificado (SEQ ID NO:2).

**Ejemplo 2. Las células T CD4+ reguladoras citotóxicas se suscitaron por inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de células T de ciclina 01 al que se añadió una secuencia consenso de tiorreductasa**

40 Ratones C57Bl/6 (grupo 1) se inmunizaron con 25 µg de un péptido que contenía un epítipo de células T (natural) de ciclina D1 mediante 3 inyecciones en las almohadillas plantares en CFA/IFA, realizadas a intervalos quincenales. La secuencia del péptido corresponde a los aminoácidos 185 a 193 de la ciclina D1, en concreto: FVALCATDV (SEQ ID NO:3). Se inmunizó un segundo grupo de ratones C57Bl/6 (grupo 2) utilizando el mismo protocolo anterior con el péptido de SEQ ID NO:3 al que se añadió un motivo consenso que presentaba actividad tiorreductasa (o brevemente: motivo redox) en el extremo amino terminal, en concreto: CHGCFVALCATDV (SEQ ID NO:4; motivo redox subrayado; epítipo de células T modificado).

50 Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazos de todos los ratones y se prepararon las células T CD4+ clasificándolas sobre perlas magnéticas.

55 Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones C57Bl/6 no tratados previamente. Dichas CPA ( $2 \times 10^7$ ) se cargaron con el péptido de SEQ ID NO:3 o con el péptido de SEQ ID NO:4 (5 µg/ml) mediante una incubación de 1 h seguido de un lavado.

60 Las células T CD4+ obtenidas de cada grupo de ratones 1 y 2 se añadieron a la población de CPA y se cultivaron conjuntamente durante 24 h a 37 °C. Después, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo c anti-CD11 marcado con fluorescencia y con anexina V marcada con FITC como marcador de apoptosis. Finalmente, las células se analizaron mediante análisis Facs.

65 Estos experimentos demostraron que un péptido de SEQ ID NO:4 puede suscitar células T CD4+ con propiedades citotóxicas contra las CPA que presentan el epítipo de células T de la ciclina D1 natural (SEQ ID NO:3) o el epítipo de células T de la ciclina D1 modificado (SEQ ID NO:4).

**Ejemplo 3. Las células T CD4+ reguladoras citotóxicas se suscitaron mediante inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de células T de survivina al que se añadió una secuencia consenso de**

**tiorreductasa**

Ratones C57Bl/6 (grupo 1) se inmunizaron con 25 µg de un péptido que contenía un epítipo de células T (natural) de survivina mediante 3 inyecciones en las almohadillas plantares en CFA/IFA, realizadas a intervalos quincenales. La secuencia del péptido corresponde a los aminoácidos 61 a 69 de la survivina, en concreto: FKELEGWEP (SEQ ID NO:5).

Se inmunizó un segundo grupo de ratones C57Bl/6 (grupo 2) utilizando el mismo protocolo con el péptido de SEQ ID NO:5 al que se añadió un motivo consenso que presentaba actividad tiorreductasa (o brevemente: motivo redox) en el extremo amino terminal, en concreto: CHGCFFKELEGWEP (SEQ ID NO:6; motivo redox subrayado; epítipo de células T modificado).

Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazos de todos los ratones y se prepararon las células T CD4+ clasificándolas sobre perlas magnéticas.

Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones C57Bl/6 no tratados previamente. Dichas CPA ( $2 \times 10^7$ ) se cargaron con el péptido de SEQ ID NO:5 o con el péptido de SEQ ID NO:6 (5 µg/ml) mediante una incubación de 1 h seguida de un lavado.

Las células T CD4+ obtenidas de cada grupo de ratones 1 y 2 se añadieron a la población de CPA y se cultivaron conjuntamente durante 24 h a 37 °C. Después, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo c anti-CD11 marcado con fluorescencia y con anexina V marcada con FITC como marcador de apoptosis. Finalmente, las células se analizaron mediante análisis Facs.

Estos experimentos demostraron que un péptido de SEQ ID NO:6 puede suscitar células T CD4+ con propiedades citotóxicas frente a las CPA que presentan el epítipo de células T de survivina natural (SEQ ID NO:5) o el epítipo de células T de survivina modificado (SEQ ID NO:6).

**Ejemplo 4. Las células T CD4+ reguladoras citotóxicas se suscitaron mediante inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de células T de LMP2 de Epstein-Barr al que se añadió una secuencia consenso de tiorreductasa**

Ratones BALB/c (grupo 1) se inmunizaron con 25 µg de un péptido que contenía un epítipo de células T (natural) de LMP2 del virus de Epstein-Barr mediante 3 inyecciones en las almohadillas plantares en CFA/IFA, realizadas a intervalos quincenales. La secuencia del péptido corresponde a los aminoácidos 167 a 175 del LMP2, en concreto: VASSYAAAQ (SEQ ID NO:7).

Se inmunizó a un segundo grupo de ratones BALB/c (grupo 2) utilizando el mismo protocolo con el péptido de SEQ ID NO:7 al que se añadió un motivo consenso que presentaba actividad tiorreductasa (o brevemente: motivo redox) en el extremo amino terminal, en concreto: CHGCVVASSYAAAQ (SEQ ID NO:8; motivo redox subrayado; epítipo de células T modificado).

Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazos de todos los ratones y se prepararon las células T CD4+ clasificándolas sobre perlas magnéticas.

Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones C57Bl/6 no tratados previamente. Dichas CPA ( $2 \times 10^7$ ) se cargaron con el péptido de SEQ ID NO:7 o con el péptido de SEQ ID NO:8 (5 µg/ml) mediante una incubación de 1 h seguida de un lavado.

Las células T CD4+ obtenidas de cada grupo de ratones 1 y 2 se añadieron a la población de CPA y se cultivaron conjuntamente durante 24 h a 37 °C. Después, las células se recuperaron y se incubaron con un anticuerpo c anti-CD11 marcado con fluorescente y con anexina V marcada con FITC como marcador de la apoptosis. Finalmente, las células se analizaron mediante análisis Facs.

Estos experimentos demostraron que un péptido de SEQ ID NO:8 puede suscitar las células T CD4+ con propiedades citotóxicas frente a las CPA que presentan el epítipo de células T de LMP2 de Epstein-Barr natural (SEQ ID NO:7) o el epítipo de células T de LMP2 de Epstein-Barr modificado (SEQ ID NO:8).

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Life Sciences Research Partners VZW Saint-Remy, Jean-Marie

<120> Control inmunogénico de tumores y células tumorales  
(130) T5211-PCT (044)

<150> EP 08447011.1



<151> 14-02-2008  
 <150> US 61/035.856  
 <151> 12-03-2008  
 5 <160> 19  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 10 <210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> aminoácidos 258-266 de MAGE-3  
 <400> 1  
 20 Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> epítipo de células T de MAGE-3 modificado  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(4)  
 <223> motivo de tiorreductasa  
 35 <400> 2  
 Cys His Gly Cys Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro  
 1 5 10  
 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> aminoácidos 185-193 de ciclina D1  
 <400> 3  
 Phe Val Ala Leu Cys Ala Thr Asp Val  
 1 5  
 50 <210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> epítipo de células T de ciclina D1 modificado  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(4)  
 60

ES 2 627 882 T3

<223> motivo de tiorreductasa

<400> 4

Cys His Gly Cys Phe Val Ala Leu Cys Ala Thr Asp Val  
1 5 10

5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> aminoácidos 61-69 de survivina

<400> 5

15

Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro  
1 5

<210> 6  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> epítipo de células T de survivina modificado

25

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(4)  
<223> motivo de tiorreductasa

30

<400> 6

Cys His Gly Cys Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro  
1 5 10

35

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40

<220>  
<223> aminoácidos 167-175 de LMP2 del virus de Epstein-Barr

<400> 7

Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln  
1 5

45

<210> 8  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

50

<220>  
<223> epítipo de células T de LMP2 del virus de Epstein-Barr modificado

55

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(4)

ES 2 627 882 T3

<223> motivo de tiorreductasa

<400> 8

Cys His Gly Cys Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln  
 1 5 10

5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia general del péptido de la invención

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de células T

25

<400> 9

Cys Xaa Xaa Cys Gly Xaa  
 1 5

30

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> secuencia general del péptido de la invención

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

45

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de células T

<400> 10

Cys Xaa Xaa Cys Gly Gly Xaa  
 1 5

50

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> secuencia general del péptido de la invención

60

<220>

<221> MISC\_FEATURE

ES 2 627 882 T3

<222> (2)..(3)  
 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de células T

10 <400> 11

Cys Xaa Xaa Cys Ser Ser Ser Xaa  
 1 5

15 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> secuencia general del péptido de la invención

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de células T

<400> 12

Cys Xaa Xaa Cys Ser Gly Ser Gly Xaa  
 1 5

35 <210> 13  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> repetición del motivo de tiorreductasa

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12 y 13 indica cualquier aminoácido

<400> 13

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

50 <210> 14  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> repetición del motivo de tiorreductasa

60 <220>

ES 2 627 882 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(12)  
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 6, 7, 10 y 11 indica cualquier aminoácido

5 <400> 14

Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

10 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> repetición del motivo de tiorreductasa

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(10)  
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 5, 6, 8 y 9 indica cualquier aminoácido

<400> 15

25 Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

30 <210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> repetición del motivo de tiorreductasa

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(10)  
 <223> Xaa en las posiciones 2, 5 y 8 indica cualquier aminoácido

40 <400> 16

Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys Xaa Cys Cys  
 1 5 10

45 <210> 17  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> señal de direccionamiento del endosoma tardío

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa indica aspartato (D o Asp) o glutamato (E o Glu)

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(4)  
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3 y 4 indica cualquier aminoácido

ES 2 627 882 T3

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
5 <223> Xaa indica leucina (L o Leu) o isoleucina (I o lie)  
  
<400> 17  
  
Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa  
1 5  
  
10  
<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
15  
<220>  
<223> señal de direccionamiento del endosoma tardío  
  
20  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(3)  
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido  
  
25  
<400> 18  
  
Asp Xaa Xaa Leu Leu  
1 5  
  
30  
<210> 19  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
  
35  
<220>  
<223> señal de direccionamiento del endosoma tardío  
  
40  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(5)  
<223> Xaa en las posiciones 2, 3 y 4 indica cualquier aminoácido  
  
<400> 19  
  
Asp Xaa Xaa Xaa Leu Leu  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un péptido inmunogénico aislado con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende i) un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico de un tumor asociado a tumor y ii) un motivo redox [CST]-(X)2-C o C-(X)2-[CST], en el que X es un aminoácido, dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor o para tratar o prevenir una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor.
2. El uso según la reivindicación 1, en la que dicho motivo redox no se produce de manera natural en el interior de una región de 11 aminoácidos N o C terminal adyacente al epítipo de células T en dicho antígeno vírico asociado a un tumor.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho péptido inmunogénico comprende además una secuencia de direccionamiento a endosoma.
4. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho motivo redox está situado en el N-terminal del epítipo de células T.
5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos una X en dicho motivo redox es His o Pro.
6. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos una C en dicho motivo redox está metilada.
7. Un péptido inmunogénico con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende i) un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico de un tumor asociado a tumor y ii) un motivo redox [CST]-(X)2-C o C-(X)2-[CST], en el que X es un aminoácido, y en el que dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos, para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor o para su uso en el tratamiento o prevención de una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor.
8. Un método *in vitro* para obtener una población de células T CD4+ que son específicamente citotóxicas contra CPA que presentan un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor, comprendiendo el método las etapas de:
- proporcionar células de sangre periférica;
  - poner en contacto dichas células *in vitro* con un péptido inmunogénico que tiene una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende i) un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno vírico asociado a un tumor y ii) un motivo redox [CST]-(X)2-C o C-(X)2-[CST], en el que X es un aminoácido, y en el que dicho motivo es inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos; y
  - expandir dichas células en presencia de interleucina 2 (IL-2).
9. Una población de células T CD4+ que son específicamente citotóxicas contra CPA que presentan un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor, obtenida mediante el método según la reivindicación 8.
10. El uso de la población de células T CD4+ que son específicamente citotóxicas frente a células presentadoras de antígeno que presentan un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor, según la reivindicación 9 para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor o para tratar o prevenir una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno vírico asociado a un tumor.
11. Un péptido inmunogénico aislado con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende un epítipo de células T restringido al MHC de clase II de un antígeno vírico asociado a un tumor de un tumor y un motivo redox [CST]-(X)2-C o C-(X)2-[CST], en el que X es un aminoácido, y en el que dicho motivo está inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos, en el que dicho antígeno vírico asociado a un tumor no comprende un motivo [CST]-(X)2-C o C-(X)2-[CST] dentro de una secuencia de 11 aminoácidos N o C terminal de dicha secuencia de epítipo.
12. El péptido inmunogénico aislado según la reivindicación 11, en el que el antígeno vírico asociado a un tumor no comprende un motivo [CST]-(X)2-C o C-(X)2-[CST] en su secuencia.

13. Un método para producir un péptido inmunogénico aislado con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende las etapas de:

- 5
- a) identificar un epítipo de células T restringido al MHC de clase II en una secuencia de proteína de un antígeno vírico asociado a un tumor, y
  - b) producir un péptido con una longitud de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende dicho epítipo de células T identificado y una secuencia con un motivo redox C-(X)<sub>2</sub>-C, [CST]-(X)<sub>2</sub>-C o C-(X)<sub>2</sub>-[CST], en el que X es un aminoácido, por lo que el motivo redox está inmediatamente adyacente a dicho epítipo de células T, o está separado de dicho epítipo de células T mediante un enlazador de como mucho 7 aminoácidos.