

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 630**

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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2009 PCT/EP2009/051804**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009 WO09101205**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2009 E 09710780 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2247306**

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:
23.07.2018

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 2 676 630 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 algunos 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 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 de linfocitos B en linfomas foliculares o mielomas múltiples o determinantes del receptor de linfocitos T en neoplasias de linfocitos T.

25 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.

30 Estos incluían la inmunización activa con, por ejemplo, péptidos obtenidos de idiotipos, así como la transferencia adoptiva de linfocitos T expandidos *in vitro* mediante la exposición a células tumorales. A pesar de que eran muy prometedores, estos enfoques terapéuticos han tenido un éxito limitado y/o se han asociado a un alto índice de recidiva. Además, la capacidad de los linfocitos T para experimentar 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 linfocitos T CD8+ citotóxicos 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 linfocitos 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 los linfocitos T CD4+ no los predispone a ser fuertes células antitumorales. La opinión clásica es que los linfocitos T CD4+ pueden ayudar a proporcionar ayuda a los linfocitos B para producir anticuerpos específicos y que la producción de IFN-gamma por los linfocitos T CD4+ Th1 podría reducir la angiogénesis. Más recientemente, se ha descrito la necesidad de disponer de linfocitos T CD4+ como fuente de IL-2 para ayudar a los linfocitos 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.

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 del antígeno y dicho motivo redox están separados entre sí. Wang *et al.* (2006) Semin. Cancer Biol. 16, 73-79 describen Treg específicos del antígeno tumoral que expresan marcadores tales como CD25, GITR y Foxp3 que normalmente se asocian a linfocitos Treg CD4+ CD25+ de origen natural.

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.

55 Fomenko *et al.* (2003) Biochem. 42, 11214-11225 es una revisión sobre los motivos de oxidorreductasa en proteínas. El documento WO20095051 desvela péptidos de MAGE humano que comprenden una cisteína en un motivo DxxC o CxxF.

Schultz *et al.* (2000) Cancer Res 60, 6272-6275 desvelan un clon de linfocitos T citotóxicos CD4+ específico de MAGE-A3. El documento WO2008/017517 desvela péptidos que comprenden un motivo redox y un epítipo del MHC de clase II de alérgenos y autoantígenos tales como HSP60.

60 Desmetz *et al.* (2008) J. Prot. Res. 7, 3830-3837 identifican HSP60 como un antígeno asociado a tumor en cáncer de mama de estadio temprano y carcinoma ductal. El documento WO2009/042215 desvela que cuando se cargan células dendríticas con un antígeno tumoral y se cultivan en interleucina 15 (IL-15), se reduce la actividad de Treg que es específica para el antígeno tumoral. La reducción de la actividad de Treg da como resultado un aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral.

65 Carlier *et al.* (2012) PlosOne 7, e45366 caracterizan adicionalmente células citotóxicas generadas por péptidos con

una secuencia de motivo redox y un epítipo de linfocitos T del MHC de clase II.

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.

Un aspecto de la presente invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un antígeno asociado a un tumor e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo con un enlazador de hasta 7 aminoácidos, ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa dicho antígeno asociado a un tumor o para uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno asociado a un tumor.

El antígeno asociado a un tumor puede elegirse de oncogenes, protooncogenes, proteínas víricas, factores de supervivencia o determinantes clonotípicos.

El motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C en dicho péptido inmunogénico puede ser adyacente a dicho epítipo de linfocitos T, o separarse de dicho epítipo de linfocitos T por un enlazador de hasta 7 aminoácidos. En particular, dicho enlazador consiste en como máximo 7 aminoácidos. En otras realizaciones del péptido inmunogénico con el uso anterior, dicho motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C no se produce de manera natural en el interior de una región de 11 aminoácidos N-terminal o C-terminal del epítipo de linfocitos T en el antígeno asociado a un tumor.

En realizaciones particulares, dicho motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C está situado en el N-terminal del epítipo de linfocitos T. Así mismo, en particular, al menos una X en dicho motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C es Gly, Ala, Ser o Thr; De manera adicional o como alternativa, al menos una X en el motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C es His o Pro. En una memoria descriptiva adicional, al menos una C en el motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C está metilada.

En otras realizaciones más del péptido inmunogénico para su uso en la solicitud descrita en el presente documento, 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 linfocitos T CD4+ específicos de antígeno asociado a tumor que son citotóxicos contra células que presentan un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno asociado a un tumor, comprendiendo el método las etapas de:

- proporcionar células de la sangre periférica;
- poner en contacto dichas células *in vitro* con un péptido inmunogénico de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno asociado a un tumor e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo con un enlazador de hasta 7 aminoácidos, ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, a condición de que dicho antígeno asociado a un tumor no sea una proteína de choque térmico HSP60;
- y
- expandir dichas células en presencia de IL-2.

Un aspecto adicional se refiere a poblaciones de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno asociado a tumor que son citotóxicos contra células que presentan un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno asociado a un tumor, que puede obtenerse mediante el método de acuerdo con la reivindicación 6, a condición de que dicho antígeno asociado a tumor no sea proteína de choque térmico HSP60.

Otro aspecto de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un antígeno asociado a un tumor e, inmediatamente adyacente a dicho epítipo de linfocitos T o separado de dicho epítipo de linfocitos T por un enlazador de hasta 7 aminoácidos, un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, y a condición de que dicho antígeno asociado a tumor no sea proteína de choque térmico HSP60.

Otro aspecto de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un idiotipo de linfocitos B tumoral e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo por un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de dicho tumor de linfocitos B o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de dicho tumor de linfocitos B.

Otro aspecto de la invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un CDR3 de linfocitos T tumoral e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo con un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de dicho tumor de linfocitos T o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de dicho tumor de linfocitos T.

Descripción detallada de la invención

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

Definiciones

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 de origen no natural.

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.

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 epítopos de linfocitos 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 epítopos; como alternativa dicha macromolécula puede denominarse en el presente documento "**proteína antigénica**" o "**péptido antigénico**".

La expresión "**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 pueden 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 las células tumorales. Por lo tanto, es probable que los antígenos asociados a tumores estén asociados solo a tumores o a células tumorales que expresan moléculas del MHC.

La expresión "**epítipo de linfocitos T**" en el contexto de la presente invención se refiere a un epítipo de linfocitos 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 epítopos son reconocidos por los linfocitos T y capaces de activarlos, entre todos los posibles epítopos de linfocitos T de una proteína. El epítipo de linfocitos T es un epítipo unido con moléculas del MHC de clase II.

El término "**MHC**" se refiere a un "antígeno mayor de histocompatibilidad". En los seres humanos, los genes del 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).

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 del 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 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.

5 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 unirse al 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.

15 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 unirse con ligandos peptídicos de longitud variable, que oscila de 9 a más de 25 restos de aminoácidos. 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 linfocitos T del MHC de clase II que encaja en el surco de la molécula del MCH II normalmente se numera de P1 a P9. Los aminoácidos adicionales N-terminales del epítipo se numeran P-1, P-2 y así sucesivamente, los aminoácidos C-terminales del epítipo se numeran como P+ 1, P+ 2 y así sucesivamente.

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

35 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.

45 El término "**natural**", cuando se utiliza en el presente documento en referencia a una secuencia, se refiere al hecho de que la 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 aminoácidos en dirección N-terminal o C-terminal 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.

60 Los motivos de las secuencias de aminoácidos están escritos en el presente documento según el formato de 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.

5 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 linfocito 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.

15 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 los linfocitos T CD4+ citolíticos) y, además, comprende una parte complementaria que puede tener fines diferentes, tales como establecer los péptidos o alterar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas del péptido.

20 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 %.

25 La expresión "**polinucleótido (o ácido nucleico) que codifica un péptido**", cuando se utiliza en el presente documento, 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.

35 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 linfocitos 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 los linfocitos T CD4+ específicos del antígeno asociado a un tumor con una gran capacidad para inducir la apoptosis de las células tumorales. Estos linfocitos T CD4+ citotóxicos 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.

40 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, el uso de al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítomo de linfocitos 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.

50 Además se usa al menos un péptido inmunogénico aislado que comprende (i) un epítomo de linfocitos 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 linfocitos T reguladores CD4+ que son citotóxicos a las células que presentan dicho antígeno asociado a un tumor.

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

55 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 los linfocitos T CD4+ citolíticos. Sin embargo, los antígenos que proceden del MAGE, tales como MAGE-3, también se expresan en determinantes del MHC de clase II y linfocitos T específicos 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 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).

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 linfocitos T reconocido en el contexto de determinantes del MHC de clase II (Dengiel *et al.* (2004) *Eur. J. of Immunol.* 34: 3644-3651).

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 los linfocitos T CD8+ específicos de survivina son detectables en la sangre de pacientes con melanoma. La survivina se expresa en una amplia diversidad 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 .

Los determinantes idiotípicos se presentan por los linfocitos B en linfomas foliculares, mieloma múltiple y algunas formas de leucemia, y por los linfomas de linfocitos T y algunas leucemias de linfocitos T. Los determinantes idiotípicos son parte del receptor específico de antígeno de ya sea el receptor de linfocitos B (BCR) o del receptor de linfocitos 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 los linfocitos B, o de la CDR3 de la cadena beta de los linfocitos T. Ya que 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 II (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. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos 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.

Un requisito mínimo para activar los linfocitos T CD4+ citotóxicos 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 expresan determinantes de 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.

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 en el presente documento, el uno o más péptidos inmunogénicos pueden sustituirse por linfocitos T reguladores (Treg) CD4+ sensibilizados 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 péptidos inmunogénicos (por ejemplo, en forma de ADN desnudo o un vector vírico para 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 de 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, quizás, algunas proteínas de virus. Para antígenos asociados a tumor que se sobreexpresan en tumores, pero que también están presentes en células sanas, la opción preferida puede ser la transferencia adoptiva de células. Es factible además dirigirse a 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, 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 linfocitos 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 linfocitos T reguladores 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 linfocitos 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, concretamente un motivo de secuencia tiorreductasa. El epítipo de linfocitos T y el motivo de secuencia de tiorreductasa 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 linfocitos 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 linfocitos T o en el extremo carboxilo del epítipo de linfocitos T.
- El compuesto orgánico con actividad reductora es una secuencia peptídica. Los fragmentos peptídicos con actividad reductora se encuentran en tiorreductasas 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), en las que 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 fosfoinositida.
- 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 dirección N-terminal del epítipo de linfocitos 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.
- 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 no naturales. 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 cistina. 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 del 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 linfocitos 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 de acuerdo con 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 en posición N-terminal o C-terminal de la secuencia (artificial) que comprende el epítipo de

linfocitos 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 linfocitos 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 7 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 posición 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 posición N-terminal del epítipo, o aparece como [ST]-X(2)-C o S-X(2)C en posición 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 aparece 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 linfocitos 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 linfocitos T o epítipos múltiples de linfocitos T diferentes, en los 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 linfocitos T.

Como se ha descrito anteriormente, los péptidos inmunogénicos según la invención comprenden, además de un compuesto/motivo reductor, un epítipo de linfocitos T que procede de un antígeno asociado a tumor. En una secuencia de proteínas, un epítipo de linfocitos T puede identificarse mediante ensayos funcionales y/o mediante uno o más ensayos de predicción informática. En una secuencia de epítipo de linfocitos T los aminoácidos se numeran según su posición en el surco de unión de las proteínas del MHC. En realizaciones particulares, el epítipo de linfocitos 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 linfocitos T consiste en una secuencia de 9 aminoácidos. En una realización particular adicional, el epítipo de linfocitos T es un epítipo, que se presenta a los linfocitos T a través de las moléculas del MHC de clase II. En realizaciones particulares de la presente invención, la secuencia de epítipo de linfocitos 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 linfocitos 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 linfocitos T conserve su capacidad para unirse dentro de la hendidura del MHC, de manera similar a la secuencia de epítipo de linfocitos T natural. El epítipo de linfocitos 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 YXX0 basado en tirosina o el denominado motivo de agrupamiento ácido. El símbolo 0 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 linfocitos 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 (Vijayasradhi *et al.* (1995) J Cell Biol 130, 807-820), de la proteína gamma CD3 humana, del HLA-BM β (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 linfocitos T subdominante o menor de una proteína, lo que facilita la captación en el endosoma tardío sin superar la respuesta de los linfocitos T hacia el epítipo de linfocitos 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 como se describe en el presente documento, en posición N-terminal o C-terminal de un epítipo de linfocitos T del antígeno asociado a un tumor (ya sea directamente adyacente al mismo o separado mediante un enlazador). Además, la secuencia del epítipo de linfocitos 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 linfocitos 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, por ejemplo, de aproximadamente 12-13 aminoácidos (un epítipo de linfocitos 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, como se describe en el presente documento, de 4 aminoácidos, un enlazador de 4 aminoácidos y un péptido de epítipo de linfocitos T de 9 aminoácidos. En realizaciones particulares, los péptidos inmunogénicos de la invención consisten en entre 12 aminoácidos y 20 hasta 25, 30 o 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, 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, como se describe en el presente documento, enlazado a una secuencia del epítipo de linfocitos T. Según realizaciones particulares, los epítopos de linfocitos T proceden de antígenos asociados a tumor que no comprenden en su secuencia natural nativa una secuencia de aminoácidos con propiedades redox dentro de una secuencia de 11 aminoácidos en posición N o C terminal adyacente al epítipo de linfocitos 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 una secuencia de 11 aminoácidos en posición 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 epítopos de linfocitos T cuyos epítopos de linfocitos 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 linfocitos 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 linfocitos T han de comprender además otro motivo redox acoplado al epítipo (adyacente o separado mediante un enlazador) en posición 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 epítopos de linfocitos T en un antígeno de interés asociado a un tumor; las maneras para identificar *in vitro* e informáticamente los epítopos de linfocitos T son muy conocidas en la materia y a continuación se elaboran algunos aspectos. En realizaciones particulares, los métodos según la invención incluyen además la generación de péptidos inmunogénicos de la invención (que incluyen el epítipo de linfocitos 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 linfocitos T reguladoras CD4+ específicos del antígeno asociado a un tumor que son citotóxicos 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/de los epítipo(s) de linfocitos T del/de los antígeno(s) de interés asociado(s) a un tumor. En particular, el epítipo de linfocitos T puede ser un epítipo de linfocitos 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 linfocitos 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 linfocitos T, para determinar si las secuencias peptídicas suscitan una respuesta de linfocitos T. Aquellas secuencias peptídicas que se descubra que suscitan una respuesta de linfocitos T, se definen como poseedoras de una actividad estimuladora de linfocitos T. La actividad estimuladora de linfocitos T humanos puede analizarse además realizando cultivos de linfocitos 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 linfocitos 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 los linfocitos 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 linfocitos T 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 linfocitos T no naturales (o modificados) por las moléculas del MHC de clase II. La unión de epítipos de linfocitos T no naturales (o modificados) a las moléculas del MHC de clase II puede realizarse de diversas maneras. Por ejemplo, las moléculas del HLA 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. Pueden encontrarse métodos, por ejemplo, en Texier *et al.*, (2000) *J. Immunology* 164, 3177-3184). Los péptidos inmunogénicos de la invención tienen un índice de estimulación de linfocitos T medio mayor que o igual a 2,0. Un péptido inmunogénico que tiene un índice de estimulación de linfocitos 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 linfocitos 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 linfocitos T por el porcentaje de individuos, en una población de individuos sensibles a un 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 linfocitos 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 linfocitos T a un péptido (I.E.), como la frecuencia de una respuesta de linfocitos T a un péptido en una población de individuos sensibles a un antígeno asociado a un tumor. Para determinar los epítipos de linfocitos T óptimos mediante, por ejemplo, técnicas de mapeo precisas, un péptido que tiene actividad estimuladora de linfocitos T y que por lo tanto comprende al menos un epítipo de linfocitos T, como se determina mediante técnicas de biología de linfocitos 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 los linfocitos 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 de linfocitos T, como se determina mediante las técnicas de biología de linfocitos T, pueden producirse péptidos adicionales que comprendan todos o una parte de dichos péptidos, y estos péptidos adicionales pueden analizarse mediante un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y producen de manera recombinante o sintética. Los epítipos o péptidos de linfocitos T se seleccionan en función de diversos factores, incluyendo la fuerza de la respuesta de los linfocitos T al péptido/epítipo (por ejemplo, índice de estimulación) y la frecuencia de la respuesta de los linfocitos T 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 linfocitos 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 y Flower (2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN); Schuler *et al.* (2007) *Methods Mol. Biol.* 409, 75-93 (SYFPEITHI); Donnes y Kohlbacher (2006) *Nucleic Acids Res.* 34, W194-W197 (SVMHC); Kolaskar y 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 del 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 a la posición 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 acoplando los diferentes aminoácidos entre sí. La síntesis química es particularmente adecuada para la inclusión de, por ejemplo, D-aminoácidos, aminoácidos con 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 (acoplando de manera quimioselectiva dos fragmentos peptídicos no protegidos), tal y como se describió originariamente en Kent (Schnolzer y 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.

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.

En consecuencia, en otro aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos *in vitro* para generar linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno asociados a un tumor (Tregs o linfocitos T reguladores CD4+) ya sea *in vivo* o *in vitro* (*ex vivo*). En particular, dichos linfocitos T son citotóxicos para cualquiera que presente un antígeno asociado a un tumor y pueden obtenerse como una población. La invención se extiende a dichos (poblaciones de) Tregs citotóxicos específicos de antígeno asociado a un tumor que pueden obtenerse mediante los métodos *in vitro* descritos en el presente documento.

En realizaciones particulares, se proporcionan métodos que comprenden el aislamiento de células de sangre periférica, la estimulación de la población *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 estimulada, más particularmente, en presencia de IL-2. Los métodos según la invención tienen la ventaja de que se producen mayores cantidades de Tregs y de que pueden generarse los Tregs que son específicos del antígeno asociado a un tumor (usando un péptido que comprenda un epítipo específico de antígeno). Como alternativa, los linfocitos T citotóxicos específicos 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 linfocitos T CD4+ citotóxicos.

Como alternativa, los 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 los Tregs generados *in vivo*.

Los linfocitos T reguladores específicos 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 dichos Tregs específicos de antígeno asociado a un tumor. Se contempla el uso tanto de células alogénicas como de autogénicas. Cualquier método que comprenda la administración a un sujeto que lo necesite de dichos Tregs específicos 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 adoptiva. Los Tregs son fundamentales en la inmunorregulación y tienen un gran potencial terapéutico. La eficacia de la inmunoterapia basada en los Tregs depende de la especificidad de los linfocitos T reguladores por el Ag. Además, el uso de Tregs específicos de Ag frente a Tregs expandidos policlonales reduce el número total de Tregs necesarios para la terapia.

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.

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 adoptiva de (una población de) Tregs específicos 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 para 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 mínimas 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 se expresará 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 pulsos de alta tensión 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 en 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 o 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 específicos para dicho péptido inmunogénico o un vector terapéutico genético capaz de expresar dicho péptido inmunogénico. Además del/de los ingrediente(s) 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, Europea o Internacional). El medicamento o la composición farmacéutica de la invención comprende normalmente una cantidad (profiláctica o terapéuticamente) eficaz del/de los ingrediente(s) 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 adsorber 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 los linfocitos 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. Incluyen todos y cada uno de 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 finos, pulverizaciones, aerosoles, suspensiones, pomadas, cremas, comprimidos, microgránulos o polvos. Los transportadores farmacéuticos adecuados 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 μm , 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 la expresión "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 una embolada, 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 linfocitos T de un antígeno no vírico asociado a un tumor distinto de HSP60 y, adyacente a dicho epítipo de linfocitos T, o separado de dicho epítipo de linfocitos T mediante un enlazador, un motivo C-(X)₂-[CST] o [CST]-(X)₂-C. En otras realizaciones particulares, el epítipo es un epítipo por el que el antígeno asociado a un tumor no comprende de forma natural dentro una secuencia de 11 aminoácidos en posición N o C terminal 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.

Un idiotipo se compone del conjunto de determinantes antigénicos portados por la parte variable de anticuerpos y, como se ha descrito anteriormente, estos determinantes se reiteran en BCR (correspondientes a CDR) y TCR (correspondientes a CDR3). El BCR de un linfocito B y los anticuerpos secretados por el mismo linfocito B comparten determinantes idiotípicos. Durante la captación de polipéptidos o proteínas por linfocitos B, partes del BCR se procesan junto con el antígeno y son presentadas por determinantes del MHC de clase II. En linfocitos B tumorales tales como linfomas o mielomas de linfocitos B, el receptor de linfocitos B (o BCR) se dirige con más frecuencia

hacia un antígeno de especificidad indeterminada (por ejemplo el síndrome MGUS: gammapatía monoclonal de especificidad desconocida). Por lo tanto una estrategia para tratar dichos tipos de tumores o células tumorales comprende la inducción (por inmunización y/o terapia génica) de linfocitos T CD4+ reguladores citotóxicos hacia epítopos de linfocitos T de BCR tumorales (o un idiotipo de los mismos; denominados juntos en lo sucesivo en el presente documento idiotipo de linfocitos B tumorales) o epítipo de linfocitos T CDR3 de linfocitos T y/o transferencia adoptiva de dichos linfocitos T CD4+ reguladores citotóxicos. De hecho, ya que epítopos de linfocitos T modificados uniendo un motivo redox a los mismos inducen que los linfocitos T CD4+ adquieran la propiedad de inducir apoptosis en CPA que presentan dicho epítipo de linfocitos T (natural o modificado), los epítopos de linfocitos T de BCR de linfocitos B tumorales (o un idiotipo de los mismos) o epítipo de linfocitos T de CDR3 de linfocitos T tumorales modificado uniendo un motivo redox a los mismos son capaces de inducir linfocitos T CD4+ que puedan conducir dichos linfocitos B tumorales o linfocitos T tumorales a la apoptosis.

La invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden (i) un epítipo de linfocitos T restringido a MHC de clase II de un idiotipo de linfocitos B tumorales e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo por un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de dicho tumor de linfocitos B o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de dicho tumor de linfocitos B.

La invención se refiere a péptidos inmunogénicos aislados de entre 12 y 50 aminoácidos que comprenden (i) un epítipo de linfocitos T restringido a MHC de clase II de un CDR3 de linfocitos T tumorales e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo por un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox [CST]-(X)2-C o [CST]-(X)2-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de dicho tumor de linfocitos T o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de dicho tumor de linfocitos T.

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 linfocitos T contra el antígeno vírico y un motivo redox, 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.

Ejemplos

Ejemplo 1. Los linfocitos T CD4+ reguladores se suscitaron por inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de linfocitos T de antígeno asociado a melanoma (MAGE-31) 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 linfocitos 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 linfocitos T (natural) corresponde a los aminoácidos 258 a 266 de MAGE-3, en concreto: YRQVPGSDP (SEQ ID NO:1).

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 linfocitos T modificado)

Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazos de todos los ratones y se prepararon los linfocitos T CD4+ clasificándolos 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 (2×10^7) 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.

Los linfocitos T CD4+ obtenidos de ratones del grupo 1 o del grupo 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:2 puede suscitar linfocitos T CD4+ con propiedades citotóxicas contra las CPA que presentan el epítipo de linfocitos T de MAGE-3 natural (SEQ ID NO:1) o el epítipo de linfocitos T de MAGE-3 modificado (SEQ ID NO:2).

Ejemplo 2. Los linfocitos T CD4+ reguladores citotóxicos se suscitaron por inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de linfocitos T de ciclina 01 al que se añadió una secuencia consenso de tiorreductasa

5 Ratones C57Bl/6 (grupo 1) se inmunizaron con 25 µg de un péptido que contenía un epítipo de linfocitos 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: CHGCFFVALCATDV (SEQ ID NO:4; motivo redox subrayado; epítipo de linfocitos T modificado).

10 Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazo de todos los ratones y se prepararon los linfocitos T CD4+ clasificándolos sobre perlas magnéticas.

15 Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones C57Bl/6 no tratados previamente. Dichas CPA (2×10^7) 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.

20 Los linfocitos T CD4+ obtenidos de ratones del grupo 1 o del grupo 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.

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

30 **Ejemplo 3. Los linfocitos T CD4+ reguladores citotóxicos se suscitaron mediante inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de linfocitos 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 linfocitos 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).

35 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 linfocitos T modificado).

40 Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazo de todos los ratones y se prepararon los linfocitos T CD4+ clasificándolos sobre perlas magnéticas.

45 Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones C57Bl/6 no tratados previamente. Dichas CPA (2×10^7) 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.

50 Los linfocitos T CD4+ obtenidos de ratones del grupo 1 o del grupo 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.

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

60 **Ejemplo 4. Los linfocitos T CD4+ reguladores citotóxicos se suscitaron mediante inmunización *in vivo* con un péptido que comprendía un epítipo de linfocitos 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 linfocitos 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: CHGCVASSYAAAQ (SEQ ID NO:8; motivo redox subrayado; epítipo de linfocitos T modificado).

5 Diez días después de la última inmunización, se recuperaron los bazos de todos los ratones y se prepararon los linfocitos T CD4+ clasificándolos sobre perlas magnéticas.

10 Como células presentadoras de antígeno (CPA), se utilizaron células adherentes de bazo preparadas de ratones BALB/c no tratados previamente. Dichas CPA (2×10^7) 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.

15 Los linfocitos T CD4+ obtenidos de ratones del grupo 1 o del grupo 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 la apoptosis. Finalmente, las células se analizaron mediante análisis Facs.

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

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Life Sciences Research Partners VZW Saint-Remy, Jean-Marie

<120> Control inmunogénico de tumores y células tumorales

<130> T5211-PCT (044)

30 <150> EP 08447011.1

<151> 14-02-2008

<150> US 61/035.856

35 <151> 12-03-2008

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.3

40 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> aminoácidos 258-266 de MAGE-3

<400> 1

Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro

50

1

5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> epítipo de linfocitos T modificado de MAGE-3

60 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> motivo de tiorreductasa

ES 2 676 630 T3

<400> 2

Cys His Gly Cys Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro
1 5 10

5 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> aminoácidos 185-193 de ciclina D1

<400> 3

Phe Val Ala Leu Cys Ala Thr Asp Val
1 5

15 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> epítipo de linfocitos T modificado de ciclina D1

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo de tiorreductasa

30 <400> 4

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

35 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> aminoácidos 61-69 de survivina

<400> 5

Phe Lys Glu Leu Glu Gly Trp Glu Pro
1 5

45 <210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> epítipo de linfocitos T modificado de survivina

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(4)
<223> motivo de tiorreductasa

60 <400> 6

ES 2 676 630 T3

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

5 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> aminoácidos 167-175 de LMP2 de virus de Epstein-Barr
 <400> 7

Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln
 1 5

15 <210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> epítipo de linfocitos T modificado de LMP2 de virus de Epstein-Barr

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(4)
 <223> motivo de tiorreductasa
 <400> 8

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

30 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia general de 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> (6)..(6)
 <223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de linfocitos T

50 <400> 9

Cys Xaa Xaa Cys Gly Xaa
 1 5

55 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> secuencia general de péptido de la invención

ES 2 676 630 T3

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido
5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de linfocitos T
10
<400> 10

Cys Xaa Xaa Cys Gly Gly Xaa
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de linfocitos T
30
<400> 11

Cys Xaa Xaa Cys Ser Ser Ser Xaa
1 5

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

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(3)
<223> Xaa en las posiciones 2 y 3 indica cualquier aminoácido

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa indica la secuencia de cualquier epítipo de linfocitos T

<400> 12

Cys Xaa Xaa Cys Ser Gly Ser Gly Xaa
1 5

<210> 13
<211> 14
<212> PRT

ES 2 676 630 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> repetición de motivo de tiorreductasa
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(14)
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12 y 13 indica cualquier aminoácido
 10
 <400> 13

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

 15 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> repetición de motivo de tiorreductasa

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (1)..(12)
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 6, 7, 10 y 11 indica cualquier aminoácido

 <400> 14

 Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa Cys
 30 1 5 10

 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> repetición de motivo de tiorreductasa

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(10)
 <223> Xaa en las posiciones 2, 3, 5, 6, 8 y 9 indica cualquier aminoácido

 45 <400> 15

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

 50 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(10)
 60 <223> Xaa en las posiciones 2, 5 y 8 indica cualquier aminoácido

ES 2 676 630 T3

<400> 19

Asp Xaa Xaa Xaa Leu Leu
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido inmunogénico aislado de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un antígeno asociado a un tumor e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo por un enlazador de hasta 7 aminoácidos y (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa dicho antígeno asociado a un tumor o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno asociado a un tumor.
2. El péptido según la reivindicación 1, para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno asociado a un tumor es un oncogén, un protooncogén, una proteína vírica, un factor de supervivencia o un determinante clonotípico.
3. El péptido según la reivindicación 1 o 2, para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C no se produce de manera natural en el interior de una región de 11 aminoácidos en posición N o C terminal adyacente al epítipo de linfocitos T en dicho antígeno asociado a un tumor.
4. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está situado en posición N-terminal del epítipo de linfocitos T.
5. El péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para el uso según la reivindicación 1, en el que al menos una X en dicho motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es Gly, Ala, Ser o Thr o en el que al menos una X en dicho motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C es His o Pro y/o en el que al menos una C en dicho motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C está metilada.
6. Un método *in vitro* para obtener una población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno asociado a un tumor que son citotóxicos contra células que presentan un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno 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 de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno asociado a un tumor e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo mediante un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CTS]-(X)2-C, con la condición de que dicho antígeno asociado a un tumor no sea proteína de choque térmico HSP60;
 - y
 - expandir dichas células en presencia de IL-2.
7. Una población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno asociado a un tumor que son citotóxicos contra células que presentan un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno asociado a un tumor, que puede obtenerse mediante el método según la reivindicación 6, con la condición de que dicho antígeno asociado a un tumor no sea proteína de choque térmico HSP60.
8. Una población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno asociado a un tumor que son citotóxicos frente a células que presentan un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de dicho antígeno asociado a un tumor, según la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento o la prevención de un tumor que expresa dicho antígeno asociado a un tumor o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de un tumor que expresa dicho antígeno asociado a un tumor.
9. Un péptido inmunogénico aislado de entre 12 y 50 aminoácidos que comprende un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un antígeno asociado a un tumor e inmediatamente adyacente a dicho epítipo de linfocitos T o separado de dicho epítipo de linfocitos T mediante un enlazador de hasta 7 aminoácidos, un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, con la condición de que dicho antígeno asociado a un tumor no sea una proteína vírica y con la condición de que dicho antígeno asociado a un tumor no sea proteína de choque térmico HSP60.
10. Un péptido inmunogénico de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un idiotipo de linfocitos B tumorales e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo por un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de dicho tumor de linfocitos B o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de dicho tumor de linfocitos B.
11. Un péptido inmunogénico aislado de entre 12 y 50 aminoácidos, que comprende (i) un epítipo de linfocitos T restringido al MHC de clase II de un CDR3 de linfocitos T tumorales e inmediatamente adyacente al mismo o separado del mismo por un enlazador de hasta 7 aminoácidos, (ii) un motivo redox C-(X)2-[CST] o [CST]-(X)2-C, para su uso en el tratamiento o la prevención de dicho tumor de linfocitos T o para su uso en el tratamiento o la prevención de una recidiva de dicho tumor de linfocitos T.